

Charakterisierung der Lymphozytenpopulation im  
Wächterlymphknoten bei Patienten mit malignem  
Melanom

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Berger, Mareike



Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Ulmer
2. Berichterstatter: Professor Dr. E.-M. Grischke

---

Groß sind die Werke des HERRN; wer sie erforscht, der hat Freude daran.

Psalm 111, 2

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Das maligne Melanom . . . . .	1
1.1.1 Epidemiologie . . . . .	1
1.1.2 Das Pigmentsystem . . . . .	1
1.1.3 Pathogenese . . . . .	2
1.1.4 Klassifizierung . . . . .	3
1.1.5 Diagnostik . . . . .	3
1.1.6 Wächterlymphknoten . . . . .	4
1.1.7 Therapie . . . . .	8
1.1.8 Die Immunogenität des malignen Melanoms . . . . .	8
1.2 Grundlagen des Immunsystems . . . . .	9
1.2.1 Hämatopoese . . . . .	10
1.2.2 Cluster of differentiation (CD) . . . . .	11
1.2.3 B-Zellen . . . . .	11
1.2.4 T-Zellen . . . . .	12
1.2.5 NKT-Zellen . . . . .	17
1.2.6 NK-Zellen . . . . .	18
1.2.7 Aufbau und Funktion eines Lymphknotens . . . . .	19
1.3 Fragestellung . . . . .	20
<b>2 Proben und Materialien</b>	<b>22</b>
2.1 Herkunft der Proben und Bestimmung der Melanomzellichte . . . . .	22
2.2 Materialien . . . . .	23
2.2.1 Allgemeine Geräte . . . . .	23
2.2.2 Verbrauchsmaterialien . . . . .	23
2.2.3 Allgemeine Chemikalien . . . . .	24
2.2.4 Stammlösungen . . . . .	24
2.2.5 Antikörper und Fluorochrome . . . . .	25

2.2.6	Beads . . . . .	26
2.2.7	EDV-Programme . . . . .	26
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>27</b>
3.1	Prinzip der Durchflusszytometrie . . . . .	27
3.1.1	Aufbau des Messgerätes und Messtechnik . . . . .	27
3.1.2	Auswertung . . . . .	31
3.1.3	Kompensation . . . . .	31
3.2	Untersuchung der Lymphozyten . . . . .	32
3.2.1	Färben der Zellen . . . . .	32
3.2.2	Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse . . . . .	34
3.2.3	B-Zellen . . . . .	37
3.2.4	NK- und NKT-Zellen . . . . .	42
3.2.5	T-Zellen . . . . .	43
3.3	Statistik . . . . .	50
3.3.1	Verteilung der Proben . . . . .	50
3.3.2	Verwendete statistische Größen und Tests . . . . .	51
3.3.3	Irrtumswahrscheinlichkeit und Signifikanzniveau . . . . .	53
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>54</b>
4.1	B-Zellen . . . . .	54
4.1.1	Verteilung der B-Zellen . . . . .	54
4.1.2	Gesamtzahl der B-Zellen . . . . .	55
4.1.3	B-Zell-Subpopulationen . . . . .	56
4.1.4	Plasmazellen . . . . .	59
4.1.5	Zusammenfassung der B-Zell-Ergebnisse . . . . .	60
4.2	T-Zellen . . . . .	61
4.2.1	Verteilung T-Zellen . . . . .	61
4.2.2	Gesamtzahl der T-Zellen . . . . .	61
4.2.3	Verteilung der T-Zell-Subpopulationen . . . . .	63
4.2.4	T-Helfer- und T-Killer-Zellen . . . . .	63
4.2.5	T-Zell Reifestadien . . . . .	65
4.2.6	Regulatorische T-Zellen . . . . .	72
4.3	NKT-Zellen . . . . .	74
4.3.1	Verteilung der NKT-Zellen . . . . .	74
4.3.2	NKT-Zell-Ergebnisse . . . . .	74
4.4	NK-Zellen . . . . .	76
4.4.1	Verteilung der NK-Zellen . . . . .	76

4.4.2	Gesamtzahl der NK-Zellen . . . . .	76
4.4.3	NK-Zell-Subpopulationen . . . . .	77
4.4.4	Zusammenfassung der NK-Zell-Ergebnisse . . . . .	80
4.5	Kontrollprobe . . . . .	80
4.5.1	B-Zellen . . . . .	80
4.5.2	T-Zellen . . . . .	80
4.5.3	NK-Zellen . . . . .	82
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>83</b>
5.1	Methodenkritik . . . . .	83
5.2	Überblick über die großen Lymphozytenpopulationen . . . . .	85
5.2.1	B-Zellen . . . . .	85
5.2.2	T-Zellen . . . . .	86
5.2.3	B:T-Zell-Verhältnis . . . . .	87
5.3	B-Zellsubpopulationen . . . . .	88
5.3.1	B-Gedächtniszellen . . . . .	88
5.3.2	CD25 <sup>+</sup> B-Zellen . . . . .	89
5.3.3	CD69 <sup>+</sup> B-Zellen . . . . .	90
5.3.4	CD69 <sup>+</sup> /25 <sup>+</sup> B-Zellen . . . . .	91
5.3.5	Plasmazellen . . . . .	91
5.4	T-Helfer- und T-Killer-Zellen . . . . .	92
5.5	T-Zell Reifestadien . . . . .	93
5.5.1	Naive T-Zellen . . . . .	93
5.5.2	T-Gedächtniszellen . . . . .	94
5.5.3	T-Effektorzellen . . . . .	95
5.6	Regulatorische T-Zellen . . . . .	96
5.6.1	Mögliche Therapieansätze durch regulatorische T-Zellen . . . . .	98
5.7	NKT-Zellen . . . . .	99
5.8	NK-Zellen . . . . .	101
5.8.1	NK-Zell-Subpopulationen . . . . .	103
5.8.2	Mögliche Therapieansätze durch NK-Zellen . . . . .	105
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>109</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>120</b>
8.1	Abbildungsverzeichnis . . . . .	120
8.2	Tabellenverzeichnis . . . . .	121

*Inhaltsverzeichnis*

---

8.3 Messergebnisse . . . . .	123
<b>9 Danksagung</b>	<b>139</b>

# Abkürzungsverzeichnis

**A** Area

**AF** Alexa Fluor

**APC** Allophycocyanin

**BP** Band Pass

**BSA** Bovines Serum Albumin

**CD** Cluster of differentiation

**CM** Central Memory

**CTLA** Cytotoxic-T-lymphocyte-Antigen

**Cy** Cyanin

**Dy** Dyomics

**E** Effector

**EM** Effector Memory

**FACS** fluorescence activated cell sorting

**FCS** Fetales Kälberserum

**FITC** Fluoresceinisothiocyanat

**FMO** Fluorescence minus one

**FSC** forward scatter

**gp** Glykoprotein

**H** Height

**HLA** Human Leukocyte Antigen



- HMB** Anti-Human Melanoma
- IFN** Interferon
- IL** Interleukine
- KIR** Killer Ig like receptors
- LDI** Lymphknoten Disaggregations Immunzytologie
- LP** Long Pass
- LQ** Lichtquelle
- MHC** Major Histocompatibility Complex
- MZD** Melanomzelldichte
- N** Naive
- PB** Pacific Blue
- PBS** Phosphat Buffered Saline
- PBSA** Phosphat Buffered Serum Albumin
- PE** Phycoerythrin
- pE** pro Effektor
- PerCP** Peridinin-Chlorophyll-Protein
- PFA** Paraformaldehyd
- RZB** relative Zentripetalbeschleunigung
- SSC** side scatter
- TEMRA** enddifferenzierte T-Zellen
- q** Quantum
- UV** ultra violett
- V** violett
- WLK** Wächterlymphknoten

# 1 Einleitung

## 1.1 Das maligne Melanom

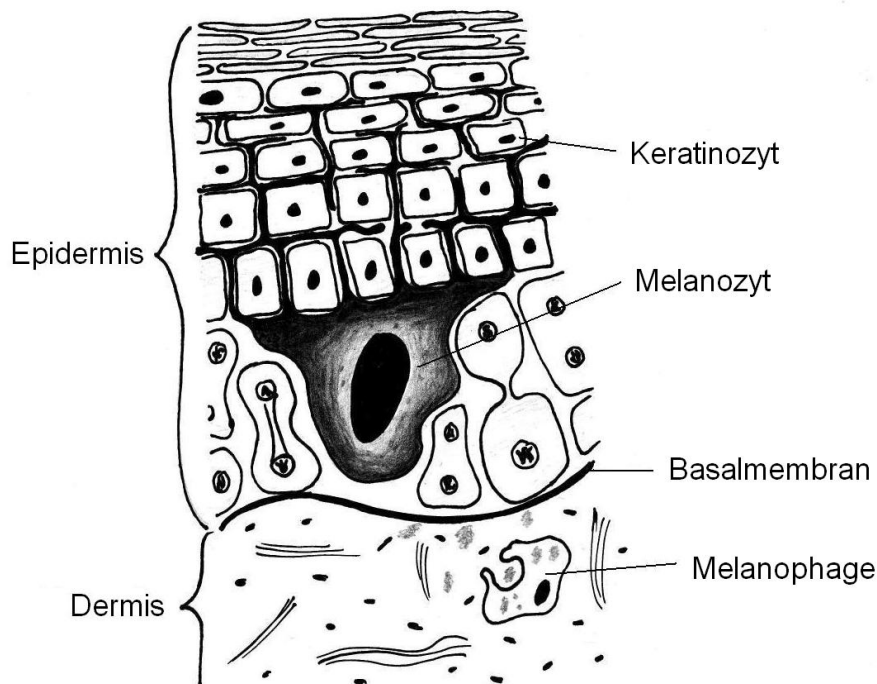
Das maligne Melanom, auch schwarzer Hautkrebs genannt, ist ein bösartiger Tumor der Haut, der aus entarteten Melanozyten entsteht. Melanozyten sind pigmentbildende Zellen der Haut (vgl. 1.1.2) [1].

### 1.1.1 Epidemiologie

Nach dem Basalzell- und Plattenepithelkarzinom ist das maligne Melanom der dritthäufigste maligne Hauttumor. Seine frühzeitige Metastasierung macht das maligne Melanom zu einem besonders bösartigen Tumor, der 90% aller Todesfälle durch Hauttumore bedingt [1]. Mit einer Inzidenz von 13-15 Neuerkrankungen /100.000/Jahr liegt das Lebenszeitrisko in der weißen Bevölkerung Europas und Nordamerikas heute bei 1:75 [2]. Die Bedeutung des Melanoms wird hier vor allem angesichts der weltweiten Inzidenzsteigerung der letzten Jahre von 5 – 10% pro Jahr deutlich [1]. Was die Inzidenz des malignen Melanoms im Vergleich mit allen Krebserkrankungen angeht, so lag es 2008 in Deutschland bei Männern an 8., bei Frauen sogar an 5. Stelle [3]. Beängstigend ist dies besonders angesichts der immer noch schlechten Heilungschancen und des hohen Verlusts an Lebensqualität und -jahren, gerade da es sich um eine Erkrankung des mittleren Lebensalters handelt [4]. Weltweit liegt die Letalität bei 20-30% der am Melanom Erkrankten, das sind in Deutschland 1,3% aller Krebstoten [5].

### 1.1.2 Das Pigmentsystem

Melanozyten sind dendritische, sekretorische Zellen, die Melaninpigmente produzieren. Sie bilden das Pigmentsystem der Haut. [1] Melanozyten sitzen im Stratum basale der Basalmembran auf (vgl. Abb. 1.1). Sie stammen von Melanoblasten ab, die in der Fetalperiode aus der Neuralleiste in Haut und Haare einwandern. Auch in Schleimhäuten, Leptomeningen, Innenohr und Auge befinden sich Melanozyten, wo sich daher auch Melanome bilden können [1].



**Abbildung 1.1:** Querschnitt durch die obersten Hautschichten: Melanozyt, der der Basalmembran aufsitzt und viele Keratinozyten mit melaninhaltigen Melanosomen versorgt. (Eigene Darstellung nach [1])

Das Melaninpigment dient dem UV-Schutz und bestimmt überwiegend die Hautfarbe. Es besteht aus braun-schwarzen (Eumelanin), rot-gelben (Pheomelanin) und roten (Trichrom) Anteilen, die in verschiedenen Kombinationen verschiedene Farben möglich machen [1]. Ein Melanozyt versorgt ungefähr 36 Keratinozyten mit melaninhaltigen Melanosomen [1]. Das sind spezielle Zellorganellen, in denen Melanin synthetisiert wird. Schlüsselenzym der Synthese ist die Tyrosinase. Menschen schwarzer Hautfarbe besitzen nicht mehr Melanozyten, sondern mehr und gleichmäßiger verteilte Melanosomen [1].

### 1.1.3 Pathogenese

Die Ätiopathogenese des malignen Melanoms ist nicht vollständig geklärt, man geht allerdings von einem Mehrstufenmodell aus [1]. Genmutationen und chromosomale Veränderungen führen zu Störung der Wachstumsregulation, genetischer Instabilität, klonaler Evolution und schließlich malignen Tumorzellen [1].

### Risikofaktoren

Wichtiges Kanzerogen ist die UV-Exposition der Haut, wobei vor allem UV-B kanzerogene Wirkung besitzt. Akut-intermittierende Lichtexposition an wenig lichtexponierter Haut, so

wie Sonnenbrände in Kindheit und Jugend gelten als besonders schädlich [1]. Chronisch-kumulative Lichtexposition birgt ein eher indirektes Risiko, durch Bildung melanozytärer Nävi oder Lentigo maligna als Melanommarker oder -vorläufer. Bis zu 30% der Melanome entstehen innerhalb melanozytärer Nävi, die Mehrheit allerdings de novo auf gesunder Haut [1]. Dennoch gilt eine Vielzahl an Nävi als Risikofaktor. Menschen mit lichtempfindlichen Hauttypen I und II oder Xeroderma pigmentosum, so wie Patienten mit Immundefizienz haben ein erhöhtes Risiko. Außerdem spielt in ca. 5-10% der Fälle eine familiäre Belastung eine Rolle [1].

### 1.1.4 Klassifizierung

Nach Wachstumsverhalten, Entstehungsweg und Lokalisation lassen sich verschiedene Melanomtypen unterscheiden. Der häufigste Melanomtyp ist mit 57% das superfiziell spreitende Melanom (SMM). Es ist flach erhaben und wächst zunächst superfiziell, später auch vertikal, invasiv mit knotigen und ulzerierenden Herden [6]. Bei Männern ist das SMM vor allem am Rücken lokalisiert, bei Frauen meist an den Unterschenkeln. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 51 Jahren [1].

Das noduläre Melanom (NM) zeichnet sich durch primär knotiges Wachstum aus. Es wächst meist erosiv-krustös und ulzeriert. Mit 21% ist auch das NM recht häufig und betrifft im Mittel 56-jährige Patienten [1].

Mit 9% gehört das Lentigo-maligna-Melanom (LMM) zu den selteneren Melanomtypen. Es tritt meist im Gesicht auf, betrifft vor allem Frauen. Der Erkrankungsgipfel liegt bei 68 Jahren. Das LMM entsteht aus dem meist über Jahre bestehenden Melanoma in situ, Lentigo maligna. [1]

Akral lokalisiert an Händen und Füßen wächst das akrolentiginöse Melanom (ALM), das mit 4% ebenfalls zu den seltenen Melanomen gehört. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren. Eine Sonderform des AM ist das Nagelbettmelanom [6].

Desweiteren gibt es Sonderformen wie nävusassoziierte Melanome, nicht-klassifizierbare Melanome, primär dermale Melanome, amelanotische Melanome oder Schleimhautmelanome [6].

### 1.1.5 Diagnostik

Für die Diagnose des malignen Melanoms ist zunächst die Anamnese, Klinik und Dermatoskopie von Bedeutung. Um benigne melanozytäre Nävi von dysplastischen oder gar Melanomen zu unterscheiden, macht man sich die ABCD-Regel zu nutze. Danach sind Nävi malignitätsverdächtig bei Asymmetrie (A), unscharfer Begrenzung (B), unregelmäßiger Pigmentierung - blau-grau-schwarz, helle oder rötliche Zonen, Vielfarbigkeit -

(C wie color) oder einem Durchmesser  $> 6$  mm (D) [1]. Hinweis auf entartete Zellen ist außerdem schnelles Wachstum oder die Gestalt eines Nävus, der sich optisch deutlich von anderen Nävi eines Patienten unterscheidet und somit nicht ins Gesamtbild passt.

Klinisch dysplastische Nävi werden entfernt und histologisch untersucht. Sie weisen spindelförmige Melanozyten auf, die nicht in Nestern sondern fischzugartig entlang der Junktionszone angeordnet sind (Bridging). Unter den Fischzügen zeigt sich oft eine Fibrose. Die Ränder sind unscharf begrenzt. Dies sind Kriterien für Nävi in der Wachstumsphase oder auch ein Melanoma in situ. Histologisch sind die beiden allerdings schwer abzugrenzen. Bei invasivem melanozytärem Wachstum tropfen Melanozyten in die Dermis ab und es sind atypische Melanozyten mit Kernpolymorphismen, großen Zellen und dermalen Mitosen sichtbar. Einer der wichtigsten prognostischen Faktoren ist die Invasionsstiefe des Tumors, die auch in der Histologie bestimmt wird (angegeben in mm mit zwei Stellen nach dem Komma). Man gibt entweder die absolute Tumordicke nach Breslow an oder die relative Tumordicke in Bezug auf die Hautschichten (Clark-Level), wobei die Levelteilung weniger aussagekräftig ist [1].

Zur Tumorausbreitungsdiagnostik gehört weiterhin die Sonographie der unmittelbaren Tumorumgebung und des regionären Lymphabflussgebietes, je nach Stadium und Organmanifestationen, außerdem auch Röntgenthorax, Abdomensonographie, CT, MRT und/oder PET. Der Melanommarker S100 dient der Verlaufskontrolle [1]. Ab einer Tumordicke  $> 1$  mm führt man eine Wächterlymphknotendiagnostik durch (vgl. 1.1.6).

Bei der gesamten Diagnostik gilt es mögliche Metastasen zu finden. Man unterscheidet ein Lokalrezidiv nach subtotaler Exzision oder als Metastase im Narbenbereich, Satellitenmetastasen in der Tumorumgebung bis 2cm, Transitmetastasen im Verlauf des Lymphabflusses, regionäre Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen, die sowohl lymphogen als auch hämatogen Lunge, Leber, Gehirn, Knochen und Haut befallen können [1]. In 2/3 der Fälle handelt es sich primär um lokoregionäre Metastasen, meist Lymphknotenmetastasen, 1/3 der Metastasen sind primäre Fernmetastasen.

### 1.1.6 Wächterlymphknoten

Bei verschiedenen malignen Erkrankungen, die auf lymphogenem Weg metastasieren, spricht man vom Wächterlymphknoten (WLK) als dem ersten Lymphknoten des Lymphabflussgebietes eines Primärtumors. Durch diese anatomische Position erhält dieser Lymphknoten eine Wächterfunktion bei der Tumorbekämpfung des Körpers und ist als entscheidende biologische Barriere in der Tumorprogression von prognostischer Relevanz [7].

### **Geschichte des Wächterlymphknotens**

Erstmals eingebracht wurde die Lymphknotendisektion bei Krebspatienten durch Herbert Snow (1847-1930), einem Londoner Chirurgen, der sich besonders für die Behandlung des malignen Melanoms interessierte [8]. Er befürwortete die elektive und radikale Lymphknotendisektion als chirurgische Behandlung lymphatischer Melanometastasen, lange bevor diese allgemein akzeptiert wurde [9]. Seit Snow (1892) wurde die Lymphknotendisektion im Allgemeinen, so wie ihre Radikalität und ihr Zeitpunkt immer wieder kontrovers diskutiert.

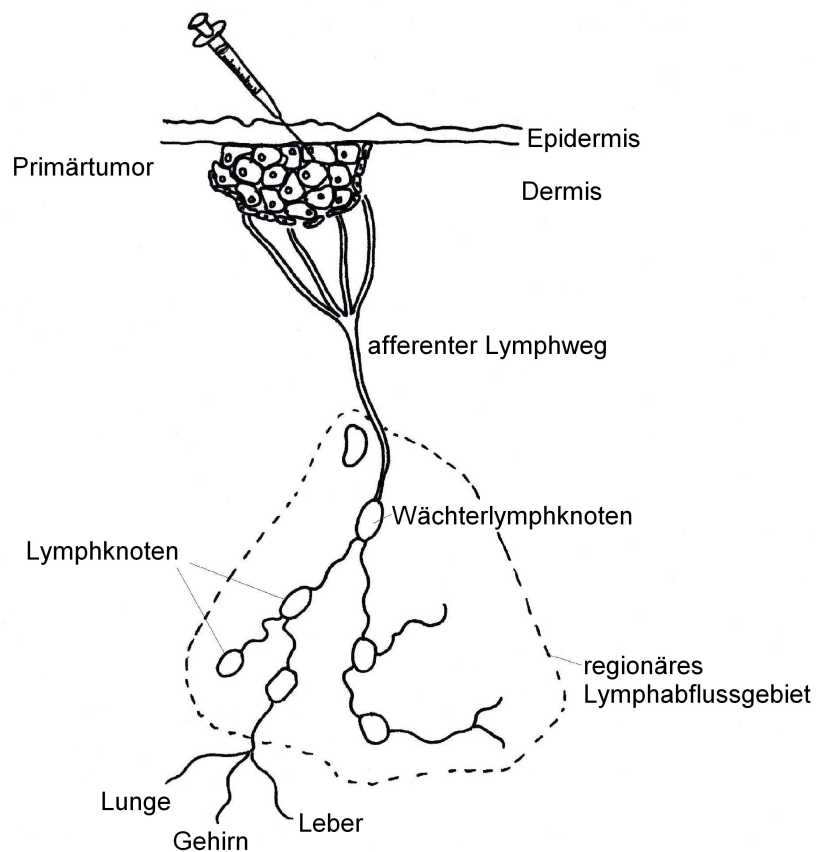
In neueren Studien konnte keine Evidenz für den therapeutischen Wert der elektiven Lymphknotendisektion beim malignen Melanom gezeigt werden [10]. Für eine frühe Entfernung mikroskopisch befallener regionärer Lymphknoten bestätigte sich jedoch eine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens im Vergleich zur therapeutischen Lymphknotendisektion klinisch befallener Lymphknoten [10].

Hundert Jahre nach Snow (1992) beschrieben Morton et al. erstmals mit der Lymphoszintigraphie eine Alternative zur radikalen Dissektion. Diese Technik ermöglicht es dem Chirurgen den Lymphweg ausgehend vom Primärtumor bis zum regionalen Lymphabflussgebiet darzustellen und selektiv den ersten der drainierenden Lymphknoten, den WLK, zu identifizieren und zu untersuchen [11]. Indem dieser Lymphweg dargestellt wird, wird gleichzeitig der Weg der ersten sich ausbreitenden Melanomzellen dargestellt. Entfernt man den WLK und untersucht ihn auf Metastasen, können klinisch unauffällige, aber schon befallene Lymphknoten entdeckt werden.

### **Lymphoszintigraphie und Biopsie des Wächterlymphknotens**

Zur Darstellung des WLK wird er präoperativ nuklearmedizinisch markiert. Bei dieser kutanen Lymphoszintigraphie wird ein mit radioaktivem  $^{99m}\text{Tc}$ -Technetium markiertes Nanokolloid in den Primärtumor, bzw. die unmittelbare Umgebung, gespritzt, von wo aus es sich wie potentielle Metastasen über den Lymphabflussweg ausbreitet und im WLK anreichert. Mit Hilfe eines Szintillationszählers kann dieser Lymphknoten dann intraoperativ ausgemacht und entfernt werden. Damit der WLK auch optisch identifiziert werden kann, wird zudem 1-2ml Patentblau in den Primärtumor, bzw. dessen unmittelbare Umgebung, gespritzt, das den WLK innerhalb von Minuten sichtbar blau anfärbt und somit die intraoperative Orientierung erleichtert.

Da der WLK der Ort der wahrscheinlichsten und frühesten Metastasen ist [10], ist die WLK Biopsie eine sehr präzise Stagingmethode. Damit dient die WLK Biopsie nicht therapeutischen sondern viel mehr diagnostischen Zwecken. Die radikale Lymphknotendisektion bleibt Patienten mit bereits befallenen Lymphknoten vorbehalten, sodass Patienten



**Abbildung 1.2:** Lymphabflussweg und kutane Lymphoszintigraphie: Der Primärtumor ist bereits in die Dermis eingedrungen. Radioaktiv markiertes Nanokolloid und/oder 1-2ml Patentblau wird in den Primärtumor gespritzt und breitet sich über den Lymphweg aus. Der Lymphknoten des regionalen Lymphabflussgebietes, der zuerst erreicht wird, ist als WLK definiert. So kann der WLK identifiziert und entfernt werden. Dieser Lymphknoten wird auch zuerst von streuenden Tumorzellen erreicht. Nach dieser lymphatischen Metastasierung können Tumorzellen in die Blutbahn gelangen und in Lunge, Gehirn oder Leber streuen. (Eigene Darstellung nach [10])

mit negativen WLK - also ohne Melanozyten im untersuchten WLK - das Risiko und die Morbidität einer solchen radikalen Lymphknotendissektion, wie zum Beispiel ein sekundäres Lymphödem, erspart bleibt.

### **Untersuchung des Wächterlymphknotens auf Melanommetastasen**

Die Bestimmung des WLK-Status erfolgt nach verschiedenen Strategien. Zum einen wird der Lymphknoten mit konventioneller Hematoxylin- und Eosin- (HE) Färbung und mittels immunhistologischer Färbung untersucht. Für die Immunhistologie werden vor allem drei Antikörper verwendet. S100 ist wegen seiner hohen Sensitivität als Screeningmarker geeignet [12]. Anti-Human Melanoma (HMB)45 und Melan A zeichnen sich durch eine hohe Spezifität aus [13]. Die Detektionsrate disseminierter Melanozyten bleibt allerdings eingeschränkt, da bei dieser Schnittdiagnostik immer nur relativ kleine Ausschnitte des Gewebes untersucht werden können [13]. Da die Aufarbeitung des gesamten WLK mittels Serienschritten in der Praxis aus Zeit- und Kostengründen nicht realisierbar ist, können disseminierte Melanozyten unentdeckt bleiben und somit falsch negative Befunde auftreten [13]. Gerade Mikrometastasen, die klinisch und radiologisch okkult bleiben, können auch dieser Methode entgehen.

Eine weitere Möglichkeit der Untersuchung auf Metastasen ist die Lymphknoten Disaggregations Immunzytologie (LDI). Dafür wird das native Lymphknotengewebe mechanisch disaggregiert, sodass der Lymphknoten als Einzelzellsuspension vorliegt. [14]. Die Tumorzellen werden immunzytochemisch mit HMB45 angefärbt. Es handelt sich dabei um einen monoklonalen Mausantikörper, der gegen Premelanosomen gerichtet ist und somit an einen Großteil der Melanome, bzw. Melanommetastasen, bindet. [14] Die HMB45 positiven Zellen werden ausgezählt und damit die Melanomzellendichte (MZD) des WLK bestimmt (vgl. 2.1). Immunzytologische Untersuchungen stellten sich als deutlich sensitiver als histopathologische heraus, da das untersuchte Gewebe nicht nur für einen Ausschnitt, sondern für den gesamten Lymphknoten repräsentativ ist und auch okkulte Melanozyten entdeckt werden können [14]. Ulmer et al. konnten außerdem zeigen, dass die MZD so wohl mit der Wahrscheinlichkeit eines positiven histopathologischen Ergebnisses im WLK als auch mit der Tumordicke des Primärtumors korreliert [14]. Der WLK wird also zur Hälfte mittels Schnittdiagnostik untersucht, die andere Hälfte dient der Bestimmung der MZD mittels LDI. Ist der Lymphknoten zu klein oder asymmetrisch, wird er komplett histopathologisch untersucht (vgl. 2.1).



### 1.1.7 Therapie

Zunächst besteht die Therapie des malignen Melanoms in der Exzision des Primärtumors. Dabei muss auf Sicherheitsabstände geachtet werden: Melanoma in situ → 0.5 cm; Tumordicke < 2 mm → 1 cm; Tumordicke  $\geq 2$  mm → 2 cm.

Bei Nachweis von Mikrometastasen im WLK wird die Ausräumung der Lymphknotenstation empfohlen, obwohl eine Prognoseverbesserung noch nicht gesichert werden konnte. Werden im WLK klinisch oder histologisch Metastasen nachgewiesen, so wird die Lymphknotenstation ausgeräumt und eventuell nachbestrahlt, sofern keine R0-Resektion erzielt werden kann [1]. Hautmetastasen und umschriebene Fernmetastasen können exzidiert werden, ist dies nicht möglich, werden Metastasen bestrahlt. Bei Lentigo-maligna-Melanomen kann auch eine Strahlentherapie des Primärtumors möglich sein.

Abgesehen von der Chirurgie und der Strahlentherapie, sind die Therapieoptionen immer noch enttäuschend. Dacarbazin hat als Monotherapie eine Ansprechrate von 18%, in Kombination mit Interferon- $\alpha$  28%. Außerdem kann es mit anderen Zytostatika kombiniert werden wie Temozolomid, das liquorgängig ist, oder Vinblastin [1]. Interferon- $\alpha$  wird auch als adjuvante Immuntherapie eingesetzt. Desweiteren gibt es experimentelle Therapien, die versuchen, das Immunsystem zu modulieren [1] [15] (vgl. 5.6.1, 5.8.2). Am effektivsten bleiben immer noch Präventivmaßnahmen wie Lichtschutz.

### 1.1.8 Die Immunogenität des malignen Melanoms

Das Melanom gehört zu den Tumorerkrankungen mit der stärksten immunogenen Wirkung [16]. Dies bedeutet, dass der Tumor Antigene exprimiert, die tumorspezifisch erkannt werden und eine Immunreaktion hervorrufen [17]. Es sind bereits viele melanomspezifische tumorassoziierte Antigene bekannt. Wichtige Beispiele sind die Tyrosinase als Schlüsselenzym der Melaninsynthese (vgl. 1.1.2) und MAGE (melanoma associated antigen)-A3 und -1 [17]. Bei letzteren handelt sich um Keimzellantigene, die von manchen Melanomen exprimiert werden [17]. Häufige Antigene sind außerdem MART-1 (melanoma antigen recognized by T-cells 1 oder Melan-A (Melanocyte Antigen)), Glykoprotein (gp)75 und gp100 oder Pmel17 (premelanosome protein)). Gp100 ist Ligand für HMB45 [17]. Diese Antigene stammen aber nicht alle von Protoonkogenen ab und gehen nicht unbedingt auf mutierte Gene zurück. Dennoch werden sie physiologischerweise gar nicht oder in deutlich geringerem Ausmaß von MHC-Molekülen präsentiert (Keimzellen exprimieren z.B. keine MHC-Moleküle) und werden für zytotoxische T-Zellen verdächtig [17].

In verschiedenen Immuntherapeutischen Ansätzen wurden die Kenntnisse über melanomspezifische Antigene bereits umgesetzt [17]. Eine Gefahr bei Immuntherapien und Impfungen ist das Auslösen einer Autoimmunerkrankung gegen gesundes Gewebe der

Tumorart, wie z.B. eine Vitiligo [17]. Obwohl Melanozyten spezifische Antigene auch auf anderen Zellen wie Innenohr, Retina und Gehirn exprimiert werden, wurden an diesen Organen bisher keine Nebenwirkungen beobachtet, vielleicht da auf diesen Zellen die entsprechenden MHC-I-Moleküle zu gering exprimiert werden [17]. Trotz dieser Immunogenität des malignen Melanoms und der beobachteten Immunantwort, ist das Immunsystem nicht in der Lage, den Tumor tatsächlich zu kontrollieren [17]. Es bleibt unklar, wie sich Tumore vor dem Immunsystem verstecken können, bzw. was die Immunantwort so ineffektiv macht [16].

## 1.2 Grundlagen des Immunsystems

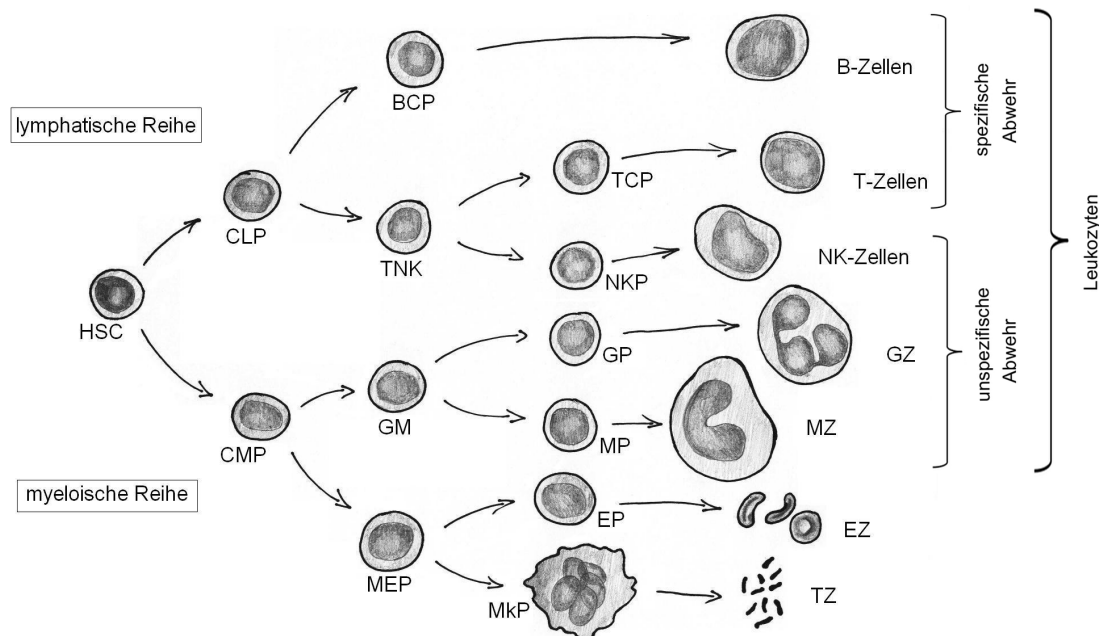
Das Immunsystem besteht aus einer humoralen und einer zellulären Komponente. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie haben wir den zellulären Anteil des Immunsystems untersucht. Die Gesamtheit dieses zellulären Immunsystems sind die Leukozyten. Des weiteren unterscheidet man die spezifische und die unspezifische Abwehr des Körpers. Zur unspezifischen zellulären Abwehr zählen Natürliche-Killer-Zellen (NK-Zellen), Monozyten, Makrophagen, Granulozyten (Basophile, Neutrophile und Eosinophile), Mastzellen und dendritische Zellen. NK-Zellen gehören im Unterschied zu allen anderen Zellen der unspezifischen Abwehr zur lymphatischen Zellreihe (vgl. Abb. 1.3) [18].

Die spezifische Abwehr wird von B- und T-Lymphozyten gebildet. Während Zellen der unspezifischen Abwehr alle gleich aufgebaut sind, besitzen Lymphozyten verschiedene hochspezifische Rezeptoren, mit denen sie Fremdstoffe erkennen können [18]. Allerdings muss die spezifische Immunantwort erst aktiviert werden, bevor sie in Aktion tritt. Gelangt ein Antigen in den Körper und wird von einem Lymphozyten durch den hochspezifischen Rezeptor erkannt, wird dieser Lymphozyt aktiviert und stark vervielfältigt [18].

Diese sogenannte klonale Selektion findet in den sekundären lymphatischen Organen statt. Man unterscheidet primäre und sekundäre lymphatische Organe [18]. Primäre lymphatische Organe, das Knochenmark und der Thymus, sind der Ort der antigenunabhängigen Lymphozytenreifung. B-Zellen reifen im Knochenmark (B wie bone marrow), T-Zellen im Thymus (T wie thymus) [18]. Reife naive Lymphozyten wandern dann in die sekundären lymphatischen Organe, wo durch aktive Interaktion mit Antigenen die antigenabhängige Lymphozytenreifung, bzw. -differenzierung statt findet. Sekundäre lymphatische Organe sind unter anderem Lymphknoten [18].

Die Reifung der Zellen in der Hämatopoese und die Aktivierung der Lymphozyten in sekundären lymphatischen Organen wird durch Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, wie Zytokine, bestimmt [19].

## 1.2.1 Hämatopoese



**Abbildung 1.3:** Schema der Hämatopoese.

HSC: pluripotente Hämatopoetische Stammzelle.

*Lymphatische Reihe:* CLP: gemeinsame lymphatische Progenitorzelle, BCP: B-Zellen-Progenitorzelle, gemeinsame T- und NK-Zellen-Progenitorzelle, TCP: T-Zellen-Progenitorzelle, NKP: NK-Zellen-Progenitorzelle.

Die aus der lymphatischen Reihe stammenden B-, T- und NK-Zellen werden als Lymphozyten zusammengefasst.

*Myeloische Reihe:* CMP: gemeinsame myeloische Progenitorzelle, GM: gemeinsame Granulozyten- Monozyten-Progenitorzelle, GP: Granulozyten-Progenitorzelle, GZ: Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile, Basophile) MP: Monozyten-Progenitorzelle, MZ: Monozyten, MEP: Megakaryozyten-Erythrozyten-Progenitorzelle, EP: Erythrozyten-Progenitorzelle, EZ: Erythrozyten, MkP: Megakaryozyten-Progenitorzelle, TZ: Thrombozyten.

B- und T-Zellen bilden die spezifische Abwehr, NK-Zellen, Monozyten und Granulozyten bilden die unspezifische Abwehr. Zusammengefasst bezeichnet man die Zellen der Abwehr als Leukozyten. Daneben gibt es Erythrozyten und Thrombozyten. (Eigene Darstellung nach [19])

Die gesamte Hämatopoese entwickelt sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Dies sind adulte Stammzellen deren Entwicklungspotential gegenüber embryonalen Stammzellen schon deutlich eingeschränkt ist [19]. Aus ihnen kann sich unter Einfluss von Zytokinen jede der verschiedenen Blutzellen entwickeln [19].

Außerdem haben Stammzellen die Fähigkeit, zwei Tochterzellen zu bilden, die mit der Mutterzelle identisch sind, und somit den Stammzellpool erhalten und vergrößern [19]. Mit

zunehmender Ausdifferenzierung der Zellen, nimmt diese Fähigkeit zur Selbsterneuerung ab [19].

In der Hämatopoese unterscheidet man eine myeloische und eine lymphatische Entwicklungsreihe (vgl. Abb. 1.3). Der myeloischen Reihe gehören Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten der unspezifischen Abwehr wie Granulozyten, Makrophagen, Monozyten an [18]. Von der gemeinsamen lymphoiden Progenitorzelle gehen drei lymphatische Zellreihen aus [18], die in der vorliegenden Arbeit untersucht werden: B-, T- und NK-Zellen (vgl. Abb. 1.3).

### 1.2.2 Cluster of differentiation (CD)

Lymphozyten und ihre Vorstufen können anhand von spezifischen Oberflächenproteinen, sogenannte CD-Antigene, charakterisiert und identifiziert werden [19]. Jeder Zelltyp und jede Reifungsstufe besitzt eine charakteristische Zusammenstellung an CD-Molekülen [18]. Dies macht sich die Durchflusszytometrie zunutze, um den Immunphänotyp der Lymphozyten eines Gewebes, bzw. einer Zellsuspension, immunhistologisch zu bestimmen (vgl. 3.1).

Die Struktur und Funktion der CD-Moleküle sind u.a. Signaltransduktion nach Antigenkontakt, Rezeptoren für Interleukine (IL), Komplementfaktoren, Immunglobuline und Adhäsionsmoleküle [19].

### 1.2.3 B-Zellen

10-13% der Lymphozyten sind B-Zellen [19]. Sie entwickeln sich primär im Knochenmark und sekundär in der Milz. In ihrer Zellmembran ist ein Glykoprotein verankert, das hochspezifisch an ein Antigen binden kann - der B-Zell-Rezeptor (BCR) [18]. Charakteristischer Marker für B-Zellen ist CD19 [17].

Binden Antigene an den BCR, werden B-Zellen aktiviert und wandeln sich zum Teil in Plasmazellen um. Plasmazellen synthetisieren den BCR mit einem verkürzten C-terminalen Ende und sezernieren ihn als Antikörper oder Immunglobulin [18]. Diese Immunglobuline (IgG, IgA, IgM, IgE und IgD) bilden die humorale spezifische Immunabwehr des Körpers [18].

Außerdem gibt es verschiedene B-Zell-Subpopulationen, die sich anhand von Aktivierungsmarkern wie CD25 oder CD69 unterscheiden lassen, [17] und B-Gedächtniszellen, die CD27<sup>+</sup> sind [20].

### 1.2.4 T-Zellen

T-Zellen entwickeln sich aus lymphoiden Progenitorzellen, die in den Thymus auswandern. Sie machen 70-75% der Lymphozyten aus [19]. Charakteristischer Marker für T-Zellen ist CD3 [17].

#### T-Helfer- und T-Killer-Zellen

Man unterscheidet zwei Gruppen von T-Zellen. T-Helfer-Zellen, die CD4<sup>+</sup> sind, und zytotoxische T-Zellen oder auch T-Killer-Zellen, die CD8<sup>+</sup> sind [18]. Das CD4-Molekül befindet sich auch auf Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen, die allerdings klar zu unterscheiden sind, da sie CD3<sup>-</sup> sind [17]. Der Quotient zwischen CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Zellen liegt physiologischerweise bei 1 [17].

Im Unterschied zu B-Zellen erkennen T-Zellen keine nativen Antigene, wie zum Beispiel ein Oberflächenmolekül eines kompletten Bakteriums, sondern nur Antigene, die von anderen Zellen des Immunsystems präsentiert werden. Diese Zellen nennt man Antigen präsentierende Zellen [18]. Zur Gruppe der Antigen präsentierenden Zellen gehören dendritische Zellen und Langerhanszellen der Haut, außerdem aber auch B-Zellen und aktivierte Makrophagen [17]. Zellen aller Säugetiere besitzen charakteristische Major Histocompatibility Complex (MHC)-Moleküle. Beim Menschen nennt man sie auch Human Leukocyte Antigen (HLA) [18]. Es gibt zwei verschiedene MHC-Klassen:

MHC-Klasse-I befindet sich auf allen kernhaltigen Zellen des Körpers [17]. Sie präsentieren Proteine, die in der Zelle produziert wurden, nach außen. CD8<sup>+</sup> T-Zellen binden an Zellen, indem CD8 als Co-Rezeptor des T-Zell-Rezeptors mit MHC-I bindet und die Bindung stabilisiert. CD8 wirkt dabei auch co-stimulierend auf die T-Zelle [17]. Erkennt die T-Zelle das präsentierte Peptidfragment auf dem MHC-I-Molekül als fremd, wird die Zelle zerstört, weshalb CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch zytotoxische oder Killer-Zellen genannt werden [18]. Durch diesen Mechanismus können zytotoxische T-Zellen intrazelluläre Erreger, wie zum Beispiel Viren, bekämpfen. Sie zerstören aber nicht nur infizierte körpereigene Zellen, sondern auch entartete [17]. Da Tumorzellen eine veränderte Proteinsynthese aufweisen, werden sie über MHC-I-Moleküle auffällig und als fremd erkannt. Daher spielen zytotoxische T-Zellen gerade in der Krebsbekämpfung eine wichtige Rolle [18].

MHC-II-Moleküle befinden sich nur auf Antigen präsentierenden Zellen [17]. Diese präsentieren damit keine zelleigenen Peptidfragmente, sondern Teile extrazellulärer Erreger, die sie aufgenommen haben. CD4<sup>+</sup> T-Zellen binden an Antigen präsentierende Zellen während CD4 an MHC-II-Molekülen wieder als Co-Rezeptor des TCR und Co-Stimulator der T-Zelle wirkt [18].

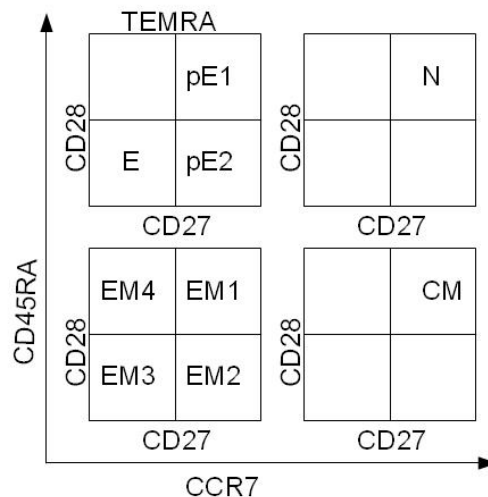
Die durch den Antigenkontakt stimulierte T-Zelle aktiviert wiederum Antigen prä-

sentierende Zellen, weshalb sie auch T-Helfer-Zelle genannt wird. Man unterscheidet außerdem T-H1-Zellen - Sie produzieren Zytokine, IL-2 und Interferon- $\gamma$  und stimulieren die zellvermittelte Immunabwehr - und T-H2-Zellen, die IL-4 und -5 produzieren und die humorale Immunabwehr regulieren [18]. T-Zellen spielen damit eine wichtige Rolle in der Abwehr von Infektionen (v.a. Pilze, Viren, Mykobakterien), der Tumorbekämpfung, bei Allergien vom verzögerten Typ und der Transplantationsimmunität [21].

## Reifestadien

T-Zellen durchlaufen verschiedene Differenzierungsstadien und entwickeln sich von naiven T-Zellen zu verschiedenen Effektor- und Gedächtniszellen [22]. Es handelt sich dabei allerdings nicht um eine Abfolge einzelner T-Zell-Populationen, sondern viel mehr um eine dynamische Entwicklung, bei der sich verschiedene Antikörper in einer gewissen Reihenfolge ausprägen [23] [24]. Es gibt verschiedene Modelle der T-Zell-Klassifizierung, wobei das im Folgenden präsentierte das am weitesten akzeptierte ist [25] [23]. Dieses Differenzierungsschema beinhaltet die folgende Abfolge [23] (vgl. Tab. 3.7):

$N \rightarrow CM \rightarrow EM1 \rightarrow EM2 \rightarrow pE1 \rightarrow pE2 \rightarrow EM4 \rightarrow EM3 \rightarrow E$



**Abbildung 1.4:** Diagramm der T-Zell-Reifestadien. Diese Übersicht zeigt die Exprimierung der vier Marker: CD45RA, CCR7 (CD197), CD27, CD28. N: naive T-Zellen; CM: Central Memory T-Zellen; EM (1-4): Effektor Memory T-Zellen; pE (1-2): pro Effektor T-Zellen; E: Effektor T-Zellen. pE1, pE2 und E werden als TEMRA zusammengefasst. (Eigene Darstellung nach [26])

Unterschieden werden zunächst vier verschiedene Stadien, die anhand von zwei charakteristischen Markern identifiziert werden können: CCR7 und CD45RA [23] [25]. Die vier

Stadien sind definiert als: Naive (N) T-Zellen  $CCR7^+ CD45RA^+$ , Central Memory (CM) T-Zellen  $CCR7^+ CD45RA^-$ , Effector Memory (EM) T-Zellen  $CCR7^- CD45RA^-$  und enddifferenzierte T-Zellen (TEMRA)  $CCR7^- CD45RA^+$  [25] (vgl. Abb. 1.4).

CD45RA ist eine Isoform des Panleukozytenmarkers CD45 [17]. CCR7, auch CD197 genannt, gehört zur Familie der Chemokinrezeptoren [26]. Er ist an der Steuerung der Lymphozytenzirkulation aus dem peripheren Blut in sekundäres lymphatisches Gewebe, wie Lymphknoten, beteiligt [26]. Daher sind die  $CCR7^+$  N und CM T-Zellen dadurch charakterisiert, dass sie sich wiederholt durch den Lymphknoten bewegen und dabei auf Antigen präsentierende Zellen treffen [26]. Reifere T-Zellen, wie EM und TEMRA, hingegen regulieren CCR7 herab und sind in der Lage, in nicht lymphatisches, peripheres Gewebe einzuwandern [26].  $CCR7^+$  Zellen befinden sich noch in der proliferativen Phase, während  $CCR7^-$  Zellen funktionell reifen [27].

Trotz dieser Charakterisierung ist zu beobachten, dass die Effektorzellen (EM und TEMRA) sehr heterogene Gruppen sind [26]. Diese Heterogenität kann durch die co-stimulatorischen Rezeptoren CD27 und CD28 weiter unterteilt und besser beschrieben werden (vgl. Abb. 1.4) [26] [23] [22]. CD27 ist TNF-Rezeptor und CD28 gehört, wie Cytotoxic-T-lymphocyte-Antigen (CTLA)4, zu den B7-Rezeptoren [23]. All diese Rezeptoren spielen eine Rolle bei der Aktivierung, Proliferation, Zytokinproduktion und Bewegung in Lymphknoten von T-Zellen [25].

Naive T-Zellen werden im Thymus produziert, hatten noch keinen Antigenkontakt [24] und sind für alle vier Marker positiv [23]. Antigenkontakt führt zu zunehmender Differenzierung, die mit Verlust an CD27, CD28 und CCR7 einher geht [25] [26], bei gleichzeitiger Zunahme an zytotoxischen Faktoren wie Perforin [28] [27] [22].

CM ist immer noch doppelt positiv für CD27 und CD28 (vgl. Abb. 1.4) [23]. Diese Gedächtniszellen unterscheiden sich von naiven durch den Verlust von CD45RA [26] und darin, dass sie schon Antigenkontakt hatten [24].

Effektor Memory T-Zellen (EM:  $CCR7^- CD45RA^-$ ) lassen sich anhand von CD27 und CD28 in EM1, EM2, EM3 und EM4 unterteilen (vgl. Abb. 1.4) [23]. Sie zeigen zunehmende lytische Funktion und Zytokinproduktion [26].

EM1 ist sowohl in seiner Funktion als Gedächtniszelle als auch in seinen Oberflächenmarkern (CD27 CD28 doppelt positiv) CM sehr ähnlich [26]. Außerdem verfügen sie genauso über eine hohe Replikations- und Telomeraseaktivität [26]. Am weitesten differenziert ist EM3 [23]. Es ist für CD27 und CD28 doppelt negativ und ähnelt auch in seiner Funktion den Effektor-Zellen (E) [26]. So exprimieren sie Perforin, Granzym B, Interferon (IFN)- $\gamma$  und CD94 und besitzen starke zytolytische Aktivität [26]. Dazwischen befinden sich EM2 und EM4 [26].

Auf TEMRA Zellen wird CD45RA wieder exprimiert, während CCR7 negativ bleibt.

Durch CD27 und CD28 werden hier drei Populationen unterschieden: pE1 (pro Effektor1 Zellen CD27<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup>), pE2 (pro Effektor2 Zellen CD27<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup>) und E (Effektorzellen CD27<sup>-</sup> CD28<sup>-</sup>) (vgl. Abb. 1.4) [23]. Wie EM, nur in stärkerem Ausmaß, schütten sie IFN- $\gamma$  aus und haben antigenspezifische Effektorfunktionen wie Zytolyse [24]. Das Endstadium stellen Effektor T-Zellen (E) dar, die nicht mehr in der Lage sind zu proliferieren [23].

Dieses Differenzierungsschema wurde an CD8<sup>+</sup> T-Zellen bisher besser erforscht, kann aber auch auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen angewendet werden [25] [23].

### **Regulatorische T-Zellen**

Verschiedene regulatorische T-Zelltypen sind bekannt. Neben CD8<sup>+</sup> regulatorischen Zellen, TR1-Zellen und Typ 3 T-Helferzellen zählen NKT-Zellen (vgl. 1.2.5) und CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-reg-Zellen zu den regulatorischen T-Zellen [29]. In der vorliegenden Arbeit sind im Folgenden CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-reg-Zellen gemeint, wenn von regulatorischen T-Zellen (T-reg-Zellen) die Sprache ist.

T-reg-Zellen regulieren die Immunantwort und unterdrücken die Aktivität selbstreaktiver T-Zellen [30]. Eine Unterfunktion führt somit zu Autoimmunität, eine Überfunktion zu Immunsuppression und Tumorentwicklung [31]. Daher spielen T-reg-Zellen eine bedeutende Rolle bei Autoimmunerkrankungen, Transplantationen, Infektionen, Allergien und Tumorummunität [32]. Da viele tumorassoziierte Antigene Selbstantigene sind, die von Tumoren oder spezifischen Geweben überexprimiert werden, wie das Glykoprotein 100 (gp100) beim malignen Melanom, spielen hier gerade T-reg-Zellen eine wichtige Rolle bei der Limitierung der Immunantwort gegen diese Zielzellen [33].

T-reg-Zellen unterdrücken die Immunantwort gegen Malignome durch verschiedene Mechanismen, die einzeln oder kombiniert auftreten. Sie wirken durch direkte Kontakt abhängige oder unabhängige Suppression der Effektor-T-Zellfunktion [33]. Es wird zum Beispiel angenommen, dass der IL-2-Rezeptor CD25 so viel Menge an IL-2 bindet, so dass die CD25<sup>+</sup> T-reg-Zellen als "IL-2-Becken" das meiste IL-2 einsaugen [33]. Dadurch verhindern sie die Expansion von antigenaktivierten T-Zellen und induzieren schlussendlich die Apoptose von zytotoxischen Effektor-T-Zellen [34]. Außerdem nutzen T-reg-Zellen Mediatoren der Zytolyse wie Granzyme und Perforine, um direkt Effektor-T-Zellen zu eliminieren, und setzen Adenosin, einen inhibitorischen Botenstoff, frei, der Effektor-T-Zellen in ihrer Funktion hemmt [33]. Weitere Mechanismen der Immunsuppression durch T-reg-Zellen sind die Unterdrückung antigenspezifischer Reifung naiver T-Zellen und die Modulation der Funktion Antigen präsentierender Zellen [33].

T-reg-Zellen induzieren über CTLA-4 die Expression der Indoleamin 2,3-Dioxygenase dendritischer Zellen. IDO<sup>+</sup> dendritische Zellen wiederum aktivieren T-reg-Zellen [35]. Durch diese positive Feedbackschleife zwischen T-reg-Zellen und dendritischen Zellen



wird eine Tumorumgebung geschaffen, die zu Tumorprogression [35] und durch den Mangel an funktionstüchtigen dendritischen, Antigen präsentierenden Zellen auch zu ineffizienter Reifung von Effektor-T-Zellen führt [33]. Somit wirken T-reg-Zellen sowohl in der Priming- als auch in der Effektorphase der Immunantwort suppressiv [30].

Aber T-reg-Zellen regulieren nicht nur die T-Zellantwort. Es konnte gezeigt werden, dass T-reg-Zellen über den NKG2D Signalweg (vgl. 1.2.6) *in vitro* und *in vivo* direkt auf NK-Zellen wirken [30]. Damit supprimieren sie die NK-Zell-Zytotoxizität und unterdrücken den wichtigen Mechanismus der NK-Zell-vermittelten Tumorbekämpfung [30]. Außerdem vermitteln T-reg-Zellen über direkten Zellkontakt eine erhöhte Apoptoserate von B-Zellen und supprimieren dadurch signifikant die B-Zell-Proliferation und töten vor allem Antigen präsentierende B-Zellen [36]. Neben der immunsuppressiven Wirkung der T-reg-Zellen auf T-, NK- und B-Zellen [31], die Malignomen Raum verschafft, unterstützen sie auch signifikant die Tumorangio-genese [29].

Das immunsuppressive IL-10 fördert einerseits die Differenzierung der T-reg-Zellen und hemmt andererseits die Funktion dendritischer Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass IL-10 in Tumoren zu einer Erhöhung der T-reg-Zellen und einer Reduzierung dendritischer Zellen führt [35]. Neben IL-10 werden T-reg-Zellen auch durch TGF- $\beta$  aktiviert [34]. Diese Zytokine werden von Tumorzellen, Makrophagen, dendritischen Zellen und aktivierten T-reg-Zellen selbst produziert [33].

Diese natürlichen Fähigkeiten machen T-reg-Zellen zu attraktiven Instrumenten der Immuntherapie [31]. Die Manipulation oder Reduzierung regulatorischer T-Zellen könnte eine effektive Immuntherapie für Krebspatienten darstellen [32].

Es gibt zwei verschiedene T-reg-Zellgruppen, natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen (nT-reg-Zellen) und induzierte regulatorische T-Zellen (iT-reg-Zellen) [32]. nT-reg-Zellen reifen im Thymus, stammen von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen ab und besitzen einen diversen T-Zell-Rezeptor [33]. Sie machen 5-10 % aller peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus [32].

iT-reg-Zellen sind, wenn sie den Thymus verlassen, noch keine T-reg-Zellen, sondern erwerben erst in der Peripherie einen suppressiven Phänotyp, nachdem sie von Antigenen, IL-2 und TGF- $\beta$  stimuliert wurden [33] [34]. Im Unterschied zu nT-reg-Zellen, benötigen sie diese weitere Differenzierung [33]. iT-reg-Zellen können wiederum in eine Population, die immer CD25 und FoxP3 exprimiert, und eine Population, die FoxP3 nur bei Stimulation hochreguliert und viele immunsuppressive Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  freisetzt, unterteilt werden [33].

Bei tumorassoziierten T-reg-Zellen handelt es sich um natürliche und induzierte T-reg-Zellen [33]. Man geht allerdings davon aus, dass nT-reg-Zellen eher vor Autoimmunität schützen, während iT-reg-Zellen durch spezifischen Antigenkontakt eher tumorassoziiert

sind [33]. Da es keine eindeutigen Oberflächenmarker zur Unterscheidung natürlicher und induzierter T-reg-Zellen gibt, ist die Forschung an T-reg-Zellen diesbezüglich nicht immer eindeutig [33].

### 1.2.5 NKT-Zellen

NKT-Zellen haben sowohl mit T-Zellen als auch mit NK-Zellen gemeinsame Funktionen und Rezeptoren [37]. Sie besitzen einen T-Zell-Rezeptor [38], der Glykoproteine erkennt, wenn sie von Antigen präsentierenden Zellen - vor allem dendritischen Zellen - auf CD1d, einem MHC-I-Molekül, präsentiert werden [39]. Damit sind NKT-Zellen CD3<sup>+</sup>. Außerdem leiten sie sich von Lymphokin-aktivierten (v.a. IL-2) T-Zellen ab [40] und durchlaufen sie eine positive Selektion im Thymus [37]. Damit gehören NKT-Zellen zur Gruppe der regulatorischen T-Zellen.

Da sie allerdings auch CD56 und CD16 an ihrer Oberfläche exprimieren [40], zählen sie auch zu den NK-Zellen. Sie sind mit MHC-I unabhängiger Zytotoxizität an der unspezifischen Immunantwort beteiligt [40] und sind in der Lage, ohne Voraktivierung unmittelbar Zytokine auszuschütten. Diese schnelle Effektorfunktion und das fehlende immunologische Gedächtnis zeichnet sie als Zellen der unspezifischen Abwehr aus [37].

Da NKT-Zellen sowohl in der Regulation der T- und B-Zellen als auch bei der Steuerung der unspezifischen Abwehr eine wichtige Rolle spielen [41], bilden sie mit dieser immunmodulatorischen Funktion eine einzigartige Brücke zwischen spezifischem und unspezifischem Immunsystem [42].

NKT-Zellen produzieren IFN- $\gamma$  und aktivieren damit NK- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen [42]. Somit aktivieren NKT-Zellen mit einem Zytokin beide Arme des Immunsystems und greifen über die entsprechenden Zielzellen MHC-I positive wie negative Tumorzellen an [43]. Die Stimulation von NKT-Zellen führt auch zur Aktivierung einer Reihe anderer Zelltypen inklusive dendritischer Zellen und B-Zellen [41]. Auch IL-4, Perforine, Granzyme und FasL werden von NKT-Zellen ausgeschüttet und haben direkte zytolytische und zytotoxische Effekte auf Tumorzellen [38]. Damit wirken NKT-Zellen nicht nur immunregulatorisch, sondern auch protektiv [43] und bieten therapeutisches Potential für die Tumorthherapie [37].

Es gibt zwei Gruppen von NKT-Zellen. Typ 1 sind invariant NKT-Zellen (iNKT), die mit den Va24-Ja18 und Vb11 Ketten [41] des T-Zell-Rezeptors einen Universalrezeptor besitzen, der für alle Individuen identisch ist [37]. Diese Zellen haben über die Produktion von IFN- $\gamma$  die stärkere Wirkung gegen Tumore [37], induzieren die Reifung dendritischer Zellen [38] und sind bislang auch besser erforscht. Typ 2 NKT-Zellen, auch non-iNKT, besitzen ein größeres Repertoire an TCR und spielen eine suppressive Rolle bei der Regulation von Tumorimmunität [41].

### 1.2.6 NK-Zellen

NK-Zellen stammen von den selben Progenitorzellen wie T-Zellen [17]. Sie entwickeln sich im Knochenmark, zirkulieren im Blut und können in Lymphknoten und der Milz gefunden werden. Durch Chemokine werden sie in Entzündungsherde gelockt [44]. 10-15% der mononukleären Zellen im Blut sind NK-Zellen [44], im Lymphknoten sind es nur 1-5% der mononukleären Zellen [45].

NK-Zellen steuern die unspezifische Abwehr des Körpers [44]. Außerdem haben sie die Fähigkeit, von Viren befallene und mutierte Körperzellen, wie Tumorzellen, anzugreifen und zu zerstören, während sie intakte körpereigene Zellen nicht angreifen [19]. Diese Unterscheidung erfolgt dabei ähnlich wie bei CD8<sup>+</sup> T-Killer-Zellen über MHC-I-Moleküle, allerdings unspezifisch anhand der Dichte der MHC-I-Moleküle an der Zelloberfläche [18]. MHC-I negative Zellen werden unabhängig von einer Voraktivierung der NK-Zellen lysiert [44].

NK-Zellen besitzen sowohl inhibierende als auch aktivierende Rezeptoren. Bei inhibierenden Rezeptoren bestehen hauptsächlich zwei Gruppen: Erstens Killer Ig like receptors (KIR), die an MHC-I Moleküle binden; zweitens CD94-NKG2A/B, zwei Isoformen von CD94, die HLA-E erkennen [44]. Alle NK Zellen besitzen mindestens einen inhibitorischen Rezeptor, um Autoimmunität zu verhindern. [46]

Aktivierende Rezeptoren sind zum Beispiel CD94-NKG2D, eine weitere Isoform des CD94-Moleküls, das auch an HLA-E bindet, dann aber aktivierend wirkt [44]. Dieser Rezeptor spielt gerade in der Tumorbekämpfung eine große Rolle und ist bei Patienten mit metastasiertem malignem Melanom auf NK-Zellen des peripheren Blutes herab reguliert [47], obwohl er gerade für die Erkennung von Tumorzellen wichtig ist [46]. Ein weiteres Beispiel für einen aktivierenden Rezeptor ist CD16 (Fc $\gamma$ -RIIIA), der in unseren Messungen auch bestimmt wurde. Er bindet an den Fc-Teil von IgG, wodurch es zu Opsonierung und antikörperabhängiger Zytotoxizität kommt [44].

Somit gibt es verschiedene aktivierende Faktoren. Die wichtigsten sind: MHC-I negative Zellen, Bindung mit IgG, verschiedene virale und bakterielle Produkte und viele verschiedene Zytokine. Zu den wichtigsten Zytokinen gehören IL, IFN und Chemokine, über die dendritische Zellen, die aus der Peripherie in Lymphknoten einwandern, mit NK-Zellen Kontakt aufnehmen und diese aktivieren [44].

Zytokine aktivieren NK-Zellen zu lymphokine-activated killer cells (LAK), die dann proliferieren, wiederum Zytokine produzieren und ausschütten, wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL), Fas ligand (FasL), Perforine und Granzyme. Diese führen bei Zielzellen zu Apoptose [44].

Anhand von CD56 und CD16 lassen sich 5 NK-Zell-Subpopulationen unterscheiden [45]. CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> machen im peripheren Blut 5-7% der NK-Zellen aus, CD56<sup>bright</sup>

CD16<sup>dim</sup> 3-5% [45]. Nach Michael A. Caligiuri können diese beiden Subpopulationen auch als eine CD56<sup>bright</sup>-Population zusammengefasst werden [48] [45]. Induziert wird diese Gruppe durch IL-15 [44]. Diese Zellen sind sehr zytokinsensibel. Werden sie durch diese aktiviert, vermehren sich stark und produzieren Zytokine [49].

CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>-</sup> NK-Zellen sind eine Minorität in Gesunden. CD56<sup>-</sup> CD16<sup>bright</sup> sind bei HIV Infizierten in großer Zahl vorhanden, wenn auch funktionsuntüchtig, kommen ansonsten aber kaum vor [45].

Die große Mehrheit im peripheren Blut mit 90% sind CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup> [45]. Diese Zellen besitzen das größere zytotoxische Potential und werden vor allem durch verminderte MHC-I-Expression aktiviert [49]. Dadurch gewinnen sie in der Tumorbekämpfung eine besondere Bedeutung, da Tumorzellen oft eine geringere MHC-I-Molekül-Dichte aufweisen. IL-21 induziert die zytotoxischen CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> NK-Zellen[44].

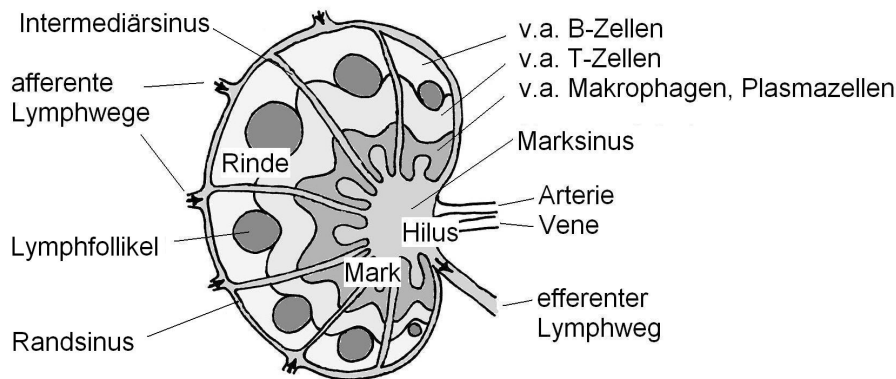
Nach bisherigem Forschungsstand sind CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen die unreiferen Vorläuferzellen, die aus dem Knochenmark über das Blut in Lymphknoten einwandern. Sie haben als unreifere Vorstufen noch keine KIR, kein CD16 und somit keine zytotoxische Aktivität. In Lymphknoten entwickeln sie sich dann zu CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup> NK-Zellen [45].

In Lymphknoten verhält sich das Vorkommen der NK-Zellsubpopulationen spiegelbildlich zum peripheren Blut. Hier sind 75-95% der NK-Zellen CD56<sup>bright</sup> und nur ein kleiner Anteil CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup> [45].

### 1.2.7 Aufbau und Funktion eines Lymphknotens

In das Lymphgefäßsystem sind immer wieder Lymphknoten als Filterstationen eingeschaltet. Die Lymphe fließt über mehrere afferente Gefäße in den Lymphknoten und verlässt ihn über einen oder wenige efferente Lymphwege, die sich wie die Blutgefäße am Hilus des Lymphknotens befinden (vgl. Abb. 1.5) [50]. Die Lymphe fließt durch den Randsinus über den Intermediärsinus in den Marksinus, um dann den Lymphknoten wieder zu verlassen [50]. Die Sinuswände bieten eine sehr große Oberfläche, was zu einem langsamen Fluss führt, und besitzen eine lückenhafte Auskleidung. Freie Zellen können so die Wände in beide Richtungen durchwandern [50].

Das Parenchym gliedert sich in drei Bereiche (vgl. Abb. 1.5). Die Rinde repräsentiert die B-Zone mit Lymphfollikeln. Follikel sind eine Ansammlung von B-Zellen und folliculären dendritischen Zellen [50]. Eine von einem passenden Antigen aktivierte B-Zelle bindet an eine durch eine Antigen präsentierende Zelle aktivierte T-Helfer-Zelle, wodurch sich die beiden wiederum gegenseitig aktivieren [50]. Nun wandert die B-Zelle in den Lymphfollikel ein, der dadurch zum Keimzentrum wird. Man nennt ihn nun nicht mehr Primär- sondern Sekundärfollikel [50]. Dieser B-Zell-Klon wird nun hier mit positiver und negativer Selektion proliferieren und sowohl Plasmazellen, als auch B-Gedächtniszellen



**Abbildung 1.5:** Aufbau eines Lymphknotens. (Eigene Darstellung nach [50])

produzieren. Diese verlassen wiederum den Follikel [50].

Parakortikal liegt die T-Zone. In ihr haben interdigitierende dendritische Zellen eine funktionell wichtige Bedeutung. Sie gehören zu den wirksamsten Antigen präsentierenden Zellen und aktivieren durch die Antigenpräsentation vor allem naive T-Zellen [50]. In diesem Bereich ist der Austausch zwischen dem Blut- und dem Lymphgefäßsystem dank hoch-endothelialer Venolen besonders groß [50]. Somit ist die T-Zone der Ort, an dem T-Zellen des Blutes in besonderem Maße mit Antigen präsentierenden Zellen z.B. aus dem Gebiet eines Primärtumors dessen Lymphe in diesen Lymphknoten drainiert in Berührung kommen [50]. Im Parakortex der Lymphknoten befinden sich außerdem NK-Zellen [15]. Sie sind dort in tieferen kortikalen Einheiten eingeschlossen [51].

Der dritte Bereich sind die Markstränge, in denen sich vor allem Plasmazellen und Makrophagen befinden [50].

### 1.3 Fragestellung

Das maligne Melanom gehört aufgrund seiner frühzeitigen Metastasierung und einer Letalität von 20-30% zu den besonders bösartigen Tumoren [1]. In den letzten Jahrzehnten gewinnt das Melanom als der Tumor mit der am schnellsten steigenden Inzidenz an Bedeutung, vor allem angesichts des großen Verlusts an Lebensqualität und -jahren der am Melanom Erkrankten [6].

Die Metastasierung erfolgt früh auf lymphatischem Weg in Lymphknoten des regionalen Lymphabflussgebietes. Diese Lymphknotenmetastasen sind zwar nicht letal, können aber Quelle für Fernmetastasen auf dem Blutweg sein [10]. Organmetastasen führen wiederum häufig zu potentiell lebensbedrohlichen Einschränkungen der Organfunktion und sind die häufigste tumorassoziierte Todesursache [10].

Gleichzeitig zählt das Melanom zu den Erkrankungen, die starke Auswirkungen auf das Immunsystem ausüben [16]. Es sind bereits viele melanomspezifische tumorassoziierte Antigene bekannt (vgl. 1.1.8). Trotz melanomspezifischer Antigene, die von verschiedenen Lymphozyten erkannt werden, und zahlreicher Mechanismen der Tumorbekämpfung scheint das Immunsystem nicht in der Lage zu sein, das maligne Melanom erfolgreich zu bekämpfen, und scheint es Nischen zu geben, wo sich Melanozyten vor der Immunantwort verstecken können [16]. Auch wurden bereits verschiedene Strategien der Immuntherapie verfolgt, ohne durchschlagende Erfolge zu bringen [52].

WLK sind der Ort initialer Tumormetastasen und haben gleichzeitig in der Lymphozytenprägung und -reifung wichtige immunologische Funktion [53]. An dieser physiologischen Schnittstelle von Tumor und Immunsystem haben Tumore in besonderem Maße die Möglichkeit das Immunsystem zu beeinflussen. So haben WLK in der Tumorbekämpfung zwar einerseits eine Barrierefunktion, da sie zuerst von Lymphe des Primärtumors erreicht werden, andererseits scheinen sie immunsupprimiert zu sein und diese Funktion nicht adäquat ausführen zu können [10]. Daher sind WLK ideal für die Forschung tumorinduzierter Immunmodulation.

Um der Frage näher zu kommen, wie es zu dieser funktionalen Kompromittierung des Immunsystems kommt und worin sie genau besteht, möchten wir Lymphozytenpopulationen in WLK charakterisieren und bestimmen, was sich in den verschiedenen Populationen verändert, wenn Melanozyten in den Lymphknoten eingewandert sind.

Es gilt außerdem herauszufinden, ob diese potentiellen Veränderungen schon bei einzelnen Melanozyten ( $\leq 100$  Melanozyten pro Million Zellen) auftreten oder erst bei stärkerem melanozytärem Befall. Dies könnte Rückschlüsse darauf zulassen, ob entsprechende Veränderungen schon vor der Metastasierung beginnen oder erst danach.

Uns interessiert dabei ein Querschnitt durch die gesamte zelluläre Immunantwort, da die verschiedenen Zellen eng zusammen arbeiten und voneinander abhängig sind. Daher möchten wir B-, T- und NK-Zellen mit verschiedenen Subpopulationen untersuchen.

B-Zellen wurden bisher weniger intensiv untersucht als T-Zellen, vermutlich da man gerade bei zytotoxischen T-Zellen einen größeren Effekt auf Tumorerkrankungen erwartet. Um aber ein Gesamtbild zu erhalten, möchten wir auch die Gesamtzahl der B-Zellen genauer untersuchen. Bei der Frage nach supprimierter Immunfunktion spielen regulatorische T-Zellen (T-Suppressorzellen) eine wichtige Rolle. Da ihre Funktion auch nach vielseitiger Forschung immer noch kontrovers diskutiert wird [53], möchten wir die Veränderungen in diese Population auch auf statistische Signifikanz prüfen. NK-Zellen bieten uns einen Einblick in unspezifische Abwehr. Um an dieser Stelle Veränderungen mit in Betracht zu ziehen, untersuchen wir auch die Gesamtzahl der NK-Zellen mit großem Interesse.

## 2 Proben und Materialien

### 2.1 Herkunft der Proben und Bestimmung der Melanomzellichte

Bei den untersuchten Patientenproben handelt es sich um WLK von Patienten mit malignem Melanom aller Melanotypen, die in der Universitäts-Hautklinik in Tübingen operiert wurden. Die Patienten waren über den Eingriff und die Verwendung des Materials für Forschungszwecke aufgeklärt, hatten ihr Einverständnis erklärt und ein positives Votum der Ethikkommission lag vor.

Zur Entwicklung der Antikörper-Panel wurden von September 2009 bis Januar 2010 Patientenproben verwendet. Im Zeitraum von September 2009 bis November 2011 konnten 84 Lymphknoten von 64 Patienten gemessen werden.

Eine der Proben wurde als Kontrolle bei einer Venenstrippingoperation entnommen und stammt somit von einem Patienten, der nicht am malignen Melanom erkrankt ist (vgl. 3.3).

Die WLK werden zur Routinediagnostik bei allen Patienten mit einer Tumordicke des Primärtumors größer als ein Millimeter entnommen, um auf Metastasen hin untersucht zu werden (vgl. 1.1.6). Bei der Routinediagnostik wird die Hälfte des WLK nach der Standard Histopathologie in HE-Färbung und immunhistochemischer Schnittdiagnostik auf Metastasen untersucht. Die andere Hälfte wird disaggregiert und immunzytochemisch angefärbt, sodass die HMB45<sup>+</sup> Melanomzellen ausgezählt werden können [14]. Um den Befund zu dokumentieren, werden ohne Kenntnis des klinischen Stadiums des Patienten die Anzahl positiver Zellen pro Million Lymphozyten ausgezählt. Hierbei wird zwischen wahrscheinlichen und sicheren Tumorzellen unterschieden. Nur wenn es mindestens eine sichere Tumorzelle gibt, werden auch die wahrscheinlichen als HMB45<sup>+</sup> gewertet. Festgehalten wird schließlich die MZD als HMB45<sup>+</sup> Zellen pro Million ausgezählter Zellen.

Wenn nach der Routinediagnostik noch Material des disaggregierten Teils des WLK übrig war, wurde dies für die vorliegende Arbeit verwendet, um die Lymphozytenpopulationen zu bestimmen. Die gesamten Untersuchungen und Auswertungen der Lymphozytenpopulationen fanden ohne Kenntnis der MZD statt.

## 2.2 Materialien

### 2.2.1 Allgemeine Geräte

Gerät	Hersteller
Durchflusszytometer LSRII	Becton Dickinson
Cell Counter Advia 120	Bayer
Gefrierschrank (-20°C)	Bosch
Kühlschrank (+4°C)	Liebherr
Verstellbare Pipetten	Gilson
Pipetman 10, 20, 100, 200, 1000 µl	
Accu-jet	Brand
Zentrifuge Rotixa RT	Hettich

**Tabelle 2.1:** Allgemeine Geräte

### 2.2.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
FACS- Röhrchen 5ml, Rundboden	Becton Dickinson
Zellsieb für FACS-Röhrchen	Becton Dickinson
Falcons Cellstar Tubes 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen blau 1000 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen gelb 200 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen weiß 20 µl	Eppendorf
Safe-Lock-Tubes 0,5 ml	Eppendorf

**Tabelle 2.2:** Verbrauchsmaterialien



### 2.2.3 Allgemeine Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Fetales Kälberserum (FCS), (inaktiviert, 30min bei 56°C)	PAA
Biocoll Separating Solution, Ficoll	Biochrom
Phosphat Buffered Saline (PBS)	PAA
Paraformaldehyd (PFA), Pulver	SIGMA
Bovines Serum Albumin (BSA)	SIGMA
Phosphat Buffered Serum Albumin (PBSA)	Lonza
FACS Flow, Puffer	Becton Dickinson
Rabbit Serum Cat: 10510	invitrogen

**Tabelle 2.3:** verwendete Chemikalien

### 2.2.4 Stammlösungen

#### **PBSA (PBS + BSA):**

1,76l Aqua dest.

+ 40ml Na-Azid 10% (in Aqua dest.)

+ 4g BSA

+ 200ml 10x DPBS

ca. 3 Stunden bei Raumtemperatur rühren

Lagerung: lichtgeschützt bei Raumtemperatur

#### **Paraformaldehyd (PFA) 0,5%ig:**

2g pulverisiertes PFA

in 50ml PBS gelöst bei 65°C

⇒ 4%ige PFA-Lösung

35ml PBS

+ 5ml 4%iges PFA

⇒ 0,5%ige PFA-Lösung

Lagerung: bei +4°C im Kühlschrank

## 2.2.5 Antikörper und Fluorochrome

Fluoreszenzmarkierte Antikörper	Hersteller	Lot-Nr.	Klon
CD3 – Horizon-V500	Becton Dickinson	55859	SP34-2
CD16 – AF700	Exbio	J00J	LNK16
CD19 – PE-Cy7	Beckmann Coulter	IM3628	J3119
CD25 – PB	Exbio	I11J	MEM181
CD27 – PE-Dy590	Exbio	L48J	LT27
CD38 – PerCP	Exbio	F26J	HIT2
CD45 – APC-AF750	Caltag Laboratories	01010406	MH27
CD56 – PE	Becton Dickinson	31736	MY31
CD69 – APC	Exbio	1371	FN50
CD138 – FITC	IG-Products	60561	IQP-153F

**Tabelle 2.4:** Konjugierte Antikörper, verwendet im B- und NK-Zell-Panel

Fluoreszenzmarkierte Antikörper	Hersteller	Lot-Nr.	Klon
CD3 – Horizon-V500	Becton Dickinson	55859	SP34-2
CD4 – q605	Invitrogen	880468	S3.5
CD8 – PE-Dy590	Exbio	M63J	MEM-31
CD25 – PB	Exbio	I11J	MEM181
CD27 – PE	Exbio	B43I	LT27
CD28 – FITC	Immunotech	08	Cat1236
CD45RA – PE-Dy647	Exbio	E17J	MEM-56
CD127 – APC-eFluor780	eBioscience	47-1278-42	RDR5
CD197 – PE-Cy7	Becton Dickinson	56532	Cat557648

**Tabelle 2.5:** Konjugierte Antikörper, verwendet im T-Zell-Panel

Antikörper	Hersteller	Klon
CD14	Exbio	MEM-18

**Tabelle 2.6:** verwendete unkonjugierte Monoklonale Antikörper

Fluorochrom	Hersteller	Lot-Nr.
AF350	Invitrogen	880377

**Tabelle 2.7:** verwendete unkonjugierte Fluorochrome

## 2.2.6 Beads

Beads sind Kunststoffpartikel, die anstelle von Zellen für die Kompensation genutzt werden, da sie im Vergleich zu Zellen konstantere Eigenschaften bieten, was zum Beispiel die Intensität der Fluoreszenz angeht [54].

Reagenz	Hersteller	Catalog-Nr.	Lot-Nr.
CompBeads Anti-Mouse Ig, $\kappa$	Becton Dickinson	51-90-9001229	85985
CompBeads Negative Control (FBS)	Becton Dickinson	51-90-9001291	85985
CompBeads Anti-Mouse Ig, $\kappa$	Becton Dickinson	51-9006274	75116
CompBeads Negative Control	Becton Dickinson	51-9006227	75116

**Tabelle 2.8:** Beads

## 2.2.7 EDV-Programme

Programm	Hersteller
FACSDiva	Becton Dickinson
JMP10.0.0	SAS Institute
Rumkopieren.py	Joram Berger

**Tabelle 2.9:** EDV-Programme

## **3 Methoden**

Um mögliche lokale Auswirkungen des melanozytären Befalls auf WLK zu untersuchen, wurde die Größe verschiedener Lymphozytenpopulationen (B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen und deren jeweilige Untergruppen) in den einzelnen WLK gemessen. Dazu verwendeten wir die Technik der Durchflusszytometrie).

### **3.1 Prinzip der Durchflusszytometrie**

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen bzw. andere Partikel, auf Größe, Granularität, die Expression von Oberflächenmolekülen und andere Zelleigenschaften untersucht. Dies wird mit Hilfe von Streulicht und Fluoreszenz bestimmter Farbstoffmoleküle erreicht, die, wenn sie durch Licht spezifischer Wellenlänge angeregt werden, Licht eines bestimmten Wellenlängenbereichs emittieren [55]. Sind diese Fluoreszenzfarbstoffe nun an monoklonale Antikörper gebunden, die wiederum an Antigene der zu untersuchenden Zellen binden, lassen sich an Hand der Stärke der detektierten Lichtemission Rückschlüsse auf die Expression dieses Antigens an der Zelloberfläche ziehen.

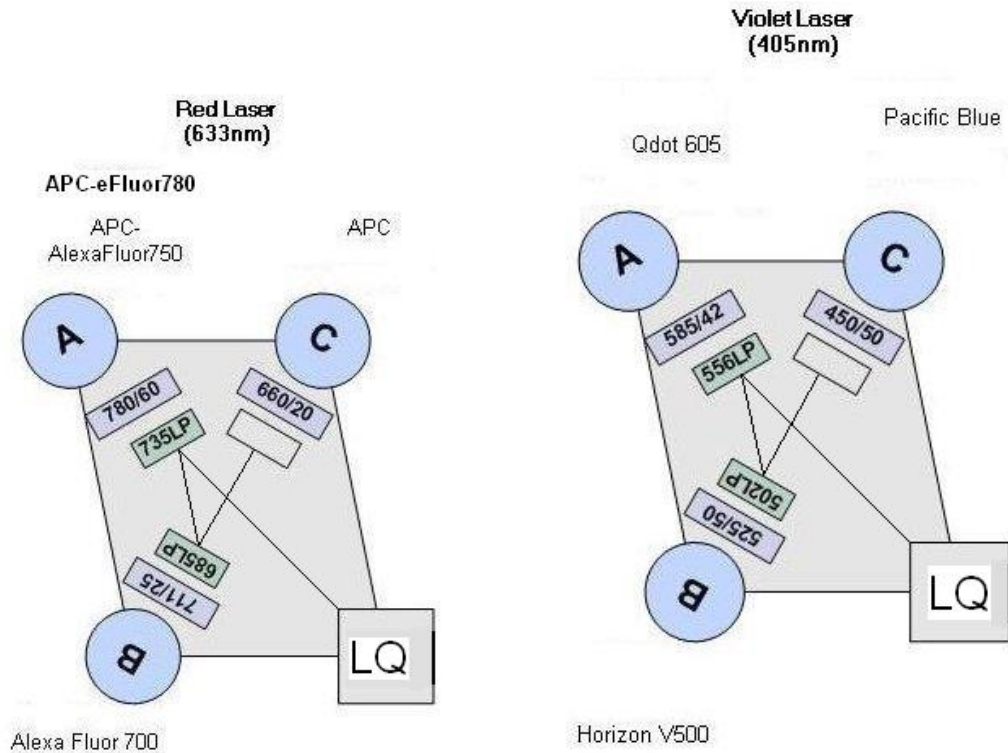
#### **Monoklonale Antikörper**

Aus einer einzelnen B-Zelle kann ein definierter Antikörperklon abgeleitet werden, der dann als monoklonal bezeichnet wird und eine hoch spezifische Affinität zu einem bestimmten Antigen an der Zelloberfläche hat [17] (vgl. 1.2.3). Im Cluster of differentiation (CD)-System sind alle bekannten Oberflächenantigene nummeriert und katalogisiert (vgl. 1.2.2). Die Antikörper, die an die jeweiligen Antigene binden, werden nach der selben Nummer bezeichnet wie die Antigene [54]. Für die durchflusszytometrische Analyse werden diese monoklonalen Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert.

#### **3.1.1 Aufbau des Messgerätes und Messtechnik**

Die zu messenden, gefärbten Zellen werden als Zellsuspension angesaugt, in isotoner Trägerflüssigkeit beschleunigt und durch hydrodynamische Fokussierung so perlschnurartig aufgereiht, dass sie einzeln die Laserquelle erreichen [55]. So wird jede Zelle einzeln durch

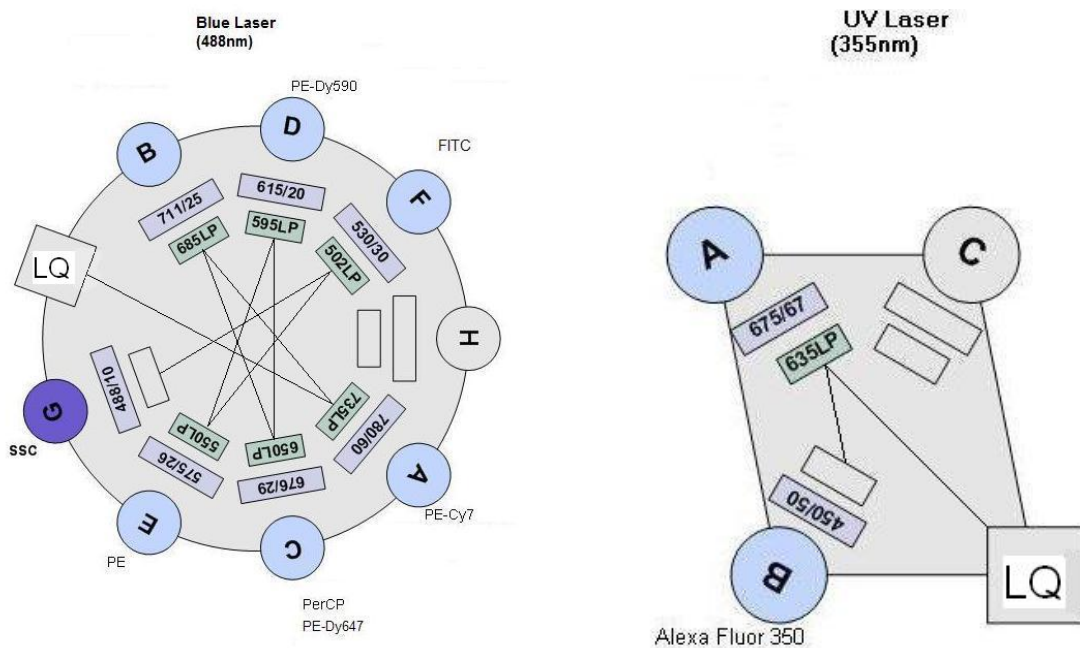
den Laser angeregt und emittiert je nach Beschaffenheit der Zelle selbst und je nach dem, welche fluoreszenzmarkierten Antikörper an die Zelle gebunden haben, Licht bestimmter Wellenlängen.



**Abbildung 3.1:** Zytometer Konfiguration des roten und violetten Lasers: Das Licht, das die Lymphknoten Disaggregations Immunzytologie (LDI) verlässt, ist nicht der Laserstrahl selbst, sondern das Licht, das von Fluorochromen emittiert wird, die vom roten, bzw. violetten, Laser angeregt wurden. Dieses Licht trifft auf den ersten LP-Filter (grün), der Licht mit längerer Wellenlänge als der angegebene Grenzwert passieren lässt. Das passierte Licht wird durch den BP-Filter (lila) gefiltert, der nur Licht einer bestimmten Wellenlänge mit einer gewissen Bandbreite durchlässt, und trifft dann auf den Detektor (A-C). Das am LP reflektierte, kurzwelligere Licht trifft auf die entsprechende Filterkombination des nächsten Detektors. Spätere Detektoren messen also immer kurzwelligeres Licht. Jeder Detektor misst bestimmte Fluorochrome, die Licht dieser bestimmten Wellenlänge aussenden.

Einerseits wird dabei das Streulicht gemessen. Dies ist nicht mit Fluoreszenz zu verwechseln. Bei der Lichtstreuung ändert das Licht nur seine Richtung, nicht aber seine Wellenlänge. Das meiste Licht wird nur um wenige Grad abgelenkt und kann somit in der Achse des einfallenden Strahls gemessen werden. Dieses Licht nennt man forward scatter (FSC); es ist ein Maß für die Größe der Zelle [55].

Das im rechten Winkel zum einfallenden Licht detektierte Licht, nennt sich side scatter (SSC). Es entsteht durch Lichtbrechung und Reflexion, die abhängig ist von der Anzahl der Membranschichten der Zelle, und ist somit ein Maß für die Granularität der Zelle [55].



**Abbildung 3.2:** Zytometer Konfiguration des blauen und UV Lasers: Das Licht, das die LQ verlässt, ist nicht der Laserstrahl selbst, sondern das Licht, das von Fluorochromen emittiert wird, die vom blauen, bzw. ultravioletten, Laser angeregt wurden. Dieses Licht trifft auf den ersten LP-Filter (grün), der Licht mit längerer Wellenlänge als der angegebene Grenzwert passieren lässt. Das passierte Licht wird durch den BP-Filter (lila) gefiltert, der nur Licht einer bestimmten Wellenlänge mit einer gewissen Bandbreite durchlässt, und trifft dann auf den Detektor (A-G bzw. A-B). Das am LP reflektierte, kurzwelligere Licht trifft auf die entsprechende Filterkombination des nächsten Detektors. Spätere Detektoren messen also immer kurzwelligeres Licht. Jeder Detektor misst bestimmte Fluorochrome, die Licht dieser bestimmten Wellenlänge aussenden.

Weitere spezifische Zelleigenschaften werden mit Hilfe der Fluoreszenz bestimmt. Um die Fluoreszenzfarbstoffe anzuregen, werden vier verschiedene Laserquellen verwendet – rot (633 nm), blau (488 nm), violett (405 nm) und ultraviolett (355nm). Mit jeder dieser Laserquellen können verschiedene Fluorochrome angeregt werden, die auch verschiedene Emissionsspektren haben. Das Emissionsspektrum eines Fluorochroms ist immer langwelliger – energetisch niedriger – als das Absorptionsspektrum. Mit dem LSR II können bis zu 14 Farben gleichzeitig gemessen werden.

Um durch ein Absorptionsspektrum noch mehr verschiedene Emissionsspektren zu erreichen, kann ein Fluorochrom auch mit einem weiteren konjugiert werden. Dann wird das erste Fluorochrom durch den Laser angeregt und gibt seine Energie an das zweite Fluorochrom weiter, welches wiederum Licht emittiert. In diesem Fall spricht man von einem Tandemfarbstoff.

Es wird also jede Zelle von diesen vier Lasern angeregt und je nach dem, wie viele der

Fluorochrome an der Zelle gebunden sind, strahlt die Zelle mehr oder weniger Licht einer bestimmten Wellenlänge aus, das detektiert werden kann.

Das emittierte Licht wird durch halbdurchlässige Filter geleitet. Zunächst durch einen LP Filter (Bsp.: LP 502), der nur Wellenlängen passieren lässt, die langwelliger als eine bestimmte Wellenlänge sind (Bsp.:  $\lambda > 502 \text{ nm}$ ), und der kurzwelligeres Licht reflektiert und zum nächsten LP-Filter sendet. Das langwellige Licht, das den LP Filter passiert hat, wird dann ein weiteres Mal gefiltert durch einen BP Filter (Bsp.: BP 630/30), der nur Licht einer bestimmten Wellenlänge durchlässt (Bsp.:  $630 \text{ nm} \pm 15 \text{ nm}$ ). Dieses Licht wird schließlich detektiert und in elektronische Signale umgewandelt, die dann an den angeschlossenen Computer zur Verarbeitung weitergeleitet werden.

Ultra Violetter Laser (355nm)		
Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
Alexa Fluor (AF)350	346nm	442nm

**Tabelle 3.1:** UV-Laser

Violetter Laser (405nm)		
Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
Pacific Blue (PB)	416nm	451nm
Horizon V500	415nm	500nm
q605 (Quantum dot 605)	300nm	605nm

**Tabelle 3.2:** Violetter Laser

Blauer Laser (488nm)		
Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	488nm	520nm
Phycoerythrin (PE)	488nm	578nm
PE-Dy590 <sup>1</sup> (Phycoerythrin an Dyomics 590)	488nm	599nm
PE-Dy647 <sup>1</sup> (Phycoerythrin an Dyomics 647)	488nm	670nm
Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP)	488nm	678nm
PE-Cy7 <sup>1</sup> (Phycoerythrin an Cyanin7)	488nm	785nm

**Tabelle 3.3:** Blauer Laser

Wir verwendeten die aus Abb. 3.1 und Abb. 3.2 zu entnehmenden Filterkombinationen. Die Fluorochrome, die für diese Arbeit verwendet wurden, sind mit ihren Emissions- und Absorptionsmaxima in Tab. 3.1, Tab. 3.2, Tab. 3.3 und Tab. 3.4 aufgeführt.

---

<sup>1</sup>Tandemfarbstoff (vgl. 3.1.1).

Fluorochrom	Roter Laser (633nm)	
	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
Allophycocyanin (APC)	640nm	660nm
AF700	702nm	723nm
APC-AF750 <sup>1</sup> (Allophycocyanin an Alexa Fluor 750)	640nm	770nm
APC-eFluor780 <sup>1</sup> (Allophycocyanin an eFluor780)	640nm	780nm

**Tabelle 3.4:** Roter Laser

### 3.1.2 Auswertung

Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgt am Computer mit dem fluorescence activated cell sorting (FACS)-Diva Programm, das die gemessenen Zellen in zweidimensionalen Diagrammen nach zwei der gemessenen Parameter aufträgt. Dadurch können Zellpopulationen aufgetrennt werden, die sich in diesen beiden Parametern unterscheiden. Legt man ein Gate um eine solche Zellpopulation, lässt sich diese in einem neuen Diagramm anzeigen und weiter auftrennen. So entsteht eine Gating-Hierarchie (vgl. Abb. 3.3 und Abb. 3.14), mit deren Hilfe einzelne Subpopulationen dargestellt werden können [56].

Ausgewertet wird die Anzahl der Zellen dieser Subpopulation in Prozent der Gesamtzellzahl oder einer in der Hierarchie höher liegenden Zellpopulation. Es kann aber auch die absolute Zellzahl angegeben werden. Die auf den beiden Achsen aufgetragenen Parameter können sowohl logarithmisch als auch bi-exponentiell angezeigt werden [57].

### 3.1.3 Kompensation

Bei der Wahl der Fluorochrome achtet man darauf, dass die Emissionsspektren der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe möglichst klar von einander getrennt sind. Dennoch wird das emittierte Licht nicht genau eine Wellenlänge aufweisen, sondern ein mehr oder weniger breites Spektrum mit einem Emissionsmaximum, das sich mit den Emissionsspektren anderer Fluorochrome teilweise überschneiden kann. Ist dies der Fall, muss der Messfehler durch eine Kompensation ausgeglichen werden [58].

Dazu werden Beads (vgl. 2.2.6) mit jeweils nur einem Farbstoff gefärbt und gemessen. Dieser Farbstoff ist nicht nur in dem für ihn vorgesehenen Kanal messbar, sondern zu gewissen Anteilen auch in anderen Kanälen. Somit weiß man, wie stark dieser Farbstoff in andere Kanäle strahlt [58]. Wie stark er in Kanälen messbar ist, in die er eigentlich nicht strahlen sollte, kann in Prozent des gesamt gemessenen Signals dieses Kanals ausgerechnet und davon abgezogen werden. Mit diesem Verfahren, Kompensation genannt, können diese Messfehler ausgeglichen werden [57].



## 3.2 Untersuchung der Lymphozyten

Was nach der Routinediagnostik von der Zellsuspension des disaggregierten Lymphknotens noch übrig ist, wird mittels durchflusszytometrischer Analyse untersucht, um den Immunstatus zu bestimmen (vgl.2.1).

Je nach dem, wie sehr die Zellen in der Probe ausflocken, wird die Suspension ein oder zwei mal gefiltert. Danach füllt man das Röhrchen mit PBSA auf und zentrifugiert es je nach Röhrchen (FACS-Röhrchen: 3min; 15ml Falcon-Tube: 5min; 50ml Falcon-Tube: 10min) mit relative Zentripetalbeschleunigung (RZB) 450 ab. Nach dem Abkippen und Resuspendieren hat man die Zellen so vorliegen, wie man sie zum Färben der Lymphozyten benötigt.

### 3.2.1 Färben der Zellen

Wir untersuchten die Lymphozyten getrennt in zwei Panel - ein Panel für B- und NK-Zellen und ein Panel für T-Zellen.

#### Konjugation eines monoklonalen Antikörpers mit einem Fluorochrom

In der Regel gibt es die monoklonalen Antikörper und Fluorochrome in schon konjugierter Form zu kaufen. CD14 – AF350 musste selbst konjugiert werden. Dazu wird zu 100µl CD14 (1µg/µl) 0,5µl AF350 (1µg/µl) gegeben. Diese Mischung muss sofort sehr gut gemischt werden und mindestens 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren.

Um die B- und NK-Zellen zu färben, werden zunächst die mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugierten Antikörper nach dem Schema in Tab. 3.5 ein Eppendorfcup pipettiert.

Fluoro- chrom	FITC	PE	PE- Dy590	PerCP	PE- Cy7	PB	V500	AF 350	APC	AF 700	APC- H7
CD	138	56	27	38	19	FMO	3	14	FMO	16	45
Menge [µl/50µl]	5	10	5	5	5		2,5	1		2	2

**Tabelle 3.5:** Pipettierschema des B- und NK-Zell-Panels

Für das T-Zell-Panel werden die Antikörper nach dem Schema in Tab. 3.6 in ein Eppendorfcup pipettiert.

Insbesondere bei den Tandemfarbstoffen, aber auch bei den anderen Fluorochromen, ist während des Pipettierens darauf zu achten, dass sie möglichst wenig Licht ausgesetzt sind, da sie sonst sehr schnell ihre Fluoreszenz verlieren. Außerdem sollten sowohl die Antikörper als auch die Zellen auf Eis gelagert werden.

### 3 Methoden

Fluorochrom	FITC	PE	PE-Dy590	PE-Dy647	PE-Cy7	PB	V500	q605	APC-eF780
CD	28	27	8	45RA	197	25	3	4	127
Menge [ $\mu$ l]/50 $\mu$ l	10	10	5	5	2	2	2,5	0,25	2,5

**Tabelle 3.6:** Pipettierschema des T-Zell-Panels

Zu den Antikörpern wird noch IgG aus Rabbit Serum pipettiert, die unspezifische Bindungen mit Antigenen auf den Zellen eingehen. Damit wird verhindert, dass überzählige Antikörper unspezifisch an Zellen binden. Zu den Antikörpern des B- und NK-Zell-Panels pipettierten wir 4 $\mu$ l IgG, zu den Antikörpern des T-Zell-Panels 2 $\mu$ l IgG.

Die Antikörper werden nun in ein FACS-Röhrchen überführt. Können mehrere Proben gleichzeitig gefärbt und gemessen werden, pipettiert man ein entsprechendes Vielfaches der Antikörper in das Eppendorfcup und verteilt die Antikörper jetzt auf jeweils ein FACS-Röhrchen pro Probe und Panel.

Zu den Antikörpern werden für das B- und NK-Zell-Panel 8,5 $\mu$ l, für das T-Zell-Panel 7,25 $\mu$ l der Zellsuspension gegeben und gut gemischt, sodass die Gesamtmenge der konjugierten Antikörper und Zellen 50 $\mu$ l beträgt.

#### **Fluorescence minus one (FMO)-Kontrolle**

Die FMO-Kontrolle betrifft nur das B- und NK-Zell-Panel.

Von den gefärbten Zellen werden 3 $\mu$ l als FMO-Kontrolle in ein weiteres FACS-Röhrchen überführt. Die FMO-Probe (fluorescence minus one) ist eine Probe, die mit allen Farben eines Panels außer einer gefärbt wird. Für diese Farbe dient die FMO-Probe als Negativkontrolle [58].

Der Rest der Probe wird mit zwei weiteren Farben, die somit FMO kontrolliert sind, gefärbt:

2 $\mu$ l CD25-PB

2,5 $\mu$ l CD69-APC

Was im Folgenden beschrieben wird, geschieht mit allen drei Röhrchen, dem Hauptröhrchen und der FMO-Kontrolle des B- und NK-Zell-Panels und dem Röhrchen des T-Zell-Panels.

Die Probe wird 10 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert.

#### **Lebend-tot-Färbung**

Anschließend wird eine Färbung mit AF350 durchgeführt. Anhand dieses Markers können bei der Auswertung nach der durchflusszytometrischen Analyse lebende von toten Zellen

unterschieden werden. Ist eine Zelle vital, wird ihre Oberfläche durch AF350 markiert. Bei toten Zellen ist die Zellwand so hyperpermeabel, dass AF350 auch intrazellulär viele Moleküle markiert, sodass diese Zellen in der Durchflusszytometrie besonders hell leuchten.

Die Färbung mit AF350 wird folgendermaßen pipettiert:

1000µl PBS auf die Probe

+ 0,7µl AF350 (Verdünnung: 1:100)

Sofort stark mischen, da die Reaktion des Reagenz nahezu exponentiell verläuft.

Danach werden die Röhren noch einmal 10min inkubiert.

Abschließend wäscht man die Probe drei mal nach folgendem Schema:

- Auffüllen des FACS-Röhrchens mit PBSA.
- 3 min abzentrifugieren mit RZB 450 und Bremse 9.
- vorsichtig abkippen.

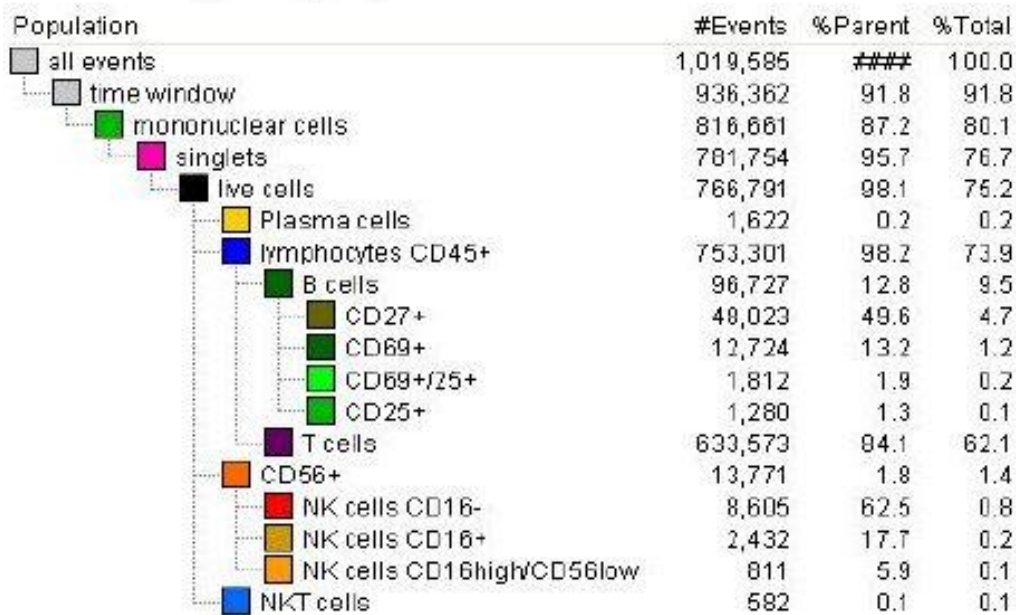
Je nach dem, wie lange es dauert, bis die Probe tatsächlich gemessen wird, kann zur Fixierung nach den Waschgängen bis zu 1000µl 0,5%iges PFA auf die gefärbten Zellen pipettiert werden.

### 3.2.2 Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse

Da die ersten Gatingsschritte bis zur Selektion der lebenden Zellen in beiden Panels die selben sind, beschreiben wir diese anhand des B- und NK-Zell-Panels für beide Panels. Die Auswertung der Messungen des B- und NK-Zell-Panels erfolgt nach der Gating-Hierarchie in Abb. 3.3.

Zunächst wurde mit dem time window auf die Zellen gategatet, die regelrecht gemessen wurden (vgl. Abb. 3.4). Hier können zum Beispiel Zellen ausgeschlossen werden, bei deren Messung es zu Laserschwankungen kam.

Diese regelhaft gemessenen Zellen lässt man sich dann in einem Diagramm mit FSC-A auf der x-Achse und SSC-A auf der y-Achse anzeigen (vgl. Abb. 3.5). Mit Hilfe dieser beiden Parameter lassen sich die Zellen nach Größe und Granularität auftrennen (vgl. 3.1.1). Im oberen Bereich des Diagramms befinden sich Granulozyten, die für unsere weiteren Untersuchungen nicht von Belang sind. An der y-Achse liegen hauptsächlich tote Zellen und andere kleine Partikel, die nicht interessieren. Deshalb setzen wir einen Schwellenwert (30.000) fest, ab welchem Zellen erst als gemessene Daten gespeichert werden. Mit Hilfe dieser beiden Parameter, Größe und Granularität, lassen sich mononukleäre Zellen als relativ klare Population abgrenzen, auf die wir, um keine wichtigen Zellen zu verlieren, recht großzügig gaten.



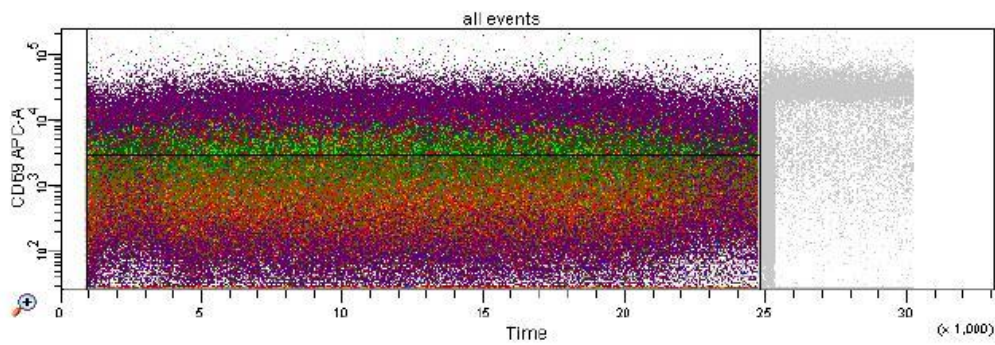
**Abbildung 3.3:** Gating-Hierarchie des B- und NK-Zell-Panels. Events: Zahl der gemessenen Zellen für diese Eigenschaften. Parent: %-Anteil der Zellen an der in der Hierarchie nächst höheren Zellpopulation. Total: %-Anteil an allen gemessenen Zellen.

Während der Messung kann es vorkommen, dass zwei Zellen zusammen kleben und in der Analyse als eine große Zelle erscheinen. Um diese Dupletten heraus zu gaten, trennen wir die mononukleären Zellen nach SSC-Height (H) und SSC-Area (A), also Höhe des Signals und Fläche, damit auch Dauer des Signals. Doppelte Zellen brauchen länger, bis sie am Laserstrahl vorbei kommen, damit ist ihr SSC-A Signal verhältnismäßig zu groß für die Höhe des Signals (SSC-H). Die Zelle liegt im Diagramm also oberhalb der sich ergebenden Diagonalen und wird durch das singlets-gate aus der folgenden Analyse ausgeschlossen (vgl. Abb. 3.6).

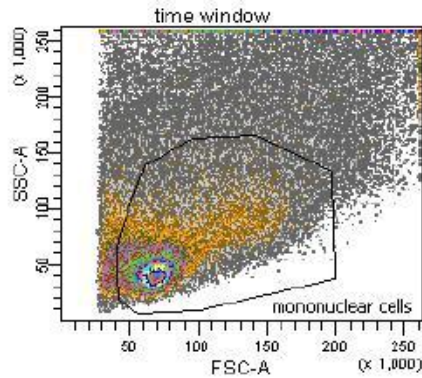
Um nur lebende Zellen in die Analyse einzuschließen, färben wir die Zellen mit Alexa-Fluor 350 an. Ein Farbstoff, der an freie Aminogruppen auf der Zelloberfläche bindet. Durch die nicht mehr intakte Zellmembran toter Zellen bindet er bei solchen auch an Substratgruppen innerhalb der Zelle, sodass tote Zellen stärker angefärbt werden als lebende.

Da wir die Zellen außerdem mit AF350 konjugiert an CD14 gefärbt haben, erscheinen auch Monozyten besonders hell und werden genau wie tote Zellen im Folgenden aus der Analyse ausgeschlossen (vgl. Abb. 3.7).

CD14 (53-55kD) wird auch Lipopolysaccharid-Rezeptor genannt und ist charakteristisch für Myelomonozyten und Makrophagen. An ihn binden bakterielle Lipopolysaccharide, die Phagozytose und Sekretion von Pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  stimulieren [17].

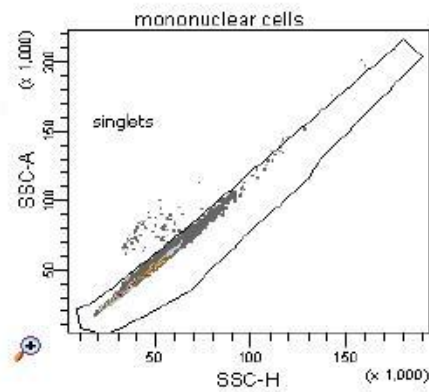


**Abbildung 3.4:** Time window. Jeder Punkt entspricht einer gemessenen Zelle. Dargestellt sind alle gemessenen Zellen (all events) aufgetragen nach einem relativ beliebigen Wert (hier CD69-APC-A) gegen die Zeit.

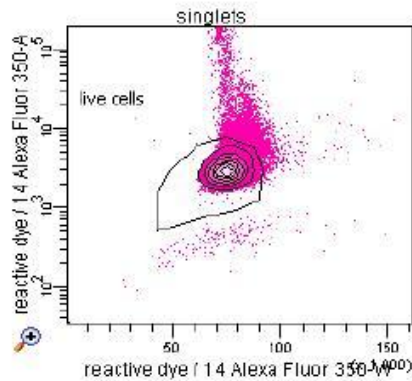


**Abbildung 3.5:** Mononuclear cells. Es werden alle Zellen, die in dem gewählten Zeitfenster gemessen wurden, angezeigt. Innerhalb des gelegten Gates liegen die mononukleären Zellen.

Nach diesen Schritten liegen vitale, lymphatische Zellen vor, deren Anteile an Plasmazellen, B-Zellen, NK-Zellen, NKT-Zellen und T-Zellen bestimmt werden sollen.



**Abbildung 3.6:** Singlets. Dargestellt sind alle mononukleären Zellen aufgetrennt nach Fläche und Höhe des side scatter Signals, das der Größe der Zelle entspricht (vgl. 3.1.1). Einzelne Zellen liegen innerhalb des gelegten Gates.

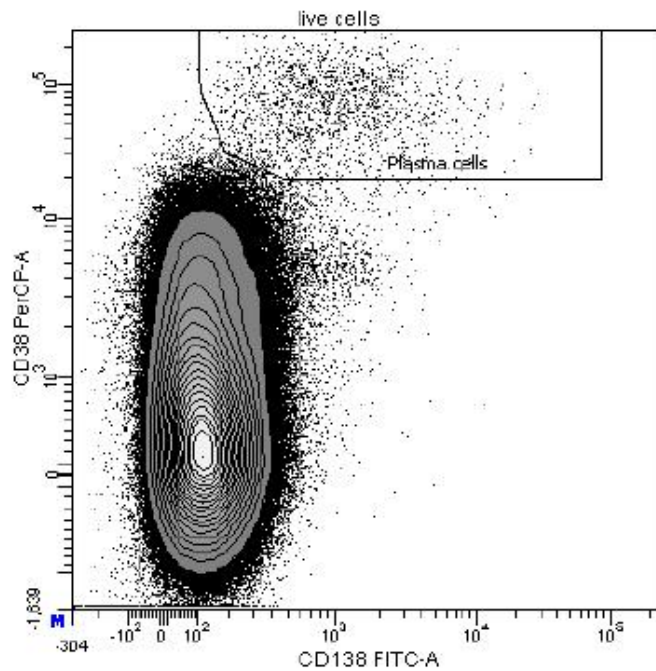


**Abbildung 3.7:** Lebende Zellen (live cells). Es werden alle einzelnen, mononukleären Zellen angezeigt, auf lebende Zellen wird gegatet. Oberhalb der lebenden Zellen sind tote Zellen und Monozyten, die bananenförmige Population unterhalb des live cell gates sind Erythrozyten.

### 3.2.3 B-Zellen

Zunächst bestimmen wir die Zahl der Plasmazellen (vgl. Abb. 3.8). CD138 wird auf B-Zellen exprimiert und bindet an Kollagen Typ I [17]. Plasmazellen exprimieren CD138. CD38 wird auf differenzierten B- und T-Lymphozyten, NK-Zellen und z.T. Monozyten als extrazellulärer Rezeptor exprimiert. Damit kann es zur Selektion naiver Zellen dienen. Der Rezeptor ist an Adhäsion und Signaltransduktion von Leukozyten beteiligt und besitzt enzymatische Aktivität im Kalziumstoffwechsel [59]. Auf Plasmazellen ist CD38 hoch positiv.

Auf nahezu allen differenzierten Leukozyten ist CD45 als Transmembranprotein mit intrazellulärer Tyrosinkinase-Aktivität zu finden. Aufgrund seines Vorkommens auf nahezu allen Leukozyten wird es auch als Pan-Leukozytenmarker bezeichnet [60, 61]. Wir trennen



**Abbildung 3.8:** Plasmazellen. Alle lebenden Zellen werden nach CD38 und CD138 aufgetrennt. Plasmazellen sind die CD38<sup>++</sup> CD138<sup>+</sup> Population.

die lebenden Zellen in die Populationen der Lymphozyten allgemein und der NK-Zellen (CD56<sup>+</sup>) (vgl. Abb. 3.9).

Die Lymphozyten werden nun weiter nach CD19 als Marker für B-Zellen und CD3 für T-Zellen aufgetrennt (vgl. Abb. 3.10). CD19 (95kD) ist als Immunglobulin charakterischer Marker für B-Zellen. Mit CD21 und CD81 bildet es Komplexe, wirkt als Co-Rezeptor für B-Zellen und hat zytoplasmatische Tyrosinkinaseaktivität [17].

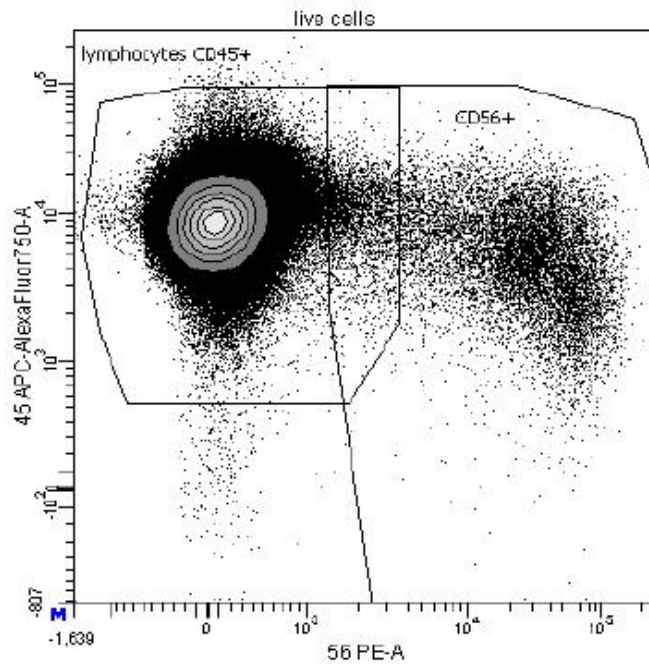
CD3 ist charakteristischer Marker für T-Zellen. Hiermit ist für dieses Panel die Untersuchung der T-Zellen schon abgeschlossen, da wir lediglich die Gesamtzahl der T-Zellen bestimmen. Im T-Zell-Panel untersuchen wir verschiedene T-Zell-Subpopulationen (vgl. 3.2.5).

Die B-Zellen werden auf vier verschiedene Subpopulationen hin untersucht – CD27<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup> und CD25<sup>+</sup>/69<sup>+</sup>.

Die CD27<sup>+</sup> B-Zellen lassen sich als eigene Population klar abgrenzen (vgl. Abb. 3.11). CD27 (55kD) gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren und wird von medullären Thymozyten, T-Zellen, NK-Zellen und manchen B-Zellen exprimiert. Er kann als Co-Stimulator für T- und B-Zellen wirken und bindet an CD70 [17]. An dieser Stelle interessiert er uns als Aktivierungsmarker für B-Zellen.

Bei CD25 und CD69 positiven B-Zellen handelt es sich weniger um eine abgetrennte Population als viel mehr um einen kontinuierlichen Shift ins Positive (Abb. 3.12) Um





**Abbildung 3.9:** Lymphozyten. Angezeigt werden alle lebenden Zellen. Alle Lymphozyten sind CD45<sup>+</sup> (Y-Achse). Zusätzlich CD56<sup>+</sup> (X-Achse) sind NK-Zellen. NK-Zellen können auch CD45<sup>-</sup> sein. Die beiden Populationen können sich zum Teil überschneiden.

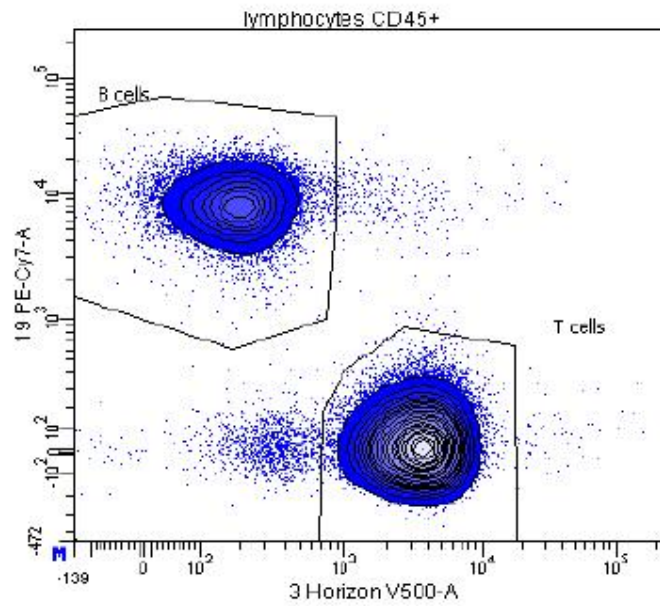
hierbei zu definieren, ab welchem Wert die Zellen als positiv gewertet werden können, wurden die Gates für diese beiden Werte FMO-kontrolliert gelegt.

CD25 (55kD) ist als IL-2 Rezeptor auf B-Zellen, Monozyten und aktivierten T-Zellen zu finden. An B- und T-Zellen wirkt IL-2 als Wachstumsfaktor. Während der B-Zell-Reifung ist der IL-2 Rezeptor auf späten Pro-B-Zellen, großen Prä-B-Zellen und kleinen Prä-B-Zellen exprimiert [17].

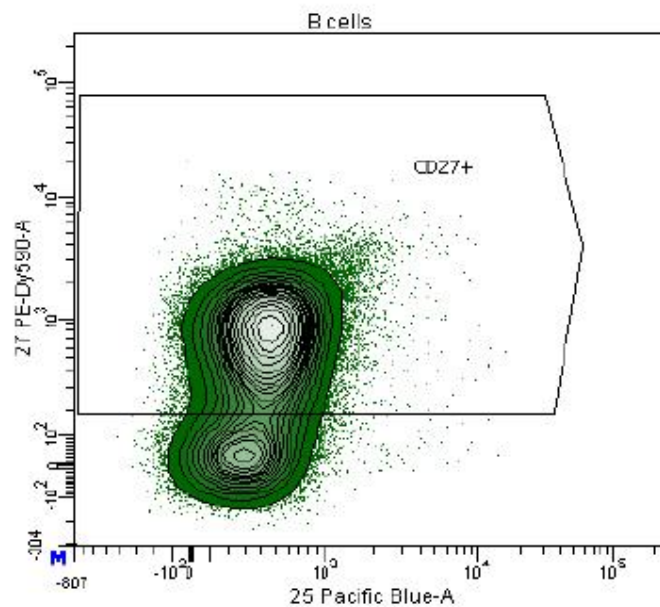
CD69 ist ein Homodimer von 28 und 32kD und dient als Aktivierungsmarker für T- und B-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen [17].

Beide sind hier genau wie CD27<sup>+</sup> als Aktivierungsmarker für B-Zellen interessant.

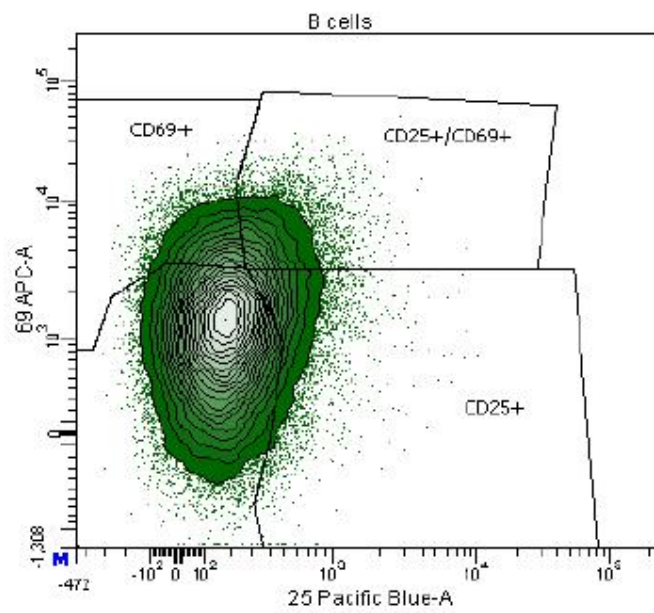




**Abbildung 3.10:** B-Zellen ( $CD19^+$ ) und T-Zellen ( $CD3^+$ ).Lymphozyten werden nach CD19 und CD3 aufgetrennt, sodass die Populationen der B- und T-Zellen sichtbar werden.



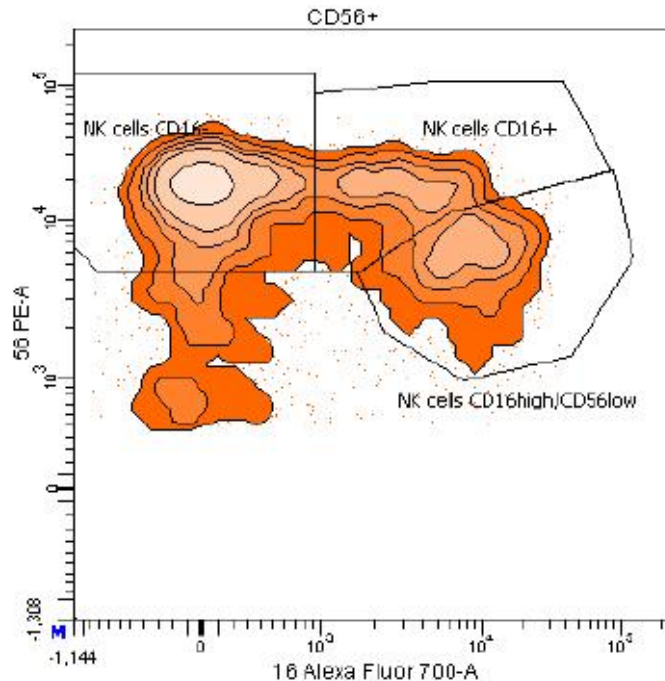
**Abbildung 3.11:**  $CD27^+$  B-Gedächtniszellen. B-Zellen werden nach CD27 aufgetrennt, sodass  $CD27^+$  B-Gedächtniszellen abgrenzbar sind.



**Abbildung 3.12:** B-Zellsubpopulationen CD25<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup> und CD69<sup>+</sup>/25<sup>+</sup>. B-Zellen werden nach den Aktivierungsmarkern CD25 und CD69 aufgetrennt. Die Gates wurden FMO kontrolliert gelegt.

### 3.2.4 NK- und NKT-Zellen

Um NK-Zellen darzustellen, trennt man die lebenden Zellen nach CD56 auf (vgl. Abb. 3.9). CD56 (135-220kD) ist charakteristischer Marker für NK-Zellen [17].



**Abbildung 3.13:** NK-Zellen. CD56<sup>+</sup> Zellen werden nach CD56 und CD16 aufgetrennt, sodass drei NK-Zell-Subpopulationen abgrenzbar werden. Da beim vorhergehenden Gate bereits auf CD56<sup>+</sup> Zellen gegatet wurde, werden in diesem Diagramm die CD56<sup>-</sup> Zellen unter 1.000 nicht mehr angezeigt.

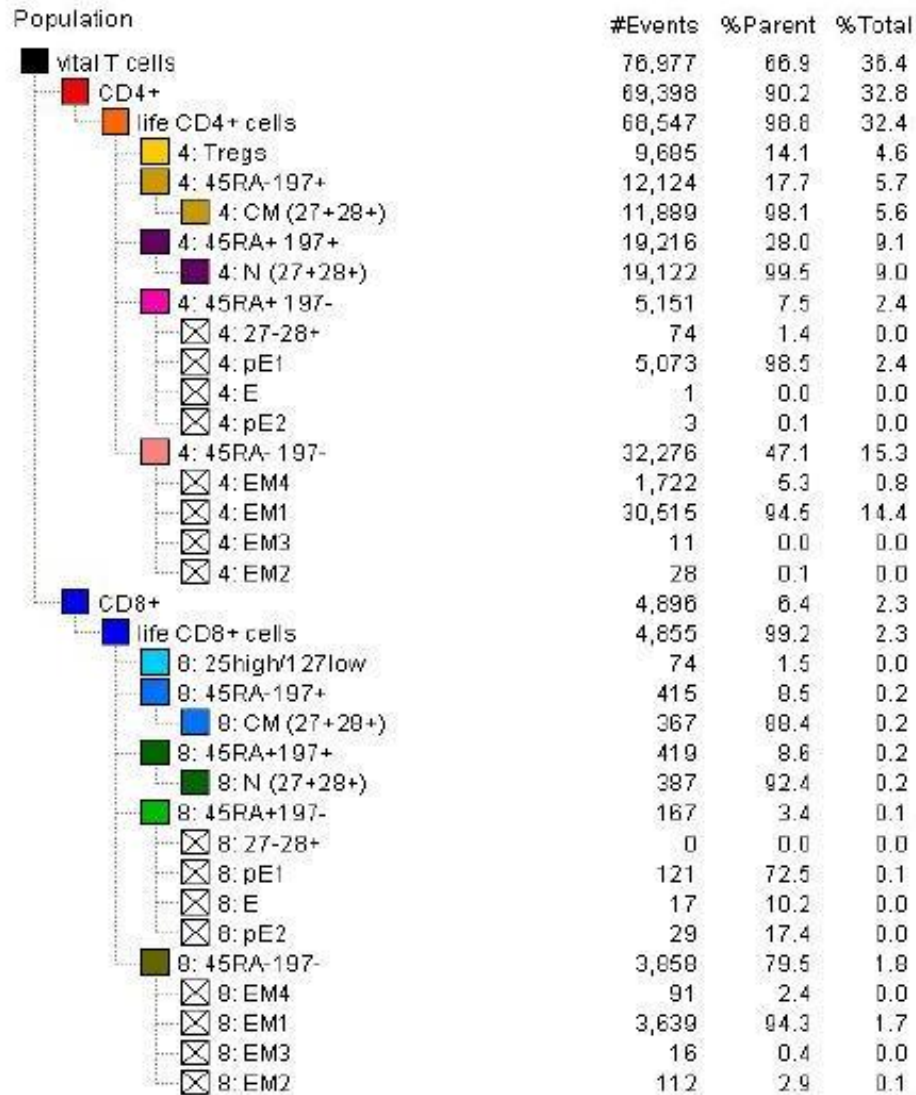
Als CD56 positive Zellen werden die NK-Zellen auf drei weitere Subpopulationen untersucht (vgl. Abb. 3.13). Zwei Populationen, die CD56<sup>bright</sup> sind - eine davon ist CD16<sup>dim</sup>, die andere CD16<sup>-</sup> - und eine dritte CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup> Subpopulation. (vgl. 1.2.6)

Auf NK-Zellen, Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten ist das Immunglobulin CD16 (50-80kD) zu finden. Als Teil des Fc Rezeptors ist FcγR III ein häufig verwendeter Name. Es ist Mediator für Phagozytose und antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität [17] (vgl. 1.2.6).

Zuletzt wird die Anzahl der NKT-Zellen bestimmt. Wie der Gating-Hierarchie zu entnehmen ist (vgl. Abb. 3.3), wurden die NKT-Zellen direkt von den lebenden Zellen abgeleitet. Sie sind CD3<sup>+</sup> und CD56<sup>+</sup>.

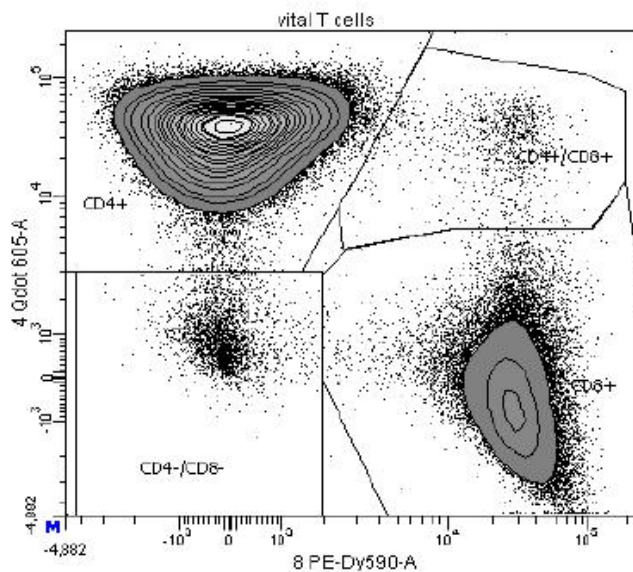
### 3.2.5 T-Zellen

Die ersten Gating-Schritte sind, ähnlich wie beim B- und NK-Zell-Panel, das Gaten auf lebende, einzelne, mononukleäre Zellen (siehe oben). Danach erfolgte die Gatingstrategie, die Abb. 3.14 zu entnehmen ist.



**Abbildung 3.14:** Gating Hierarchie des T-Zell Panels. Events: Zahl der gemessenen Zellen für diese Eigenschaften. Parent: %-Anteil der Zellen an der in der Hierarchie nächst höheren Zellpopulation. Total: %-Anteil an allen gemessenen Zellen.

Charakteristischer Marker für T-Zellen ist das CD3 Molekül. Es ist ein Immunglobulin und besteht aus vier Untereinheiten – zwei mal  $\epsilon$  (20kD),  $\delta$  (21kD) und  $\gamma$  (25-28kD) – die intrazellulär zur Signaltransduktion jeweils ein immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) besitzen. Gemeinsam mit dem T-Zell Rezeptor und zwei  $\zeta$  Ketten mit jeweils drei ITAMs bildet es den für alle T-Zellen charakteristischen Rezeptorkomplex [17].



**Abbildung 3.15:** CD3<sup>+</sup> T-Zellen werden nach CD4 und CD8 aufgetrennt, sodass vier verschiedene Populationen sichtbar werden: CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Killer-Zellen, außerdem jeweils doppelt positive und negative Populationen.

CD3<sup>+</sup> T-Zellen wurden in ihre beiden großen Subpopulation, CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen und CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen, geteilt (vgl. Abb. 3.15) Dabei ergeben sich auch jeweils eine doppelt positive und doppelt negative Population.

CD4 (55kD) ist Co-Rezeptor für MHC II Moleküle und Rezeptor für HIV-1 und HIV-2 gp120. Er wird auf Thymozytensubpopulationen, T-Helfer-Zellen 1 und 2 (ca. zwei Drittel der peripheren T-Zellen), aber auch auf Monozyten und Makrophagen exprimiert [17].

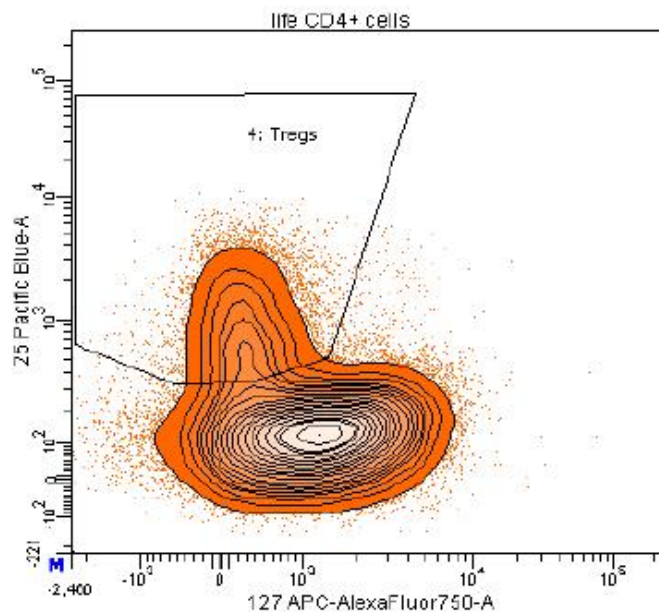
CD8 besteht aus zwei Untereinheiten  $\alpha$  (32-34kD) und  $\beta$  (32-34kD). Es ist Co-Rezeptor für MHC I Moleküle. Exprimiert wird dieser Marker auf Thymozytensubpopulationen und zytotoxischen T-Zellen (ca. ein Drittel der peripheren T-Zellen) [17].

Zum feineren Nachgaten auf die lebenden Zellen dieser vier möglichen Subpopulationen – CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/8<sup>+</sup> und CD4<sup>-</sup>/8<sup>-</sup> – wird in einem weiteren Schritt jeweils ein präziseres Gate gelegt (vgl. Abb. 3.14).

Die für CD4 und CD8 doppelt positiven oder doppelt negativen T-Zellen wurden nicht weiter untersucht. Die CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen und CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen wurden getrennt jeweils auf folgende Weise untersucht:

### Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Helfer-Zellen (CD4<sup>+</sup>) sind für CD127 schwach- und für CD25 hoch positiv und lassen sich somit durch diese beiden fluoreszierenden Antikörper darstellen (vgl. Abb. 3.16).



**Abbildung 3.16:** Unter den CD4<sup>+</sup> T-Zellen wird auf regulatorische T-Zellen getaget. Diese sind CD25<sup>high</sup>/127<sup>low</sup>.

CD127 (68-79kD) ist IL-7 Rezeptor und wird von lymphoiden Knochenmarks Vorläuferzellen, Pro-B-Zellen, reifen T-Zellen und Monozyten exprimiert [17]. CD25 (55kD) ist auch auf aktivierten T-Zellen zu finden (siehe oben) und ist auf T-reg-Zellen hoch positiv.

### T-Zell Reifestadien

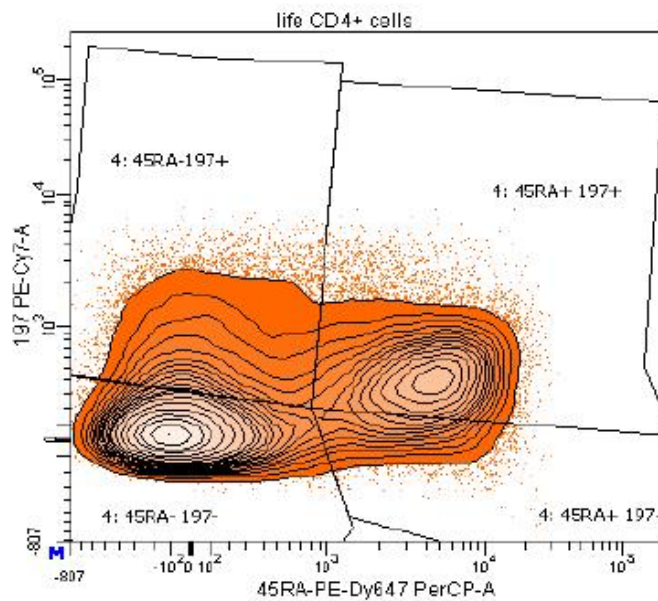
Weiterhin wurden neun T-Zell-Subpopulationen bestimmt, die T-Zellen im Zug ihrer Reifung durchlaufen. Unterscheiden lassen sich diese Populationen anhand von vier Markern, für die sie jeweils eine charakteristische Kombination besitzen: CD27, CD28, CD45RA und CCR7 (CD197).

Um diese neun Populationen zu quantifizieren, trennen wir die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zunächst jeweils nach CD197 (CCR7) und CD45RA auf (vgl. Abb. 3.17). Um die Trennung nach CD197 positiv und negativ genauer vornehmen zu können, wurden bei einzelnen Proben FMO-Kontrollen gefärbt und entsprechende Werte dann auch für die anderen Proben angenommen.

Danach werden die vier möglichen Subpopulationen – CD45RA<sup>+</sup>, CD197<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>/197<sup>+</sup> und CD45RA<sup>-</sup>/197<sup>-</sup> – nach CD27 und CD28 aufgetrennt. In den beiden CD197 (CCR7) positiven Diagrammen sind physiologischerweise jeweils nur CD27<sup>+</sup>/28<sup>+</sup> Populationen zu erwarten – N bzw. CM T-Zellen (vgl. Abb. 3.18, Abb. 3.19 und Tab. 3.7).

Bei für CD197<sup>-</sup>/45RA<sup>-</sup> Zellen existieren für CD27 und CD28 alle vier möglichen Kombinationen – Efector Memory 4 (EM4), Efector Memory 1 (EM1), Efector Memory 3





**Abbildung 3.17:** T-Zell-Reifestadien: CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen werden nach CD45RA und CD197 (CCR7) aufgetrennt, sodass sich vier Populationen bilden, die im Folgenden weiter untersucht werden.

(EM3) und Efector Memory 2 (EM2) (vgl. Abb. 3.20 und Tab. 3.7). Unter den CD45RA<sup>+</sup> (CD197<sup>-</sup>) T-Zellen gibt es folgende Populationen: pro Efector 1 (pE1), Efector (E) und pro Efector 2 (pE2) (vgl. Abb. 3.21) CD27<sup>-</sup> und CD28<sup>+</sup> Zellen existieren physiologischerweise nicht (vgl. Tab. 3.7).

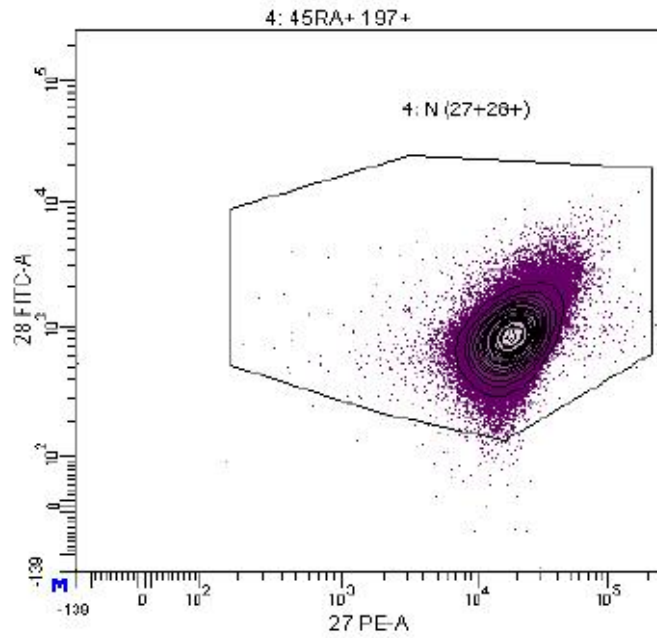
Von dem Pan-Leukozytenmarker CD45 (siehe oben) gibt es fünf verschiedene Isoformen. Eine davon, die das A Exon enthält, ist CD45RA (205-220kD) CD45RA ist typischerweise auf B-Zellen, naiven T-Zellen und Monozyten [17].

CD197 (46-52kD) findet man in der Literatur auch häufig unter dem Namen C-Chemo-kinrezeptor Typ7, der vom CCR7 Gen codiert wird. Im Folgenden wird daher wie auch schon in der Einleitung dieser Name verwendet werden. Er wird von aktivierten T- und B-Zellen exprimiert und bei EBV-Infektion der B-Zellen genauso wie bei HHV 6 oder 7 Infektion der T-Zellen stark hoch reguliert [17].

CD28 (44kD) bindet CD80 und CD86, ist Rezeptor für Co-Stimulationssignale und Aktivierungsmarker naiver T-Zellen. Er wird auf T-Zell-Subpopulationen und aktivierten B-Zellen exprimiert [17].

CD27 (55kD) gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren und wird von medullären Thymozyten, T-Zellen, NK-Zellen und manchen B-Zellen exprimiert. Er kann als Co-Stimulator für T- und B-Zellen wirken und bindet an CD70 [17].

Die Reifung der T-Zellen verläuft über diese neun Subpopulationen wie Tab. 3.7 zu entnehmen ist.

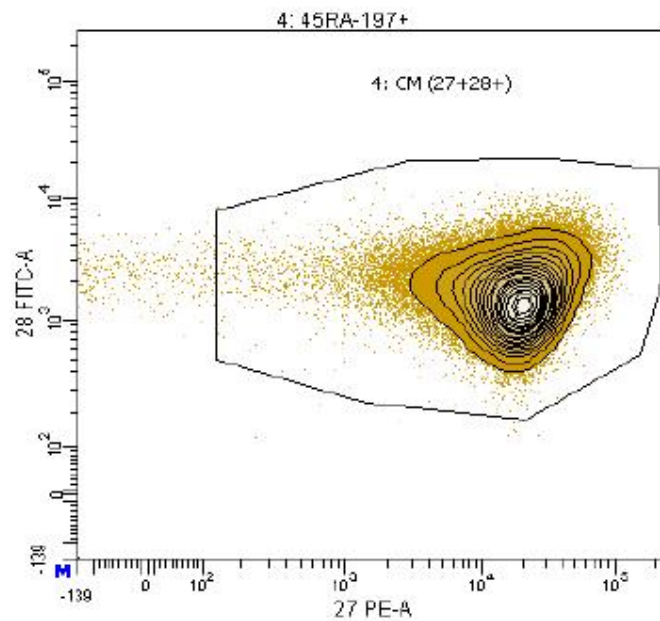


**Abbildung 3.18:** Naive T-Zellen (N). CD45RA<sup>+</sup>/197<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulation sind immer CD27<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup>.

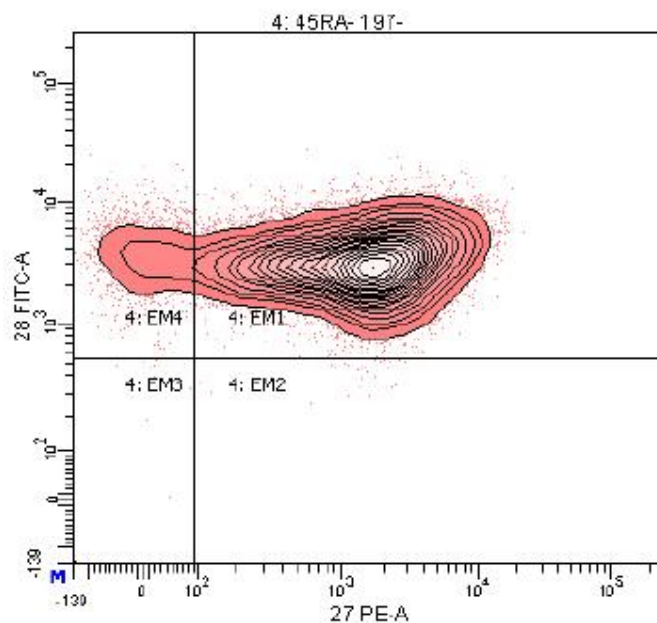
	<i>unreif</i>								<i>reif</i>
CD	N	CM	EM1	EM2	pE1	pE2	EM4	EM3	E
45RA	+	-	-	-	+	+	-	-	+
197	+	+	-	-	-	-	-	-	-
27	+	+	+	+	+	+	-	-	-
28	+	+	+	-	+	-	+	-	-

**Tabelle 3.7:** T-Zell-Subpopulationen

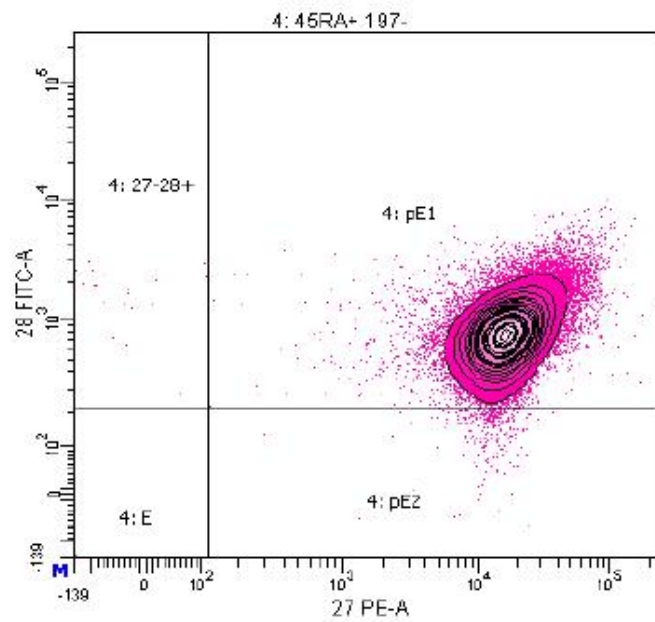




**Abbildung 3.19:** Central Memory (CM) T-Zellen.  $CD45RA^-/197^+$  T-Zell-Subpopulation sind immer  $CD27^+ CD28^+$ .



**Abbildung 3.20:**  $CD45RA^-/197^-$  T-Zell-Subpopulationen (EM) aufgetrennt nach CD27 und CD28: Efeator Memory 4 (EM4), Efeator Memory 1 (EM1), Efeator Memory 3 (EM3) und Efeator Memory 2 (EM2) Zellen.



**Abbildung 3.21:** CD45RA<sup>+</sup>/197<sup>-</sup> T-Zell-Subpopulationen (TEMRA) aufgetrennt nach CD27 und CD28: pro Effektor (pE) 1, pE 2 und Effektor (E) Zellen.

## 3.3 Statistik

### 3.3.1 Verteilung der Proben

Insgesamt konnten 84 WLK von 69 Patienten untersucht werden. Die Differenz zwischen Anzahl der Proben und Anzahl der Patienten rührt daher, dass bei manchen Patienten der WLK intraoperativ nicht sicher identifiziert werden konnte. In diesen Fällen wurden mehrere Lymphknoten, die in Frage kamen, entfernt und untersucht. Um Patienten, denen zwei oder drei Lymphknoten entnommen wurden, nicht stärker zu gewichten als andere, wurden insgesamt 15 Proben aus der Auswertung ausgeschlossen, sodass nur noch eine Probe pro Patient berücksichtigt wurde. Eingeschlossen wurde jeweils die Probe, bei der am meisten lebende Zellen zur Untersuchung des Immunsystems zur Verfügung standen, bei der also die genauesten Messungen erzielt werden konnten.

Einer der gemessenen Lymphknoten wurde während einer Venenstrippingoperation entnommen und stammt somit nicht von einem Patienten mit malignem Melanom. Diese Probe wurde als Kontrolle untersucht wie alle anderen, allerdings aus der Auswertung ausgeschlossen.

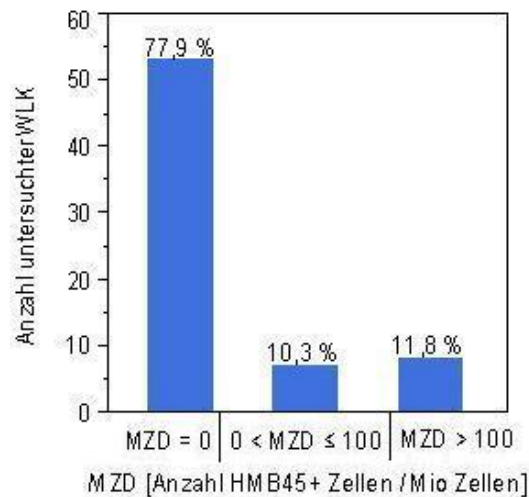
Somit standen zunächst 68 Proben zur statistischen Auswertung zur Verfügung.

Um potentielle Veränderungen in den WLK der Patienten besser vergleichen zu können, bildeten wir aufgrund der MZD [HMB45<sup>+</sup> Zellen/Mio aller ausgezählter Zellen eines WLK] drei Gruppen. Die erste Gruppe bilden die Proben ohne HMB45<sup>+</sup> Zellen im WLK, also MZD = 0. In der zweiten Gruppe befinden sich Proben mit  $0 < \text{MZD} \leq 100$  und in der dritten alle WLK mit MZD > 100. Die Mediane und die Range der MZD der einzelnen Gruppen sind über alle 84 Proben in Tab. 3.8 dargestellt.

	MZD [HMB45 <sup>+</sup> Zellen / Mio]		
	0	> 0 ≤ 100	> 100
N	67	8	9
Min.	0	0,5	274,5
Median	0	4,5	4140
Max.	0	98,5	110000

**Tabelle 3.8:** Gruppen der Melanomzelldichte (MZD)

Die 68 Proben verteilen sich auf die drei Gruppen wie Abb. 3.22 zu entnehmen. Die Verteilung der ausgeschlossenen Proben über die drei Gruppen ist mit 87,5% der Proben in Gruppe 1, 6,3% der Proben Gruppe 2 und 3 der Verteilung der eingeschlossenen Proben sehr ähnlich (vgl. Abb. 3.22), sodass hierbei nicht mit einer Verfälschung der Ergebnisse gerechnet werden muss.



**Abbildung 3.22:** Anzahl der untersuchten Wächterlymphknoten pro Gruppe der MZD. Die Gesamtzahl der Proben beträgt 68, nachdem 16 Proben ausgeschlossen wurden.

Bei den gemessenen Daten handelt es sich um metrische Merkmale. Um die Verteilung zu beurteilen, wurden sowohl Histogramme als auch Boxplot-Darstellungen betrachtet. Bei der Population der Effector Memory 1 Zellen (EM1) kann von Normalverteilung ausgegangen werden. Da alle anderen Populationen allerdings keine Normalverteilung aufweisen, werden wir im Folgenden insgesamt nicht von Normalverteilung ausgehen und daher als beschreibende Werte Median und Quantil angeben. Außerdem werden wir deshalb grundsätzlich nur nicht parametrische Tests verwenden.

### 3.3.2 Verwendete statistische Größen und Tests

Zur Beschreibung der Häufigkeitsverteilung unserer gemessenen Daten verwendeten wir Quantil und Median.

Quantile sind Dispersionsmaße und informieren über die Unterschiedlichkeit einer Verteilung von Werten, indem sie deren Streuung beschreiben. [62] Bildet man die Differenz aus Maximum und Minimum einer Häufigkeitsverteilung, erhält man die gesamte Variationsbreite oder auch range. Ist dieses Maß stark von Ausreißern geprägt, kann es sinnvoll sein, eingeschränktere Streubereiche zu betrachten. [62] Um die Grenzen dieser Streubereiche zu beschreiben, definiert man Quantile. Gibt man Quantile in Prozent an, kann man auch von Perzentilen sprechen. Wir werden im Folgenden von Quantilen sprechen.

Allgemein ist das  $x$ -te Quantil die Linie, die  $x\%$  einer Verteilungsfläche abschneidet. So schneidet zum Beispiel das 5%-Quantil die unteren, das 95%-Quantil die oberen 5% einer Verteilung ab, sodass dazwischen ein eingeschränkter Streubereich mit 90% aller Werte bleibt [62].

Man kann eine Verteilung in vier Quartile, mit den Grenzen 25%-, 50%- und 75%-

Quantil, einteilen. Den Streubereich der mittleren 50% der Werte, begrenzt durch das 25%- und das 75%-Quantil, nennt sich dann auch Interquartilenbereich [62].

Ein besonderes Quantil ist das 50%-Quantil, auch Median genannt. Im Unterschied zu Dispersionsmaßen handelt es sich dabei um ein Lagemaß.

Der Median ist ein statistischer Kennwert, von dem alle übrigen Werte einer Häufigkeitsverteilung im Durchschnitt am wenigsten abweichen [62]. Ordnet man eine Anzahl an Werten, die mindestens ordinalskaliert sind, ihrer Größe nach, ist der Median der Wert, der in der Mitte steht. Somit teilt er eine Häufigkeitsverteilung in zwei umfangsgleiche Teile [63].

Im Vergleich zum arithmetischen Mittel, auch Mittelwert genannt, ist der Median deutlich robuster gegenüber Ausreißern [63].

Um dem Problem des multiplen Testens zu begegnen, werden wir den Großteil unserer Messergebnisse rein beschreibend auswerten. Genauer untersuchen und auch Signifikanzen bestimmen möchten wir aber die Zellpopulationen der regulatorischen T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen (vgl. 1.3).

Dazu werden zwei Tests eingesetzt, der Wilcoxon-Test und die Spearmans  $\rho$  Korrelation.

Der Wilcoxon-Test ist ein verteilungsfreier Signifikanztest. Er gehört zu den nicht-parametrischen Tests und verlangt somit keine Normalverteilung. Außerdem ist er für kleine Fallzahlen geeignet. Er untersucht den Unterschied zweier abhängiger Stichproben ordinalskaliert Merkmale hinsichtlich ihrer zentralen Tendenz [62].

Wir vergleichen die Proben der Gruppe 2 ( $0 < \text{MZD} \leq 100$ ) und Gruppe 3 ( $\text{MZD} > 100$ ) jeweils mit den Proben der ersten Gruppe ( $\text{MZD} = 0$ ) als Kontrollgruppe.

Unabhängig von der Gruppeneinteilung untersuchen wir, in wie weit eine Korrelation zwischen der MZD, als Anzahl HMB45<sup>+</sup> Zellen pro Million ausgezählter Zellen des WLK, und der Größe der jeweiligen Zellpopulationen besteht. Um dies zu quantifizieren, bestimmen wir Spearmans  $\rho$  als Korrelationskoeffizienten.

Spearmans  $\rho$  gehört zu den Rangkorrelationskoeffizienten und ist damit parameterfrei. Er bestimmt den Zusammenhang zweier mindestens ordinalskaliert, metrischer Merkmale, die nicht normalverteilt sind. Auch Spearmans  $\rho$  ist relativ robust gegenüber Ausreißern [62]. Der Korrelationskoeffizient wird angegeben in  $-1 \leq \rho \leq +1$ , wobei 1 maximale Korrelation bedeutet, 0 keine Korrelation und -1 maximale negative Korrelation.

Obwohl wir für manche Zellpopulationen bei melanozytärem Befall grundsätzlich eher eine Zu- oder Abnahme erwartet hätten, verwenden wir zur Auswertung zweiseitige Tests, um die Daten möglichst unvoreingenommen zu untersuchen und auch unerwartete Ergebnisse zu erfassen.

Zur graphischen Darstellung verwenden wir Boxplot-Darstellungen. Diese zeigen auf

der y-Achse die Anzahl der Zellen einer bestimmten Zellpopulation pro 1 Million lebender Zellen. Die Box entspricht dem Interquartilbereich, begrenzt durch das 25%- und das 75%-Quantil, mit dem Median als Linie innerhalb der Box.

Für die Längen der Antennen gibt es verschiedene Definitionen. Wir verwenden die Ausreißer-Darstellung nach J. W. Tukey, die die Antennen auf die Länge des 1,5-fachen Interquartilenabstandes beschränkt. Die unterschiedlichen Längen der Antennen kommen dadurch zustande, dass diese nicht bei genau diesem Abstand enden, sondern bei dem nächsten Wert innerhalb dieses Bereiches. Werte außerhalb der Antennen werden als Ausreißer bezeichnet. Gibt es keine Ausreißer, enden die Antennen jeweils an den Maxima bzw. Minima der Gesamtverteilung [64].

In Zahlen angegeben sind außerdem der Median und die Anzahl  $N$  der Proben in den jeweiligen drei Gruppen der MZD. Jeder einzelne Punkt im Hintergrund der Graphik entspricht einem untersuchten WLK.

#### 3.3.3 Irrtumswahrscheinlichkeit und Signifikanzniveau

Für die statistische Auswertung nehmen wir eine  $\alpha$ -Fehler-Korrektur vor, die berücksichtigt, wie sich die gesamte Irrtumswahrscheinlichkeit durch das Durchführen mehrerer Vergleiche verändert.

Für die beiden Testungen Gruppe 2 zu 1 und Gruppe 3 zu 1 wird, da sie gemeinsam berechnet werden, durch das Statistikprogramm Jump bereits eine Korrektur für multiples Testen vorgenommen, sodass wir dies hier nicht weiter berücksichtigen müssen.

Da wir diese Vergleiche mit regulatorischen T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen allerdings für drei Fragestellungen durchführen möchten, müssen wir unser Signifikanzniveau dementsprechend korrigieren.

Wir beschließen für alle Ergebnisse eine gesamte Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% zu tolerieren (nach Fischer 1925). Korrigiert nach Bonferoni bedeutet das für das Signifikanzniveau  $\frac{5\%}{3} = 1,7\%$ . [62] Wir nehmen also ein Ergebnis ab einem  $p$ -Wert  $\leq 0,017$  als signifikant an. Nach  $(1 - (1 - 0,017)) \times 3 = 0,05 = 5\%$  haben wir damit bei drei Tests eine Wahrscheinlichkeit von 5% einen Fehler 1. Art, also einen  $\alpha$ -Fehler, zu begehen.

Ab einem  $p$ -Wert  $\leq 0,003$  sprechen wir von einem hochsignifikanten Ergebnis mit einer gesamten Irrtumswahrscheinlichkeit bei drei untersuchten Größen von 1%.

Für alle  $p$ -Wert Berechnungen ist allerdings zu berücksichtigen, dass dieser nicht nur vom tatsächlichen Unterschied zwischen den Messwerten, sondern gerade von der Anzahl der Messungen stark beeinflusst wird. Bei relativ geringen Fallzahlen wie in dieser Arbeit ist dem  $p$ -Wert daher mit einer gewissen Skepsis zu begegnen.

Als Statistikprogramm wurde Jump 10.0 verwendet.

## 4 Ergebnisse

Bei den Ergebnissen handelt es sich um Beobachtungen von lokalen Veränderungen des Immunsystems in WLK bei melanozytärem Befall. Da wir die Größen einzelner Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie bestimmt haben, beschreiben wir diese möglichen Veränderungen als Zu- oder Abnahme der Zellzahl einer bestimmten Zellpopulation in einem WLK mit melanozytärem Befall im Vergleich zu WLK ohne melanozytären Befall.

Untergliedert wird diese Auswertung in die Zellgruppen der B-Zellen, NK-Zellen, NKT-Zellen und T-Zellen.

Außerdem beobachten wir, wie sich dabei eine Kontrollprobe verhält, die nicht nur einen WLK darstellt, der frei von Melanozyten ist, sondern einen Lymphknoten, der von einem Patienten stammt, der nicht am malignen Melanom erkrankt ist.

### 4.1 B-Zellen

#### 4.1.1 Verteilung der B-Zellen

Wegen eines Defekts am roten Laser konnten bei drei Proben die B-Zellen nicht ausgewertet werden. Mit den 16 Proben, die für alle Experimente ausgeschlossen werden (vgl. 3.3.1), mussten somit von den insgesamt gemessenen 84 Proben für die B-Zell-Auswertung 19 Proben ausgeschlossen werden.

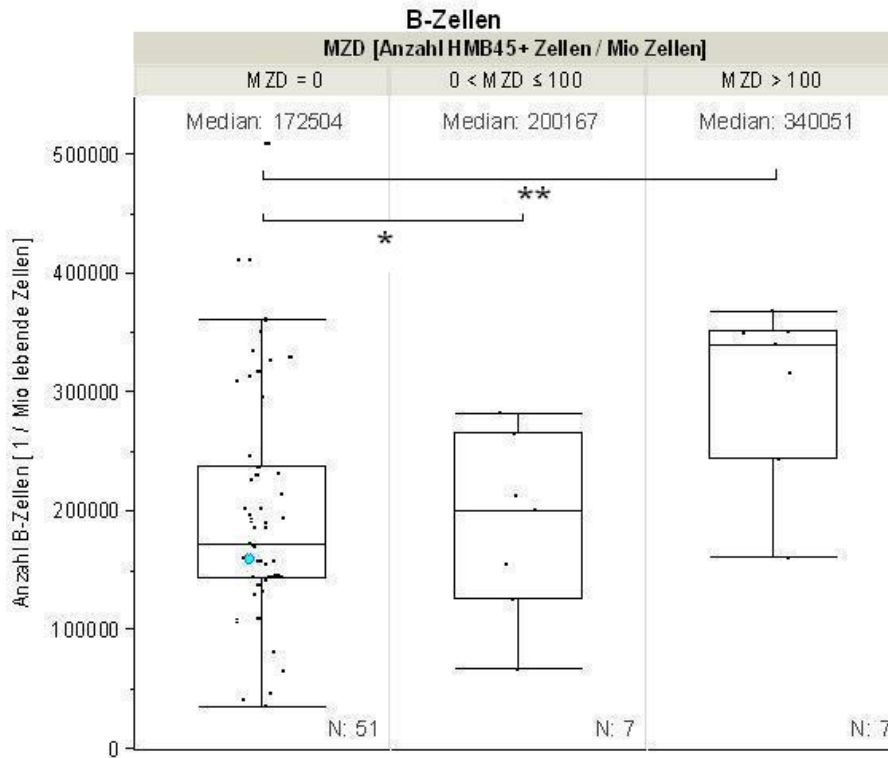
Von den verbleibenden 65 Proben hatten 51 eine  $MZD = 0$  und jeweils 7 Proben  $0 < MZD \leq 100$  bzw.  $MZD > 100$  (vgl. Tab. 4.1)

Außerdem konnte bei einer weiteren Probe die Ausprägung von CD25 und CD69 nicht bestimmt werden, da bei ihr diese beiden Antikörper nicht gefärbt wurden. Diese Probe hatte eine  $MZD = 0,5$ . Somit liegen für  $CD25^+$  und  $CD69^+$ , so wie  $CD25^+/69^+$  B-Zellen in der zweiten Gruppe nur  $N = 6$  Proben vor (vgl. Abb. 4.3, Abb. 4.4, Abb. 4.5).

Alle Angaben über die Anzahl der Zellen einer bestimmten Zellpopulation beziehen sich im Folgenden auf eine Million lebende Zellen. Lebende Zellen entsprechen den live cells in der Gating Hierarchie des B- und NK-Zell-Panels (vgl. Abb. 3.3).

### 4.1.2 Gesamtzahl der B-Zellen

Bei der Gesamtheit der B-Zellen ist unter Betrachtung der Mediane der drei MZD-Gruppen ein Anstieg der B-Zellpopulation bei melanozytärem Befall zu beobachten (vgl. Tab. 4.1 und Abb. 4.1).



**Abbildung 4.1:** B-Zellen. Hellblau: Kontrollprobe; sie beeinflusst weder N noch die Berechnung des Medians oder des Graphen. \* $P = 0,9810$ ; \*\* $P = 0,0052$

	MZD [HMB45 <sup>+</sup> Zellen / Mio]		
	0	> 0 ≤ 100	> 100
N	51	7	7
Min.	34881	66368	161166
Quantile25	143592	126145	244006
Median	172504	200167	340051
Quantile75	236845	265618	351721
Max.	508585	282566	367889

**Tabelle 4.1:** B-Zellen

Durch den Wilcoxon-Test lässt sich für diesen Unterschied von Gruppe 2 zur Kontrollgruppe eine Signifikanz von  $p = 0,9810$  und von Gruppe 3 zur Kontrollgruppe von  $p = 0,0052$  berechnen. Korreliert man unabhängig von den gebildeten Gruppen die Anzahl



der B-Zellen mit der MZD, so ergibt sich ein Korrelationskoeffizient nach Spearman von  $\rho = 0,2724$  mit einer Signifikanz von  $p = 0,0281$ .

Der Unterschied von Gruppe 1 nach Gruppe 2 von rund 170.000 zu rund 200.000 ist deutlich geringer als der Unterschied zu B-Zell-Populationen mit einer MZD  $> 100$ , wo die Zahl der B-Zellen pro Million bei rund 340.000 liegt (vgl. Tab. 4.1). Der Median der B-Zellen pro Million hat sich also in Lymphknoten mit MZD  $> 100$  im Vergleich zu Lymphknoten ohne melanozytären Befall ungefähr verdoppelt.

Die Größe der B-Zell-Population mit MZD = 0 (Kontrollgruppe) unterliegt einer recht großen Schwankung mit einem Minimum von rund 35.000 Zellen und einem Maximum von rund 510.000 Zellen pro Million (vgl. Tab. 4.1). Damit liegen die Minima und Maxima beider Gruppen mit melanozytärem Befall innerhalb der Streuung der Kontrollgruppe.

Vergleicht man die Abstände des 25%- und 75%-Quantils der einzelnen Gruppen, so wird deutlich, dass sich der gesamte Interquartilenbereich bei Proben mit MZD  $> 100$  im Vergleich zur Kontrollgruppe um so viel nach oben verschoben hat, dass der Wert der 25%-Quantile der dritten Gruppe bereits höher liegt als der Wert der 75%-Quantile der ersten Gruppe (vgl. Tab. 4.1 und Abb. 4.1). Dies bedeutet, dass 75% der Proben mit MZD  $> 100$  in ihrer Anzahl der B-Zellen pro Million lebender Zellen höher liegen als 75% der Proben ohne melanozytären Befall.

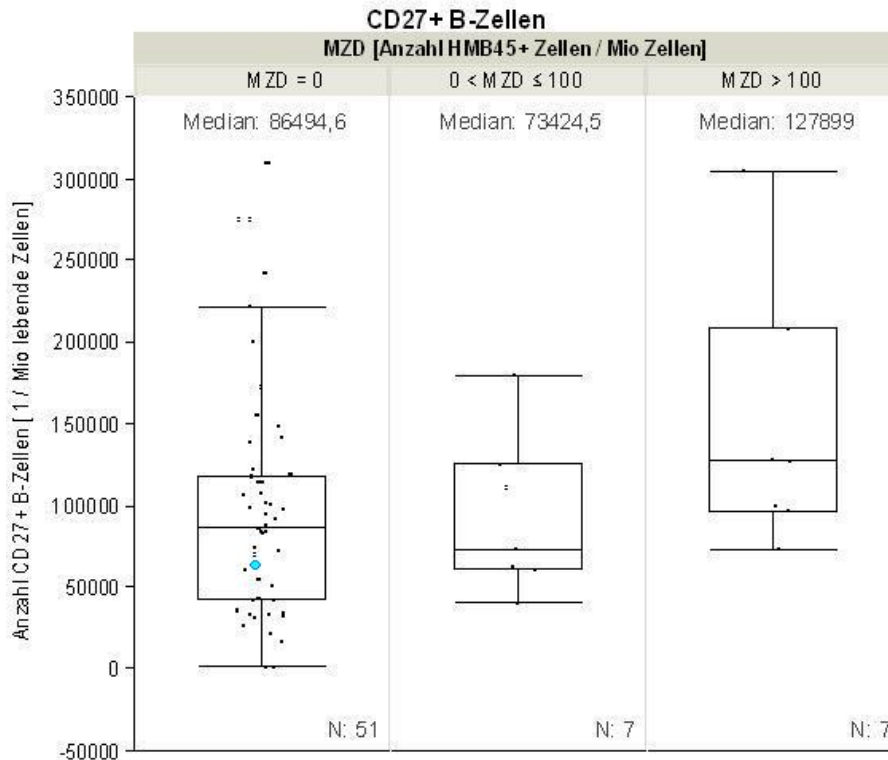
### 4.1.3 B-Zell-Subpopulationen

Innerhalb der B-Zellen untersuchten wir vier verschiedene B-Zell-Subpopulationen (vgl. 3.2.3) - B-Zellen, die CD27<sup>+</sup> bzw. CD25<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup> oder CD25<sup>+</sup>/69<sup>+</sup> sind. Die Verteilung der Größen dieser vier Subpopulationen sind gruppiert in die drei MZD-Gruppen in den Abb. 4.2, Abb. 4.3, Abb. 4.4 und Abb. 4.5 zu sehen.

#### CD27<sup>+</sup> B-Zellen

CD27<sup>+</sup> B-Zellen sind B-Gedächtniszellen (vgl. 1.2.3 und 5.3.1). Ihre Anzahl verändert sich in Lymphknoten mit  $0 < \text{MZD} \leq 100$  im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht. Die Mediane der Gruppen 1 und 2 sind mit rund 86.000 und rund 73.000 sehr ähnlich und auch die Interquartilenbereiche befinden sich in etwa auf der selben Höhe (vgl. Abb. 4.2). Außerdem befinden sich alle Werte der zweiten Gruppe vom Minimum bis zum Maximum innerhalb des Bereichs der Antennen der Kontrollgruppe, sodass sie auch innerhalb der Kontrollgruppe keine Ausreißerwerte annehmen würden.

In Gruppe 3 kommt es im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer geringfügigen Erhöhung der Werte. Der Median der dritten Gruppe liegt knapp oberhalb des 75%-Quantils der ersten Gruppe (vgl. Abb. 4.2). Der gesamte Bereich der Antennen (also ohne Ausreißer) ist



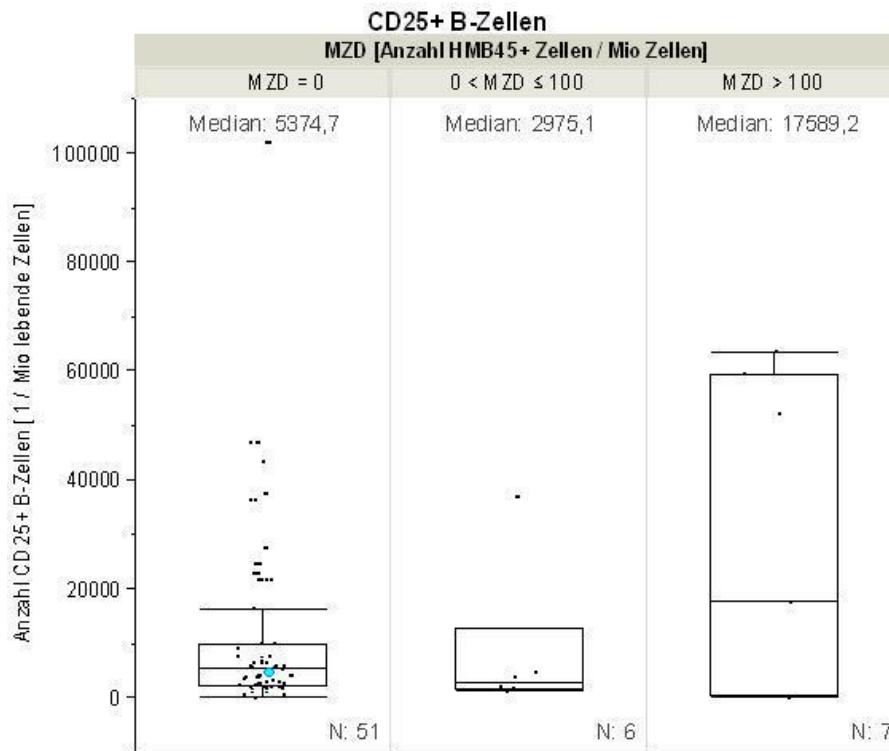
**Abbildung 4.2:** CD27<sup>+</sup> B-Zellen. Hellblau: Kontrollprobe; sie beeinflusst weder N noch die Berechnung des Medians oder des Graphen.

in Gruppe 3 im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich nach oben verschoben. Allerdings liegen trotz großer Streubreite in Gruppe 3 immer noch alle Werte innerhalb der Streubreite der Kontrollgruppe.

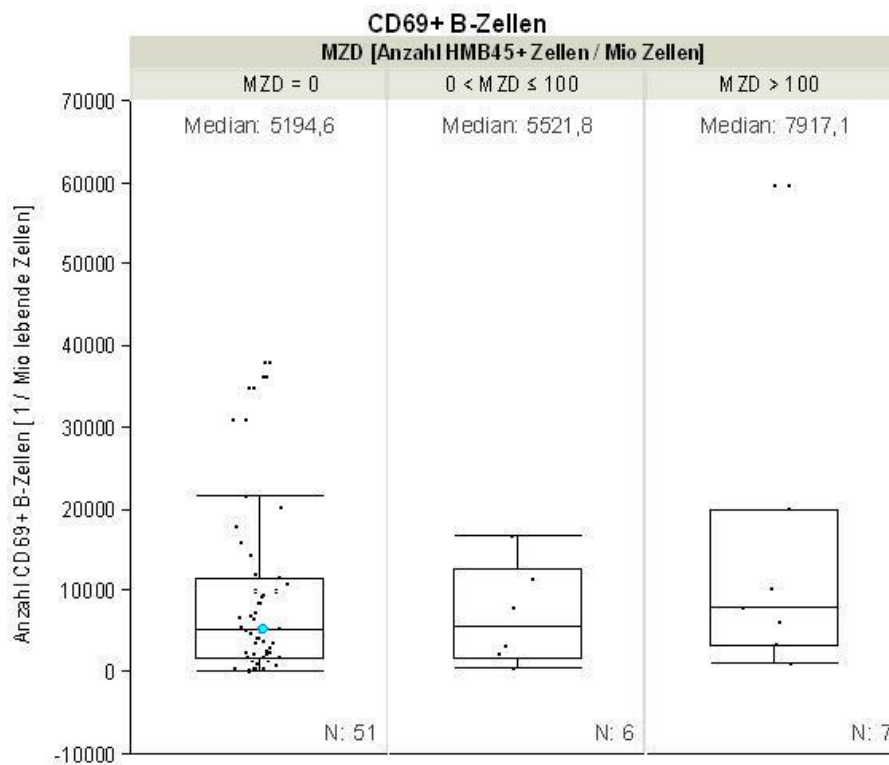
### CD25<sup>+</sup> B-Zellen

CD25 und CD69 sind Aktivierungsmarker für B-Zellen (vgl. 1.2.3 und 5.3.2). Auch bei CD25<sup>+</sup> B-Zellen wird zwischen der ersten und der zweiten Gruppe kein Unterschied sichtbar (vgl. Abb. 4.3). Der Median sinkt in Gruppe 2 (rund 3.000) im Vergleich zu Gruppe 1 (5.400) geringfügig, bleibt aber innerhalb deren 25%-Quantile (2454,4).

Die dritte Gruppe weist für die Verteilung der Werte für CD25<sup>+</sup> B-Zellen eine sehr breite Streuung auf, was bei wenigen Proben ( $N = 7$ ) zu einem breiten Bereich zwischen der 25%-Quantile (456,9) und der 75%-Quantile (59469,4) führt (vgl. Abb. 4.3). Dennoch ist festzustellen, dass der Median mit rund 17.600 deutlich höher liegt als in der Kontrollgruppe (rund 5.400).



**Abbildung 4.3:** CD25<sup>+</sup> B-Zellen. Hellblau: Kontrollprobe; sie beeinflusst weder N noch die Berechnung des Medians oder des Graphen.

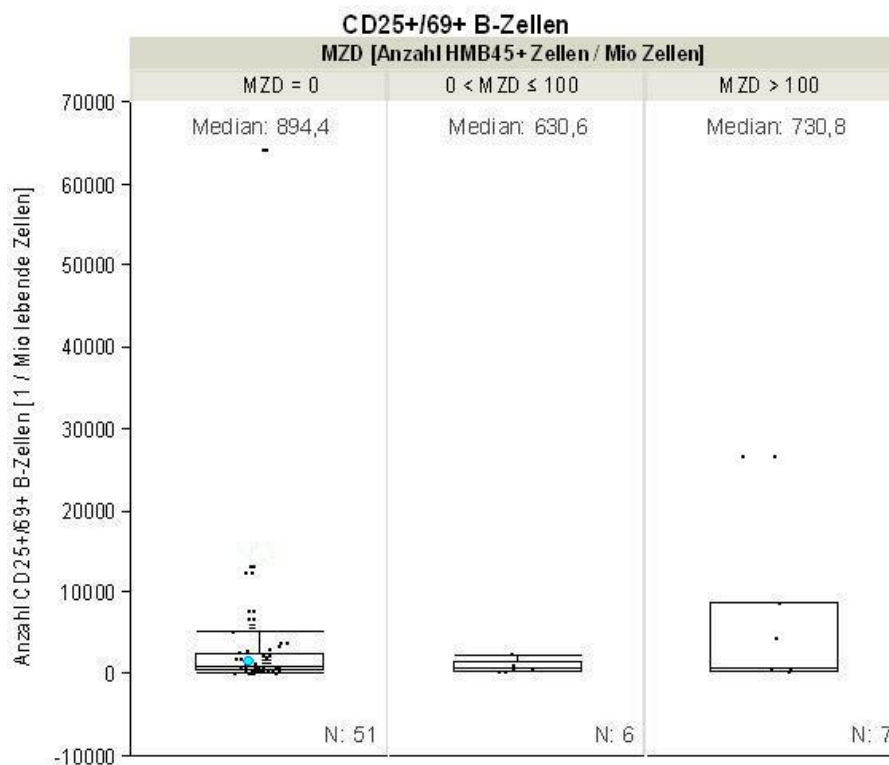


**Abbildung 4.4:** CD69<sup>+</sup> B-Zellen. Hellblau: Kontrollprobe; sie beeinflusst weder N noch die Berechnung des Medians oder des Graphen.

### CD69<sup>+</sup> B-Zellen

Vergleicht man die Anzahl der CD69<sup>+</sup> B-Zellen in Abhängigkeit von der MZD, so wird deutlich, dass sich diese weder in Gruppe 2 noch in Gruppe 3 im Verhältnis zur Kontrollgruppe wesentlich verändert. Sowohl die Mediane als auch die Interquartilenbereiche bleiben von der ersten zur zweiten und dritten Gruppe in etwa konstant (vgl. Abb. 4.4).

### CD25<sup>+</sup>/69<sup>+</sup> B-Zellen

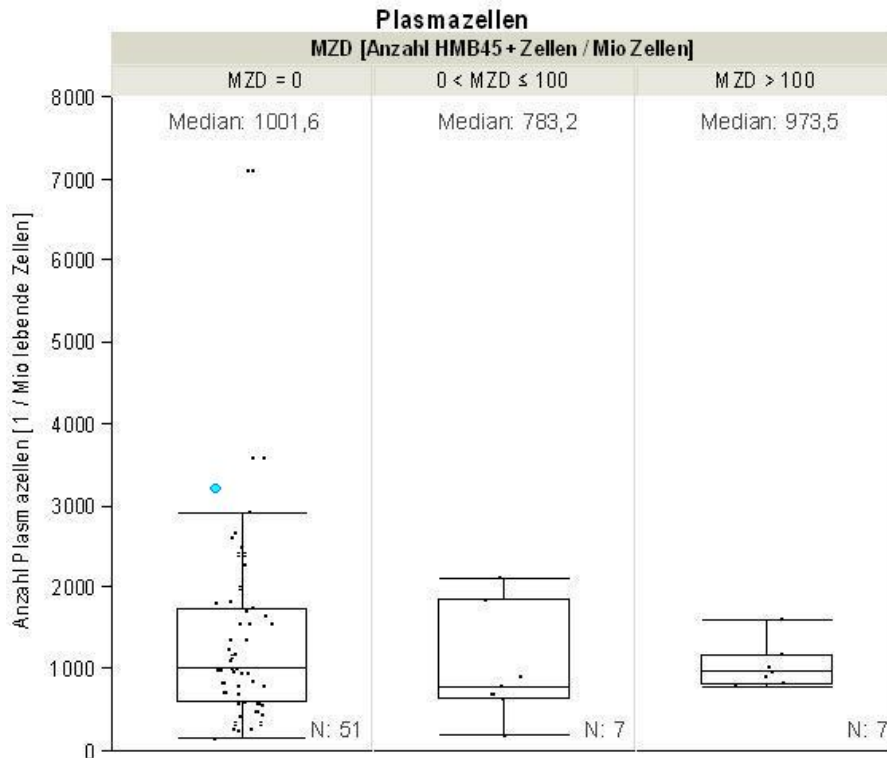


**Abbildung 4.5:** CD25<sup>+</sup> und CD69<sup>+</sup> B-Zellen. Hellblau: Kontrollprobe; sie beeinflusst weder  $N$  noch die Berechnung des Medians oder des Graphen.

Dasselbe gilt auch für B-Zellen, die CD25 und CD69 doppelt positiv sind. Die Streuung ist zwar in der dritten Gruppe bei  $N = 7$  deutlich größer mit einem breiten Bereich zwischen dem 25%- und 75%-Quantil, die Anzahl der CD25<sup>+</sup>/69<sup>+</sup> Zellen pro Million lebender Zellen verändert sich allerdings bei zunehmendem melanozytärem Befall nicht (vgl. Abb. 4.5).

#### 4.1.4 Plasmazellen

Neben diesen vier B-Zell-Subpopulationen wurde auch die Anzahl der Plasmazellen pro Million lebender Zellen eines Lymphknotens gemessen. In der Kontrollgruppe ohne me-



**Abbildung 4.6:** Plasmazellen. Hellblau: Kontrollprobe; sie beeinflusst weder N noch die Berechnung des Medians oder des Graphen.

lanozytären Befall wurde für die Anzahl der Plasmazellen ein Median von rund 1.000 bestimmt. Dieser Wert verschiebt sich auch in den beiden Gruppen mit einer MZD > 0 nicht nennenswert nach oben oder unten (vgl. Abb. 4.6), sodass wir nach unseren Messungen keinen Einfluss der Melanomzellen auf die Anzahl der Plasmazellen beobachten.

#### 4.1.5 Zusammenfassung der B-Zell-Ergebnisse

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Gesamtzahl der B-Zellen mit einer Doppelung des Medians signifikant zunimmt ( $p = 0,0052$ ), sodass sich in 75% der WLK mit einer MZD > 100 mehr B-Zellen pro Million lebender Zellen befinden als in 75% der WLK ohne melanozytären Befall.

Gleichzeitig kommt es zu einer Zunahme der CD27<sup>+</sup> B-Gedächtniszellen, während unsere Messungen bei den anderen untersuchten B-Zell-Subpopulationen - CD25<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>/69<sup>+</sup> B-Zellen und Plasmazellen -, keine Veränderungen in Abhängigkeit des melanozytären Befalls zeigen.

Man könnte also annehmen, dass sich die Zunahme der B-Zellen in der Zunahme der B-Gedächtniszellen spezifiziert. In diesem Fall wäre allerdings bei den B-Gedächtniszellen eine deutlichere Zunahme zu erwarten als bei der Gesamtzahl der B-Zellen. Da dies nicht

der Fall ist, muss davon ausgegangen werden, dass die Zunahme der B-Zellen insgesamt in einer Zunahme verschiedener B-Zellsubpopulationen begründet ist, von denen die Population der B-Gedächtniszellen eine bedeutende ist. Auch die Summe der Tendenz zur Zunahme aller Subpopulationen wird vermutlich ihren Beitrag leisten. Es könnten also auch Subpopulationen beteiligt sein, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurden.

## 4.2 T-Zellen

### 4.2.1 Verteilung T-Zellen

Die Gesamtzahl der T-Zellen wurde auch im B- und NK-Zell-Panel bestimmt (vgl. Abb. 3.3). Allerdings nur bei 48 der 68 Proben, da bei den anderen Proben CD3-V500 nicht mitgefärbt wurde. Von den 48 Proben waren 38 frei von Melanozyten, 4 fielen in Gruppe 2 und 6 in Gruppe 3 mit melanozytärem Befall (vgl. Abb. 4.7).

Da diese Gesamtzahl der T-Zellen im B- und NK-Zell-Panel gemessen wurde, beziehen sich hier die Angaben über die Anzahl der Zellen auf eine Mio lebende Zellen (bzw. live cells (vgl. Abb. 3.3)). Die Angaben über die einzelnen Subpopulationen der T-Zellen, die im T-Zell-Panel gemessen wurden, beziehen sich jedoch alle auf eine Million lebender T-Zellen (vital T cells) (vgl. Abb. 3.14).

### 4.2.2 Gesamtzahl der T-Zellen

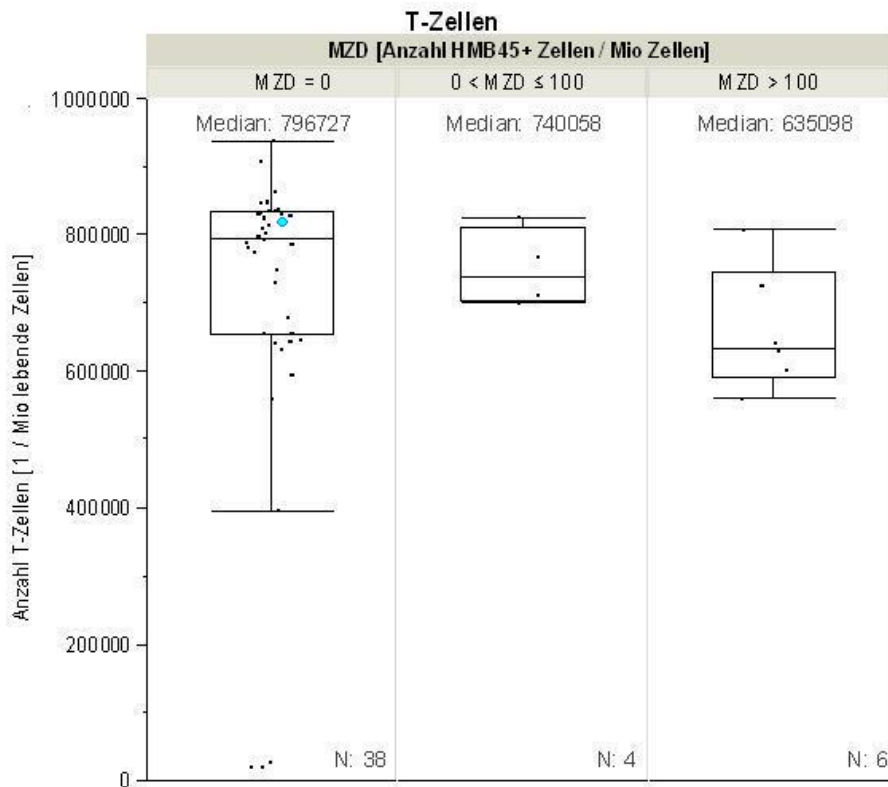
Auffällig ist, dass, während B-Zellen bei melanozytärem Befall in ihrer Anzahl zunehmen (vgl. 4.1 und Abb. 4.1), T-Zellen eher abnehmen. So haben die WLK der Kontrollgruppe rund 800.000 T-Zellen pro Million lebender Zellen, WLK mit  $0 < \text{MZD} \leq 100$  rund 740.000 und WLK mit  $\text{MZD} > 100$  rund 640.000 T-Zellen (vgl. Abb. 4.7).

Die Abnahme in Gruppe 2 im Vergleich zur Kontrollgruppe ist nur relativ gering - der Median sinkt um 7,5%. Auch bleibt die gesamte Verteilung der Gruppe 2 innerhalb des Interquartilenbereichs der Kontrollgruppe (vgl. Abb. 4.7).

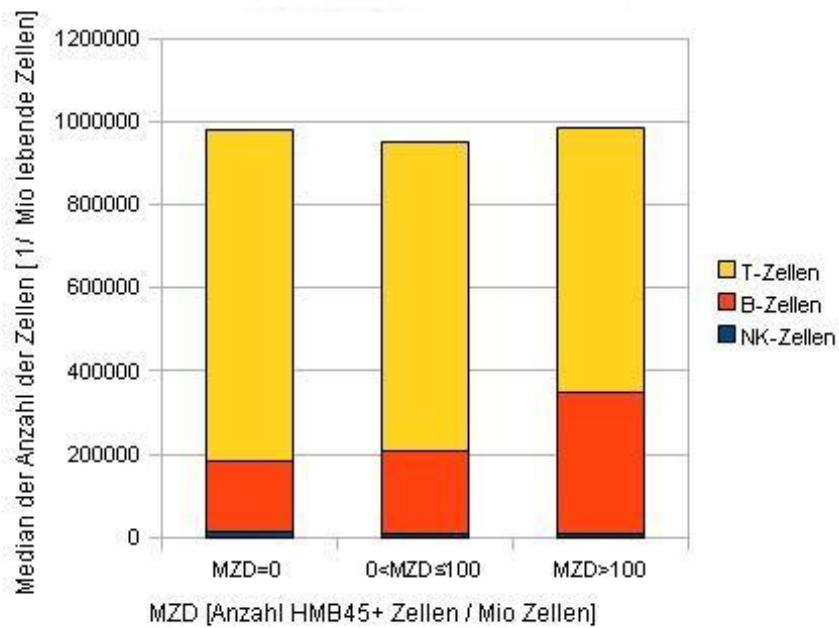
Die Abnahme der dritten Gruppe ist mit 20% deutlich stärker. Der Median der WLK mit  $\text{MZD} > 100$  liegt auf der Höhe des 16%-Quantils (634.163,5) der Kontrollgruppe und ist damit deutlich erniedrigt (vgl. Abb. 4.7).

Außerdem ist zu beobachten, dass sich die Abnahme der T-Zellen und die Zunahme der B-Zellen derart entsprechen, dass die Gesamtsumme der B- und T-Zellen pro Million lebender Zellen auf einem Niveau von 970.000 - 980.000 unabhängig vom melanozytären Befall ungefähr stabil bleibt (vgl. Abb. 4.8).

Berechnet man den Quotienten aus B- und T-Zellen, so befindet sich der von uns gemessene Wert der Kontrollgruppe ( $\text{MZD} = 0$ ) mit 0,22 im physiologischen Bereich



**Abbildung 4.7:** T-Zellen. Hellblau: Kontrollprobe; sie beeinflusst weder N noch die Berechnung des Medians oder des Graphen.



**Abbildung 4.8:** Verteilung der Lymphozyten auf B-, T-, und NK-Zellen

( $\frac{\text{B-Zellen}}{\text{T-Zellen}} = 0,20 - 0,25$  [17]). Für WLK mit  $0 < \text{MZD} \leq 100$  messen wir ein geringfügig erhöhte B:T-Zell-Ratio von 0,27, während sich der Quotient für WLK mit  $\text{MZD} > 100$  mehr als verdoppelt (0,54).

Angesichts dieser interessanten Ergebnisse führten wir zusätzlich zu den ursprünglich geplanten (vgl. 1.3 und 3.3.2) auch hierzu retrospektiv Analysen zur Bestimmung der Signifikanz durch. Der Wilcoxon-Test ergibt für die Erhöhung der B:T-Zell-Ratio in Gruppe 3 im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Signifikanz von  $p = 0,0477$ . Korreliert man die B:T-Zell-Ratio unabhängig von der Gruppeneinteilung mit der MZD, so ergibt sich nach Spearman ein Korrelationskoeffizient von  $\rho = 0,2724$  mit einer Signifikanz von  $p = 0,0640$ .

### 4.2.3 Verteilung der T-Zell-Subpopulationen

Die Quantifizierung der T-Zellsubpopulationen erfolgte im T-Zell-Panel. Da die Etablierung des T-Zell-Panels länger dauerte als die des B- und NK-Zell-Panels, wurde später begonnen WLK auf T-Zell-Subpopulationen zu untersuchen. Daher stehen hierfür zur Auswertung weniger Proben zur Verfügung. Es wurden insgesamt, nachdem manche Proben ausgeschlossen wurden, da mehrere Proben von einem Patienten untersucht worden waren (vgl. 3.3.1), 45 WLK untersucht, von denen sich 36 in der Kontrollgruppe, 3 in Gruppe 2 und 6 in Gruppe 3 befinden.

Wie bereits erwähnt, beziehen sich nun alle Angaben über die Anzahl der Zellen auf eine Million lebender T-Zellen (vital T cells) (vgl. Abb. 3.14).

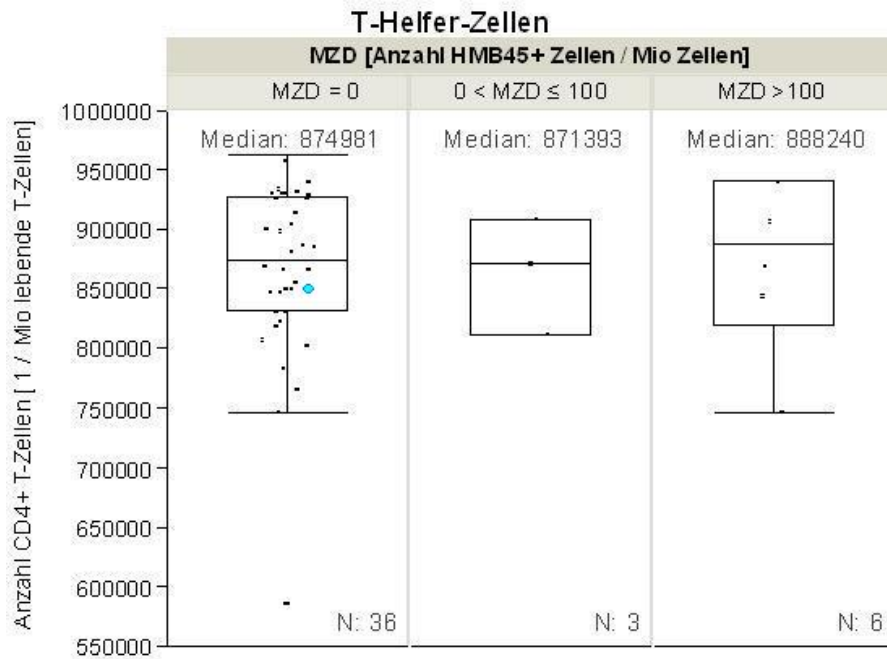
### 4.2.4 T-Helfer- und T-Killer-Zellen

Die Anzahl der  $\text{CD4}^+$  T-Helfer-Zellen verändert sich nicht in Abhängigkeit des melanozytären Befalls. So bleiben die Mediane der drei Gruppen mit rund 875.000, 870.000 und 890.000 ziemlich gleich (vgl. Abb. 4.9). Auch bleiben die Verteilungen der Gruppen 2 und 3 innerhalb der Antennen der Kontrollgruppe und sind kaum von ihr zu unterscheiden.

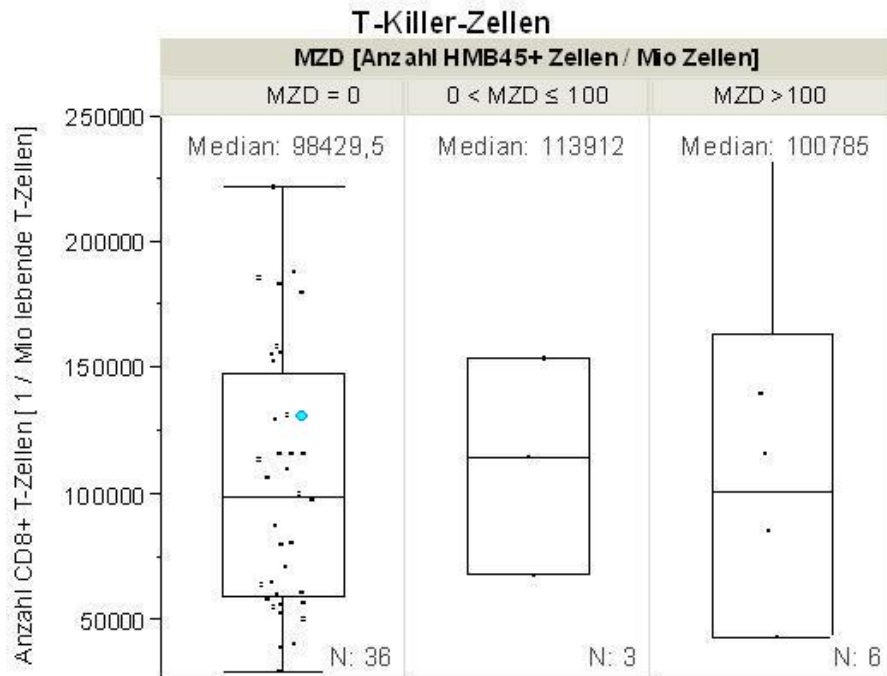
Insgesamt gibt es physiologischerweise deutlich weniger  $\text{CD8}^+$  T-Killer-Zellen als  $\text{CD4}^+$  T-Helfer-Zellen. Sowohl die drei WLK mit  $0 < \text{MZD} \leq 100$  als auch die sechs WLK mit  $\text{MZD} > 100$  verteilen sich wie die WLK der Kontrollgruppe (vgl. Abb. 4.10). Die Mediane aller drei Gruppen liegen bei rund 100.000 T-Killer-Zellen pro Million lebender T-Zellen und verändern sich gerade bei den geringen Fallzahlen von  $N = 3$  bzw.  $N = 6$  erstaunlich wenig. Somit lässt sich in WLK mit melanozytärem Befall keine Veränderung bezüglich der Anzahl der T-Killer-Zellen beobachten.

Damit lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Gesamtzahl der T-Zellen bei melanozytärem Befall abnimmt, wie die Gesamtzahl der B-Zellen zunimmt. Innerhalb der





**Abbildung 4.9:** T-Helfer-Zellen (CD4<sup>+</sup>). Hellblau: Kontrollprobe; sie beeinflusst weder N noch die Berechnung des Medians oder des Graphen.



**Abbildung 4.10:** T-Killer-Zellen (CD8<sup>+</sup>). Hellblau: Kontrollprobe; sie beeinflusst weder N noch die Berechnung des Medians oder des Graphen.

beiden großen Gruppen der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist jedoch keine Veränderung zu beobachten.

## 4.2.5 T-Zell Reifestadien

T-Zellen durchlaufen bei ihrer Reifung verschiedene Entwicklungsstadien (vgl. 1.2.4). Wir betrachten in diesem Kapitel die Ergebnisse der N-, CM-, EM 1-, EM 2-, pE 1-, pE 2-, EM4-, EM3- und E-Zellen. Diese neun Subpopulationen werden getrennt in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> ausgewertet.

### CD4<sup>+</sup> T-Zell Reifestadien

CD4 <sup>+</sup> T-Zellen		MZD [HMB45 <sup>+</sup> Zellen / Mio]		
		0	> 0 ≤ 100	> 100
N		36	3	6
N	Min.	50078	212305	139828
	25%-Quantile	164079	212305	211681
	Median	254867	351906	347775
	75%-Quantile	346237	412140	463418
	Max.	719362	412140	479294
CM	Min.	38753	86831	52253
	25%-Quantile	72195	86831	89278
	Median	109390	100894	108628
	75%-Quantile	142540	114840	127687
	Max.	193296	114840	130053
EM1	Min.	115838	303994	205821
	25%-Quantile	323809	303994	207914
	Median	400736	336838	373120
	75%-Quantile	464341	448853	461455
	Max.	608415	448853	461550
EM2	Min.	0	40	21
	25%-Quantile	78	40	28
	Median	230	573	99
	75%-Quantile	609	1447	143
	Max.	6032	1447	145

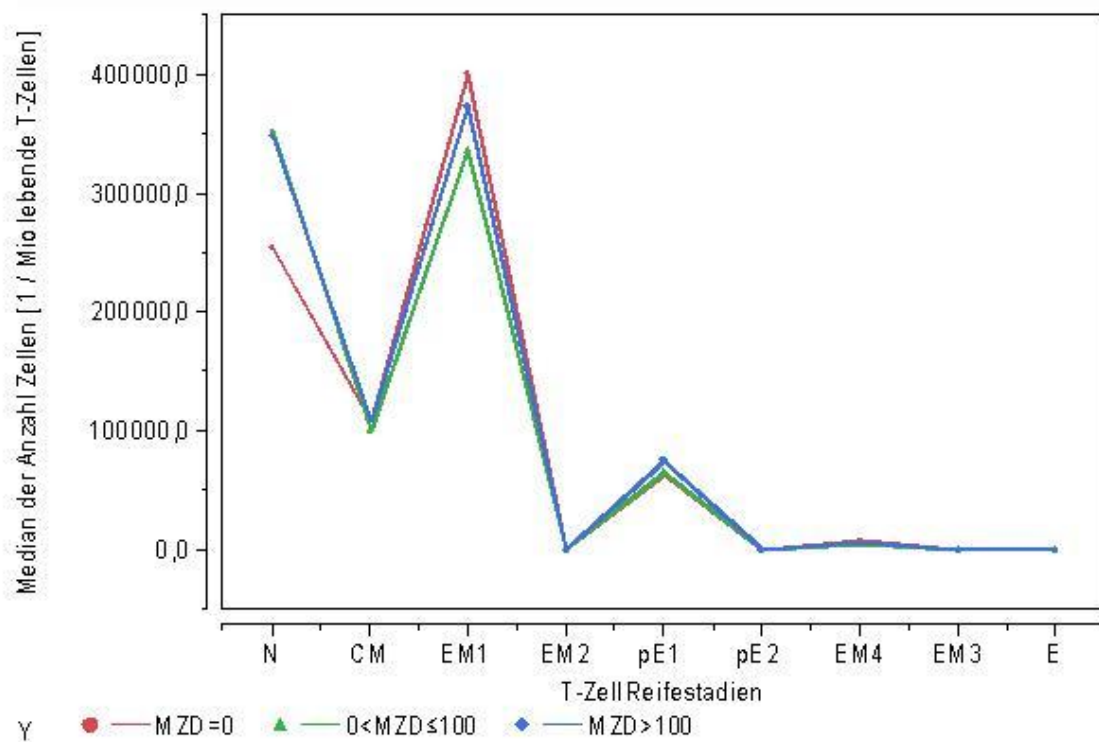
**Tabelle 4.2:** CD4<sup>+</sup> Reifestadien N-EM2

Bei den T-Zell Subpopulationen der CD4<sup>+</sup> Zellen sind bei den meisten Populationen kaum Veränderungen der Zellzahl bei melanozytärem Befall zu beobachten.

Die deutlichste Veränderung ist jedoch bei Naiven T-Zellen zu sehen (vgl. Abb. 4.11). Beide Gruppen mit melanozytärem Befall haben mehr Naive T-Zellen mit Medianen, die

CD4 <sup>+</sup> T-Zellen		MZD [HMB45 <sup>+</sup> Zellen / Mio]		
		0	> 0 ≤ 100	> 100
	N	36	3	6
pE1	Min.	9617	56206	33295
	25%-Quantile	40363	56206	47542
	Median	64635	65494	74711
	75%-Quantile	85877	80916	110360
	Max.	352628	80916	149919
pE2	Min.	0	302	76
	25%-Quantile	41	302	84
	Median	105	764	142
	75%-Quantile	316	2171	156
	Max.	2222	2171	169
EM4	Min.	905	3253	1640
	25%-Quantile	5482	3254	1686
	Median	8871	5292	6517
	75%-Quantile	13832	10908,4	14425
	Max.	37069	10908	14515
EM3	Min.	0	0	0
	25%-Quantile	0	0	5
	Median	22	45	17
	75%-Quantile	95	55	48
	Max.	320	55	50
E	Min.	0	0	0
	25%-Quantile	0	0	0
	Median	0	0	7
	75%-Quantile	3	109	37
	Max.	186	109	38

**Tabelle 4.3:** CD4<sup>+</sup> Reifestadien pE1-E



**Abbildung 4.11:** Neun Reifestadien CD4<sup>+</sup> T-Zellen von unreif nach reif und deren Populationsgröße unterschieden nach melanozytärem Befall (Gruppen 1-3).

jeweils knapp höher als das 75%-Quantil der Kontrollgruppe liegen. Die Verteilungen der beiden Gruppen mit melanozytärem Befall sind sich sehr ähnlich. Obwohl die Erhöhung der Zellzahl insgesamt sehr deutlich scheint, liegen selbst die Maximalwerte der Gruppen 2 und 3 innerhalb der Antennen der Kontrollgruppe.

Der Median der Anzahl der Central Memory Zellen pro Million lebender T-Zellen liegt in allen drei Gruppen bei knapp 110.000 (vgl. Tab. 4.2) und auch die sonstige Verteilung der Werte verändert sich trotz der geringen Fallzahlen bei melanozytärem Befall im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht.

Für Effector Memory 1 und pro Effector 1 Zellen suggeriert Abb. 4.11 deutlich sichtbare Unterschiede in der Zellzahl zwischen WLK mit und ohne melanozytären Befall. Unter Betrachtung der genauen Werte (vgl. Tab. 4.2 und Tab. 4.3) wird allerdings deutlich, dass auch hier sich der Median verglichen mit der Gesamtverteilung kaum verschiebt und jeweils innerhalb des Interquartilenbereichs der Kontrollgruppe bleibt. Der graphische Unterschied in Abb. 4.11 liegt an den insgesamt höheren Zellzahlen, die auch Unterschiede größer erscheinen lassen.

Bei den reiferen Subpopulationen der CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist die Zellzahl insgesamt sehr gering. Es ist kaum eine Veränderung bei melanozytärem Befall festzustellen. Bei Effector Memory 2-, pro Effector 2-, Effector Memory 4- und Effector Memory 3 Zellen bleibt die Anzahl der Zellen im Median in Gruppe 3 in etwa gleich wie die Zellzahl der Gruppe 1, jedenfalls bleiben die Mediane der dritten Gruppe innerhalb des Interquartilenbereichs der Kontrollgruppe (vgl. Tab. 4.3). Die Mediane der zweiten Gruppe sind bei geringer Fallzahl ( $N = 3$ ) zum Teil leicht abweichend.

Auch in der Gruppe der Effector Zellen liegt der Median der Gruppe 3 nur minimal oberhalb des 75%-Quantils der WLK ohne melanozytären Befall (vgl. Tab. 4.3).

Insgesamt ist also innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine Erhöhung der Anzahl der naiven T-Zellen zu beobachten, während bei reiferen T-Zellstadien keine Veränderungen zu sehen sind.

### **CD8<sup>+</sup> T-Zell Reifestadien**

Auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen durchlaufen diese Reifestadien. Wir untersuchten auch hier die einzelnen Subpopulationen auf Veränderungen hinsichtlich der Zellzahl bei melanozytärem Befall. Es zeigen sich grundsätzlich keine großen Unterschiede zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

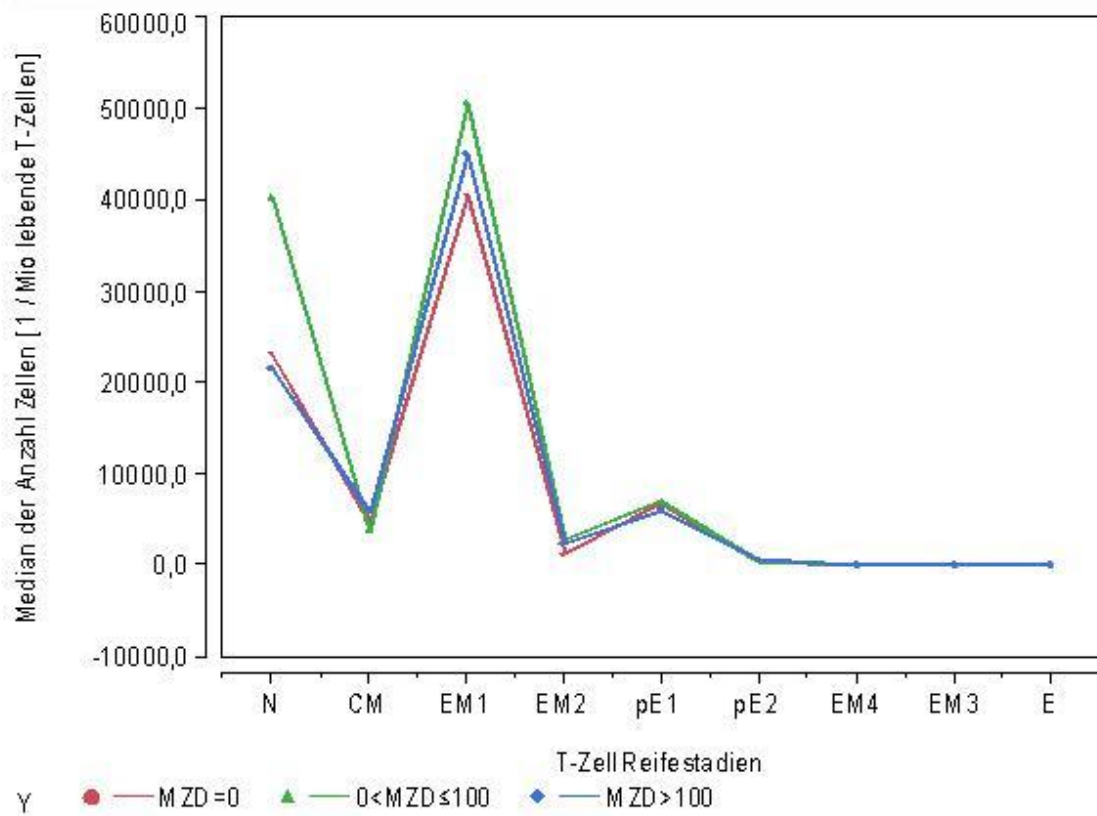
Die Verteilung der Naiven T-Zellen in WLK mit MZD > 100 entspricht hier jedoch der der Kontrollgruppe (vgl. Tab. 4.4). Der Median der Gruppe 2 suggeriert eine deutliche Erhöhung zum Median der Kontrollgruppe (vgl. Abb. 4.12), allerdings liegt selbst das Maximum der zweiten Gruppe nicht weit über dem 75%-Quantil der Kontrollgruppe (vgl. Tab. 4.4).

CD8 <sup>+</sup> T-Zellen		MZD [HMB45 <sup>+</sup> Zellen / Mio]		
		0	> 0 ≤ 100	> 100
	N	36	3	6
N	Min.	431	27107	5713
	25%-Quantile	5982	27107	5929
	Median	23217,5	40345,6	21619
	75%-Quantile	38853	44743	57753
	Max.	106859	44743	66967
CM	Min.	1615	3709	2930
	25%-Quantile	2729	3709	3136
	Median	4743	3818	5926
	75%-Quantile	9232	7532	9951
	Max.	36210	7532	13323
EM1	Min.	9353	17911	29287
	25%-Quantile	27665	17911	29642
	Median	40562	50638	45038
	75%-Quantile	62230	105811	91371
	Max.	128350	105811	161318
EM2	Min.	95	452	1118
	25%-Quantile	740	452	1122
	Median	1284	2828	2429
	75%-Quantile	2273	6327	4885
	Max.	7053	6327	8601

**Tabelle 4.4:** CD8<sup>+</sup> Reifestadien N-EM2

CD8 <sup>+</sup> T-Zellen		MZD [HMB45 <sup>+</sup> Zellen / Mio]		
		0	> 0 ≤ 100	> 100
	N	36	3	6
pE1	Min.	571	4614	2428
	25%-Quantile	3372	4614	2639
	Median	6833	7079	6051
	75%-Quantile	10135	8181	8929
	Max.	78519	8181	9492
pE2	Min.	0	452	284
	25%-Quantile	299	452	416
	Median	509	604	650
	75%-Quantile	985	1200	1012
	Max.	11407	1200	1253
EM4	Min.	0	12	8
	25%-Quantile	13	12	9
	Median	39	45	9
	75%-Quantile	133	109	91
	Max.	1196	109	290
EM3	Min.	0	0	0
	25%-Quantile	0	0	0
	Median	0	0	0
	75%-Quantile	10	45	7
	Max.	210	45	9
E	Min.	0	0	0
	25%-Quantile	0	0	0
	Median	0	0	0
	75%-Quantile	1	0	1
	Max.	223	0	3

Tabelle 4.5: CD8<sup>+</sup> Reifestadien pE1-E



**Abbildung 4.12:** Neun Reifestadien CD8<sup>+</sup> T-Zellen von unreif nach reif und deren Populationsgröße unterschieden nach melanozytärem Befall (Gruppen 1-3).



Bei den Subpopulationen CM, EM1, pE1, pE2, EM4, EM3 und E gibt es wenn überhaupt nur geringfügige Verschiebungen der Mediane der beiden Gruppen mit melanozytärem Befall im Vergleich zu Gruppe 1, sodass die Mediane zumindest innerhalb des Interquartilenbereichs der Kontrollgruppe bleiben (vgl. Tab. 4.4 und Tab. 4.5). Auch werden die Zellzahlen mit zunehmender Reife immer geringer, um bei EM3 und E beinahe in allen WLK bei null zu liegen. Für EM1 gilt, wie auch bei CD4<sup>+</sup> EM1 Zellen, dass die Differenz der Mediane in Abb. 4.12 nicht größer ist als die anderer Gruppen, allein die größere Gesamtzellzahl lässt sie größer erscheinen (vgl. Tab. 4.4).

Bei Effector Memory 2 Zellen liegen die Mediane der Gruppen 2 und 3 jedoch außerhalb des Interquartilenbereichs der Kontrollgruppe. Die Verteilungen unterliegen einer sehr breiten Streuung mit großen Interquartilenbereichen und zeigen insgesamt WLK mit höheren Zellzahlen (vgl. Tab. 4.4).

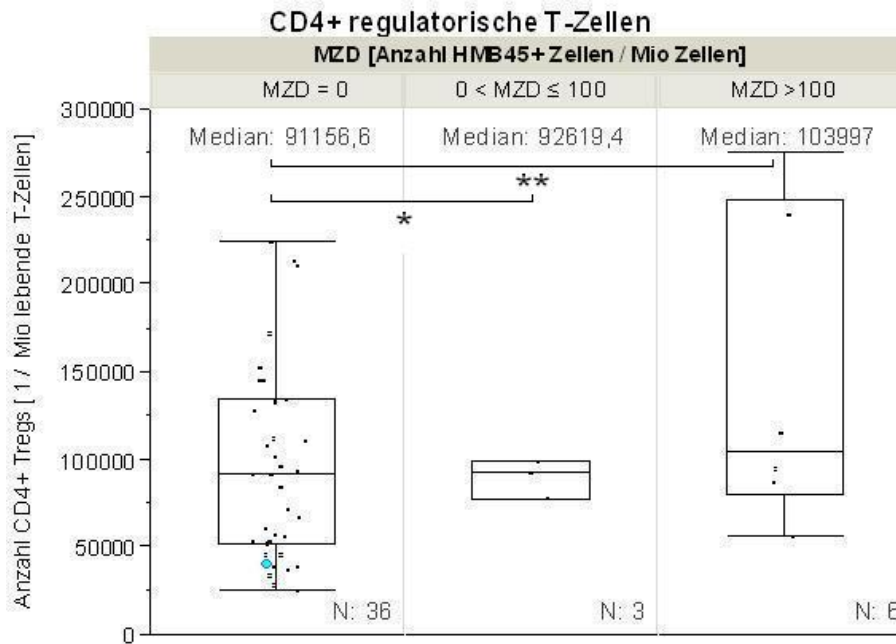
Zusammenfassend lässt sich über die Reifestadien der CD8<sup>+</sup> T-Zellen sagen, dass sie in Populationsgröße denen der CD4<sup>+</sup> T-Zellsubpopulationen entsprechen. Bei melanozytärem Befall zeigt sich eine leichte Vergrößerung der Population der Naiven und der Effector Memory 2 Zellen. Alle anderen Subpopulationen verändern sich nicht.

### 4.2.6 Regulatorische T-Zellen

Die Anzahl der regulatorischen T-Zellen scheint nicht durch Melanozyten beeinflusst zu werden. Die CD4<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen nehmen in ihrem Median minimal zu von rund 91.000 in der Kontrollgruppe zu rund 93.000 in Gruppe 2 und rund 104.000 in Gruppe drei (vgl. Tab. 4.6 und Abb. 4.13). Verglichen mit der gesamten Streuung ist dies jedoch als gleichbleibend zu bezeichnen. Die Erhöhung des 75%-Quantils und damit die Verbreiterung des Interquartilenbereichs der dritten Gruppe ist nicht höheren Werten, sondern der geringen Fallzahl zuzuschreiben.

Nach Wilcoxon ergibt sich für eine Zu- oder Abnahme der Anzahl der CD4<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe für die Gruppe mit  $0 < \text{MZD} \leq 100$  eine Signifikanz von  $p = 0,9370$ , für die Gruppe mit  $\text{MZD} < 100$  eine Signifikanz von  $p = 0,1777$ . Somit wird deutlich, dass die zweite Gruppe der Kontrollgruppe ähnlicher ist als die dritte Gruppe, dennoch ist selbst in Gruppe 3 keine signifikante Erhöhung zu beobachten. Korreliert man die Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-reg-Zellen mit der Anzahl der Melanozyten, so wird nach Spearman ein Korrelationskoeffizient von  $\rho = 0,1697$  ( $p = 0,2650$ ) berechnet.

Zusammenfassend lässt sich über die regulatorischen T-Zellen sagen, dass sich zwar unter Betrachtung der Mediane bei CD4<sup>+</sup> T-reg-Zellen ein Trend nach oben zeigt, unter Berücksichtigung des Gesamtbildes relativiert sich dies jedoch, sodass keine signifikanten ( $p = 0,1777$ ) Veränderungen beobachtet werden können.



**Abbildung 4.13:** CD4<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen. Hellblau: Kontrollprobe; sie beeinflusst weder N noch die Berechnung des Medians oder des Graphen. \*  $P = 0,9370$ ; \*\* $P = 0,1777$

	MZD [HMB45 <sup>+</sup> Zellen / Mio]		
	0	> 0 ≤ 100	> 100
N	36	3	6
Min.	24447	77368	56110
25%-Quantile	51796	77368	79024
Median	91157	92619	103997
75%-Quantile	133750	98105	247779
Max.	223641	98105	275680

**Tabelle 4.6:** CD4<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen

## 4.3 NKT-Zellen

### 4.3.1 Verteilung der NKT-Zellen

Bei einigen WLK untersuchten wir auch die Population der NKT-Zellen. Da diese allerdings erst in einer späteren Variante des B- und NK-Zell-Panels mit gefärbt wurden, stehen uns nur stichprobenartig einzelne Messungen zur Verfügung. Insgesamt wurden 24 WLK auf NKT-Zellen untersucht. 20 dieser WLK hatten  $MZD = 0$ , ein WLK befand sich in Gruppe 2 und 3 WLK in Gruppe 3.

Auch hier beziehen sich wie bei allen Populationen des B- und NK-Zell-Panels alle Angaben über die Anzahl der Zellen auf eine Million lebende Zellen. Lebende Zellen entsprechen den live cells in der Gating Hierarchie des B-Zell-Panels (vgl. Abb. 3.3).

### 4.3.2 NKT-Zell-Ergebnisse

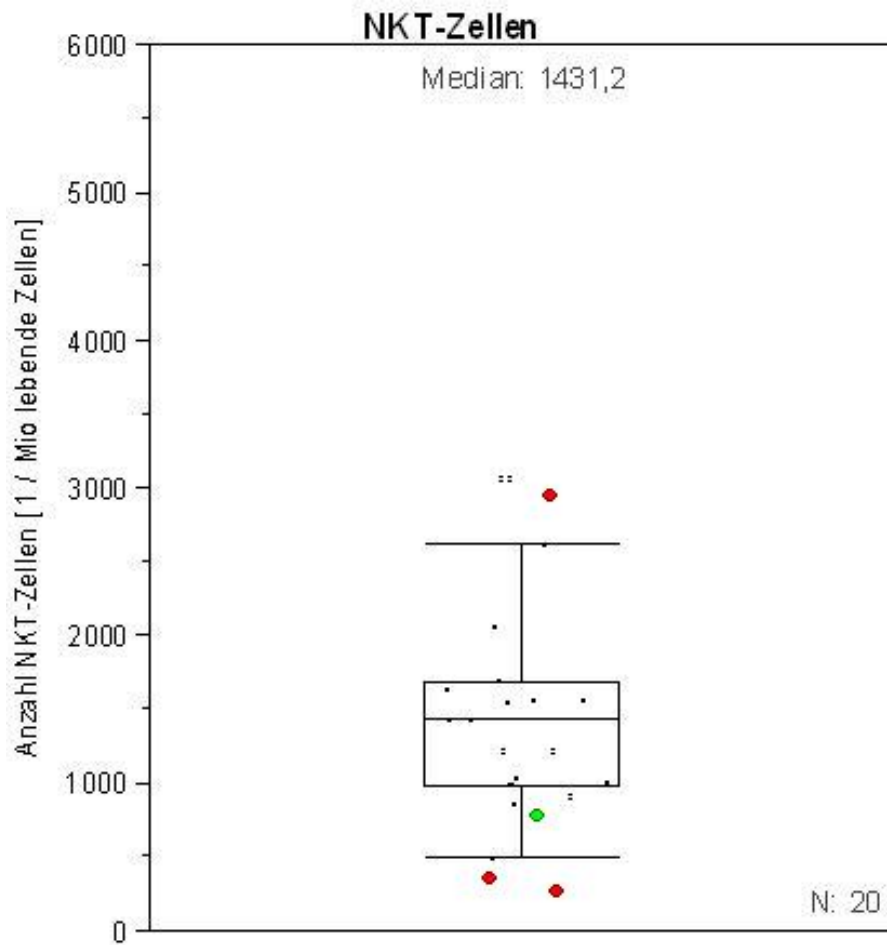
	MZD [HMB45 <sup>+</sup> Zellen / Mio] MZD = 0
N	20
Min.	494
25%-Quantil	987
Median	1431
75%-Quantil	1671
Max.	5690

**Tabelle 4.7:** NKT-Zellen

Die Werte, die in Abb. 4.14 und Tab. 4.7 die Verteilung der WLK hinsichtlich ihrer Größe der NKT-Zellpopulation beschreiben, ergeben sich aus den Werten der Kontrollgruppe. Dies bedeutet, dass auch in Abb. 4.14 die WLK mit melanozytärem Befall zwar grün und rot eingezeichnet sind, die Berechnung des Graphen allerdings nicht beeinflussen.

Zur Auswertung beobachteten wir die Lage der vier WLK mit melanozytärem Befall innerhalb der Verteilung der WLK der Kontrollgruppe. Der Lymphknoten mit  $0 > MZD \leq 100$  liegt mit 759 NKT-Zellen etwas unterhalb des 25%-Quantils der Kontrollgruppe und hat somit eine recht unauffällige Position.

Die drei Lymphknoten der dritten Gruppe beziehen Extrempositionen innerhalb der Verteilung. Mit 261 und 344 NKT-Zellen haben zwei dieser WLK weniger NKT-Zellen als der WLK der Kontrollgruppe mit der geringsten Anzahl (vgl. Tab. 4.7). Der dritte WLK der Gruppe 3 hat 2943 NKT-Zellen und nimmt damit im oberen Bereich der Verteilung eine deutliche Ausreißerposition ein (vgl. Abb. 4.14).



**Abbildung 4.14:** NKT-Zellen; grün: WLK mit  $0 < \text{MZD} \leq 100$ ; rot: WLK mit  $\text{MZD} > 100$ . Der Graph stellt nur die Verteilung der WLK ohne melanozytären Befall dar, ohne die grünen, bzw. roten WLK in seiner Berechnung zu berücksichtigen.

Auch wenn es auffällig ist, dass sich alle Werte der dritten Gruppe auf diesen Extrempositionen befinden, macht dies keine Tendenz zur Zu- oder Abnahme deutlich, da beide Richtungen vertreten sind. Außerdem ist insgesamt anzumerken, dass sich die Werte für Median und den Interquartilenbereich kaum verschieben, wenn man die WLK mit melanozytärem Befall für die Berechnung dazunimmt oder weglässt.

## 4.4 NK-Zellen

### 4.4.1 Verteilung der NK-Zellen

Für die Auswertung der NK-Zellen mussten die selben drei WLK wegen Laserschwankungen am roten Laser ausgeschlossen werden wie für die Auswertung der B-Zellen (vgl. 4.1). Zusätzlich mussten zwei Proben ausgeschlossen werden, da die NK-Zellen selbst nicht ausreichend angefärbt worden waren. Somit wurden von den ursprünglich 84 Proben 21 ausgeschlossen (vgl. 3.3.1).

Die 63 ausgewerteten Proben verteilen sich folgendermaßen auf die drei MZD-Gruppen: Gruppe 1: 49 Proben; Gruppe 2: 7; Gruppe 3: 7 Proben (vgl. Abb. 4.15 und Tab. 4.8).

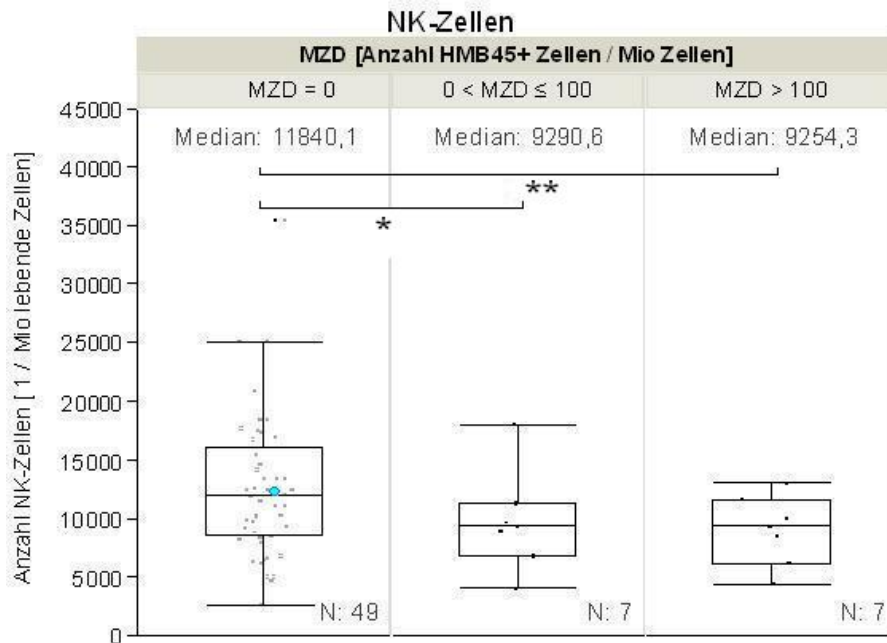
Wie bei den B-Zellen beziehen sich im Folgenden alle Angaben über die Anzahl der Zellen einer bestimmten Zellpopulation auf eine Million lebende Zellen. Lebende Zellen entsprechen dabei den live cells in der Gating Hierarchie des B- und NK-Zell-Panels (vgl. Abb. 3.3).

### 4.4.2 Gesamtzahl der NK-Zellen

	MZD [HMB45 <sup>+</sup> Zellen / Mio]		
	0	> 0 ≤ 100	> 100
N	49	7	7
Min.	2578	4017	4406
25%-Quantile	8463	6701	6032
Median	11840	9291	9254
75%-Quantile	16072	11266	11536
Max.	43139	17959	13007

**Tabelle 4.8:** NK-Zellen

Bei der NK-Zellpopulation ist eine Abnahme des Medians von rund 12.000 Zellen in der Kontrollgruppe auf rund 9.000 in den beiden Gruppen mit melanozytärem Befall zu beobachten (vgl. Abb. 4.15). Auch die Maximalwerte sind in Gruppe 2 und 3 (rund 18.000 und rund 13.000) deutlich niedriger als in der ersten Gruppe (rund 43.000) (vgl. Tab. 4.8).



**Abbildung 4.15:** NK-Zellen. Hellblau: Kontrollprobe; sie beeinflusst weder N noch die Berechnung des Medians oder des Graphen. \* $P = 0,2064$ ; \*\* $P = 0,0969$

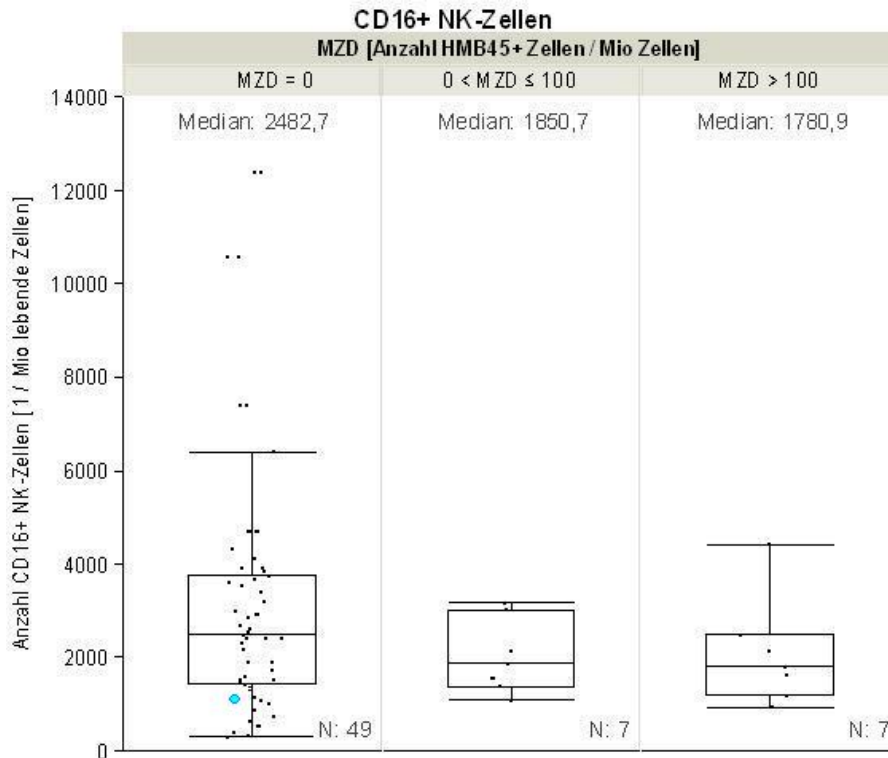
Somit ist in den Gruppen 2 und 3 auch, trotz geringerer Fallzahlen ( $N = 7$ ), sowohl die range als auch der Interquartilenbereich deutlich kleiner als in der Kontrollgruppe (vgl. Abb. 4.15 und Tab. 4.8). Allerdings bleiben beide Mediane der Gruppen mit befallenen WLK innerhalb des Interquartilenbereichs, genauer gesagt auf Höhe des 30%-Quantils (9.143,3), der Kontrollgruppe.

Nach Wilcoxon ergibt sich für Abnahme der NK-Zellpopulation in Gruppe 2 im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Signifikanz von  $p = 0,2064$ . Für Gruppe 3 zu Kontrollgruppe berechnet Wilcoxon  $p = 0,0969$ . Unabhängig von der Gruppenbildung zeigt sich eine geringe negative Korrelation nach Spearman zwischen der Anzahl der NK-Zellen und der MZD mit  $\rho = -0,2596$  ( $p = 0,0399$ ).

#### 4.4.3 NK-Zell-Subpopulationen

##### CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>dim</sup> NK-Zellen

Auch bei CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>dim</sup> NK-Zellen ist diese Abnahme der Zellzahl zu beobachten. Liegt der Median der Kontrollgruppe noch bei rund 2.500 Zellen/Mio, hat er sich sowohl in Gruppe 2 auf 1.850 als auch in Gruppe 3 auf 1.780 Zellen/Mio reduziert (vgl. Abb. 4.16). Damit liegen die Mediane der Gruppen 2 und 3 allerdings noch stets auf der Höhe des 35%-Quantils (1803,1) der Kontrollgruppe.



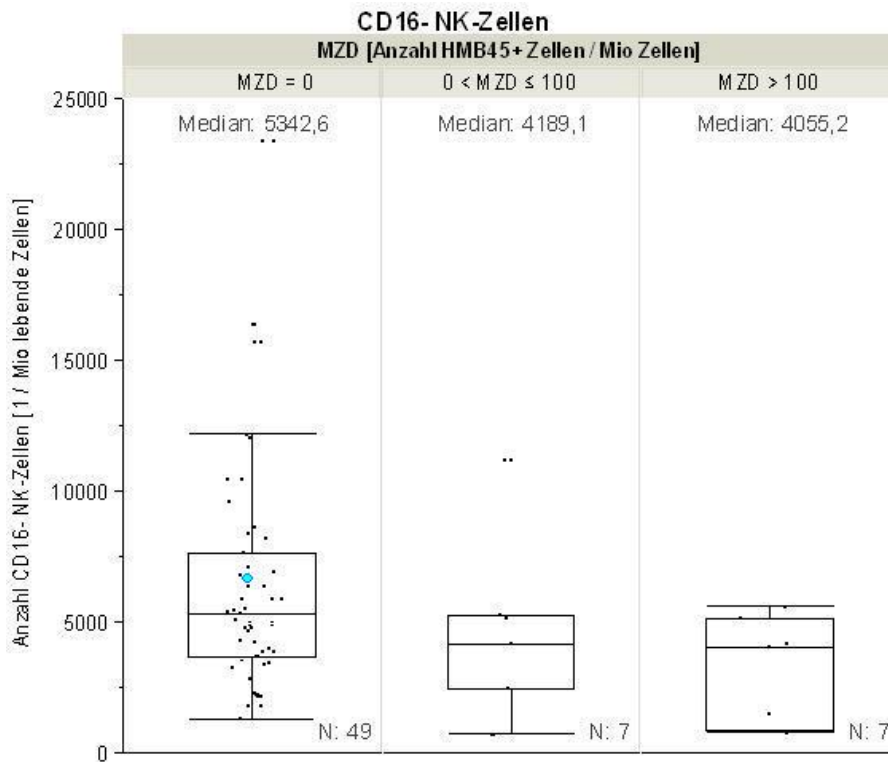
**Abbildung 4.16:** CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>dim</sup> NK-Zellen. Hellblau: Kontrollprobe; sie beeinflusst weder N noch die Berechnung des Medians oder des Graphen.

### CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> NK-Zellen

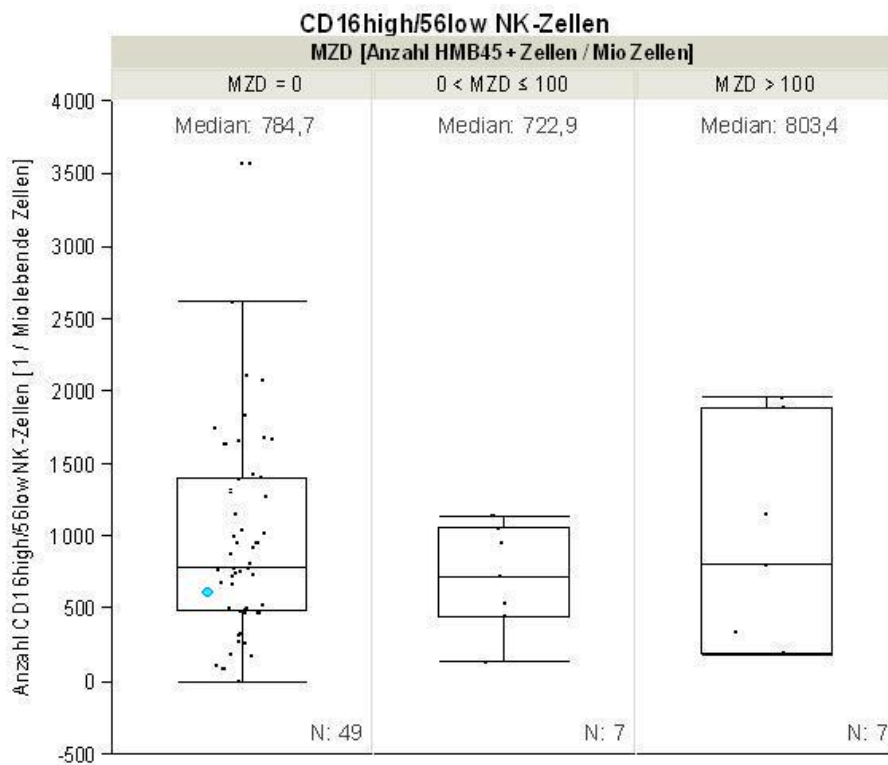
Was CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> NK-Zellen angeht, sind auch hier die Verteilungen innerhalb der Gruppen 2 und 3 recht ähnlich und weisen auch hier niedrigere Zellzahlen auf als die Kontrollgruppe (vgl. Abb. 4.17). Der Median verschiebt sich von rund 5.000 Zellen in Gruppe 1 auf je rund 4.000 Zellen in den Gruppen mit melanozytärem Befall. Dies entspricht in etwa der Höhe des 33%-Quantils (4105,3).

### CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup> NK-Zellen

Innerhalb der Gruppe der NK-Zellen, die für CD16 hoch positiv sind, verändert sich in Abhängigkeit des melanozytären Befalls fast nichts an der Größe der Zellpopulation. Der Median der Gruppe 2 liegt mit rund 720 Zellen/Mio leicht unter, der Median der Gruppe 3 mit rund 800 Zellen/Mio leicht über dem Median der Kontrollgruppe (rund 780 Zellen/Mio), was keine Rückschlüsse auf eine Tendenz zur Zu- oder Abnahme zulässt (vgl. Abb. 4.18).



**Abbildung 4.17:** CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> NK-Zellen. Hellblau: Kontrollprobe; sie beeinflusst weder N noch die Berechnung des Medians oder des Graphen.



**Abbildung 4.18:** CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup> NK-Zellen. Hellblau: Kontrollprobe; sie beeinflusst weder N noch die Berechnung des Medians oder des Graphen.



#### 4.4.4 Zusammenfassung der NK-Zell-Ergebnisse

Insgesamt nehmen die NK-Zellen bei melanozytärem Befall in ihrer Zellzahl etwas ab, wobei diese Abnahme in Gruppe 3 deutlicher ist ( $p = 0,0969$ ) als in Gruppe 2 ( $p = 0,2064$ ). Diese negative Korrelation zeigt sich in einem Korrelationskoeffizienten von  $\rho = -0,2596$  ( $p = 0,0399$ ). Diese Abnahme der Zellzahl ist damit nicht signifikant nach dem korrigierten Signifikanzniveau (vgl. 3.3.3).

In den  $CD56^{bright} CD16^{dim/-}$  NK-Zellsubpopulationen ist diese Abnahme auch, wenngleich weniger deutlich, zu beobachten. In der Population der  $CD56^{dim} CD16^{bright}$  NK-Zellen ist allerdings kein Unterschied festzustellen.

### 4.5 Kontrollprobe

Es wurde auch eine Kontrollprobe untersucht. Anders als alle anderen Proben, stammt diese Probe von einem Patienten, der nicht am malignen Melanom erkrankt ist (vgl. 3.3.1). Wir beobachteten das Verhalten dieses Lymphknotens verglichen mit Lymphknoten von Melanompatienten, deren Lymphknoten nicht von Melanozyten befallen war (Gruppe 1 mit  $MZD = 0$ ). In den BoxPlot Abbildungen des bisherigen Ergebnisteils ist dieser Lymphknoten in hellblau abgebildet, sofern die jeweilige Zellpopulation in diesem Lymphknoten untersucht wurde. Allerdings war er aus den Berechnungen der statistischen Größen der Kontrollgruppe ausgeschlossen.

#### 4.5.1 B-Zellen

Betrachtet man die Gesamtzahl der B-Zellen, die Zahl der  $CD27^+$ ,  $CD25^+$ ,  $CD69^+$  und  $CD25^+/69^+$  B-Zellen der Kontrollprobe, liegen die gemessenen Werte sehr nahe an den Medianen der jeweiligen Lymphknoten in Gruppe 1 (vgl. Abb. 4.1, Abb. 4.2, Abb. 4.3, Abb. 4.4 und Abb. 4.5). An dieser Stelle ist somit kein Unterschied zwischen Proben von für das maligne Melanom gesunden oder daran erkrankten Patienten zu sehen.

Mit 3169 Plasmazellen pro Million lebender Zellen nimmt die Kontrollprobe innerhalb der Verteilung Plasmazellen eine Ausreißerposition ein (vgl. Abb. 4.6).

#### 4.5.2 T-Zellen

Sowohl die Gesamtzahl der T-Zellen, als auch die Zahl der  $CD4^+$  T-Helfer-Zellen und der  $CD8^+$  T-Killer-Zellen, entspricht den Populationsgrößen dieser drei Zellgruppen in Lymphknoten ohne melanozytären Befall (vgl. Abb. 4.7, Abb. 4.9 und Abb. 4.10).

Die Zahl der regulatorischen T-Zellen ist in der Kontrollprobe geringer als in der Mehrzahl der Lymphknoten der Melanompatienten. So liegen  $CD4^+$  regulatorische T-Zellen mit 39785 Zellen auf Höhe des 17%-Quantils der Gruppe 1 (vgl. Abb. 4.13).

Bei den T-Zellsubpopulationen der verschiedenen Reifestadien untersuchen wir wieder getrennt nach  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen.

Unter den  $CD4^+$  Populationen sind mit CM (88.215), pE1 (49.171), E (0) und EM4 (11.881) vier Subpopulationen, die in der Verteilung der Gruppe 1 nicht auffallen, da sie mit ihren Werten in deren Interquartilenbereich liegen. EM1 ist mit 321.735 Zellen pro Million lebender T-Zellen nur knapp unterhalb des 25%-Quantils der ersten Gruppe.

Bei zwei Subpopulationen - N (369.713) und EM3 (199) - nimmt die Kontrollprobe Werte an, die zwar oberhalb des 75%-Quantils, aber immer noch innerhalb der Antennen der ersten Gruppe liegen.

Auffällig sind jedoch pE2- (1.103) und EM2-Zellen (3.888), für deren Werte die Kontrollprobe deutlich Ausreißerwerte annimmt. Die Maximalwerte der Verteilung der Gruppe 1 bleiben allerdings noch höher als die Kontrollprobe.

Betrachtet man die  $CD8^+$  untersuchten Subpopulationen, so ergeben sich auch hier für vier Populationen Werte innerhalb des Interquartilenbereichs der Kontrollgruppe: CM (5.389), pE1 (5.299), E (0) und EM1 (36.331). Abgesehen von EM4-Zellen, die unter den  $CD8^+$  Zellen einen höheren Wert als die erste Gruppe annehmen, sind dies die gleichen vier Subpopulationen wie auch unter den  $CD4^+$  Zellen.

Drei der Subpopulationen - N (72.102), pE2 (1.266) und EM4 (145) - liegen zwar oberhalb des Interquartilenbereichs, allerdings noch innerhalb des Bereichs der Antennen und gelten damit noch nicht als Ausreißer.

Bei der Anzahl der EM3-Zellen (90) würde man innerhalb der Verteilung der ersten Gruppe aber von einem Ausreißerwert sprechen. Bemerkenswert ist auch, dass EM2-Zellen, die auch unter den  $CD4^+$  Zellen eine besonders große Population darstellten, mit 7.378 Zellen pro Million lebender T-Zellen einen höheren Wert annehmen als das Maximum der Gruppe 1.

### **Zusammenfassung der Kontrolle für T-Zellen**

Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Kontrollprobe für die meisten T-Zell-Populationen Zellzahlen hat, mit denen sie im Interquartilenbereich der Lymphknoten von Melanompatienten mit  $MZD = 0$  liegt.

Mit ihrer Anzahl der regulatorischen T-Zellen und EM1  $CD4^+$  Zellen liegt die Kontrollprobe im unteren Bereich der Verteilung, mit ihrer Anzahl der N und EM3  $CD4^+$  Zellen und der N, pE2 und EM4  $CD8^+$  Zellen liegt sie im oberen Bereich der Verteilung. Dies

alles allerdings noch im Bereich der Antennen der Kontrollgruppe.

Ausreißerwerte nimmt die Kontrollprobe für CD4<sup>+</sup> pE2 und EM2 Zellen und CD8<sup>+</sup> EM3 und EM2 Zellen an.

### 4.5.3 NK-Zellen

Die Kontrollprobe hat mit 12339 NK-Zellen pro Million lebender Zellen in etwa die Populationsgröße wie die NK-Zellen ohne melanozytären Befall im Median (vgl. Abb. 4.15).

Für die Anzahl der NK-Zellen, die CD16<sup>-</sup> sind (*Median* = 6791), und der NK-Zellen, die CD16<sup>high</sup>/56<sup>low</sup> (*Median* = 576) sind, fällt die Kontrollprobe in den Interquartilenbereich der Gruppe 1. Somit befindet sich der Wert in einem Bereich, in dem auch die Hälfte aller gemessenen Lymphknoten ohne melanozytären Befall liegen (vgl. Abb. 4.17 und Abb. 4.18).

CD16<sup>+</sup> NK-Zellen liegen mit 993 Zellen pro Million lebender Zellen auf dem 16%-Quantil der ersten Gruppe und damit weiter vom Median entfernt als bei den anderen Subpopulationen der NK-Zellen (vgl. Abb. 4.16).

Insgesamt passt die Kontrollprobe jedoch für alle NK-Zellsubpopulationen in die Verteilung der Kontrollgruppe ohne Ausreißerwerte anzunehmen.

# 5 Diskussion

## 5.1 Methodenkritik

In dieser Arbeit ging es grundsätzlich darum, Auswirkungen melanozytärer Metastasierung auf WLK zu beobachten und mögliche lokale Immunreaktionen zu beschreiben.

Da das Immunsystem ein komplexes Zusammenspiel vieler Faktoren ist, galt es zunächst, sich auf bestimmte Ausschnitte zu begrenzen. Durch die Methode der Durchflusszytometrie entschieden wir uns die zelluläre Komponente des Immunsystems zu untersuchen. Um einen möglichst breit angelegten Querschnitt zu erlangen, nahmen wir mit B-, T- und NK-Zellen alle lymphozytären Reihen in unsere Panel auf.

Dabei gelang es uns, zwei Panel zu etablieren, die eine Beurteilung der B-, T- und NK-Zellen samt einiger ihrer Untergruppen, Aktivierungsmarker und Reifegrade erlauben.

Selbstverständlich können innerhalb zweier Panel nicht sämtliche Untergruppen untersucht werden. Außerdem gibt es immer noch viele Aspekte der zellulären Immunantwort, die nicht untersucht werden konnten. Dendritische Zellen zum Beispiel erfüllen als Antigen präsentierende Zellen wichtige Aufgaben für die T-Zellvermittelte Immunantwort, wurden als Teil der myeloischen Reihe allerdings nicht in das Panel aufgenommen.

Besonders interessant an dieser Arbeit ist die Untersuchung der B-Zellen, da diese im Unterschied zu zum Beispiel dendritischen Zellen, was die Interaktion mit dem malignen Melanom angeht, bisher noch recht wenig erforscht sind.

Neben der Wahl der zu untersuchenden Lymphozytenpopulationen und der dafür benötigten Antikörperkonstellation entwickelten wir Panel mit der passenden Fluorochromkonstellation. Durch die richtige Wahl der Fluorochrome, die mit den gewählten Antikörpern konjugiert sind, etablierten wir mit Hilfe von Titrationen und Kompensation (vgl. 3.1.3) Panel, die mit jeweils 10 bzw. 12 Antikörpern die Quantifizierung von insgesamt 38 Lymphozytenpopulationen zulassen.

Desweiteren gelang es uns, die Aufarbeitung der WLK nach der Disaggregation so zu verbessern, dass die Ausbeute an lebenden, zu messenden Zellen maximiert werden konnte. Hindernisse waren dabei das Verklumpen der Zellen in der Suspension, das durchflusszytometrische Messungen wegen drohender Verstopfung der Messnadel unmöglich macht, und die anfänglich recht hohe Sterberate der Zellen.

Da die Etablierung der beiden Panel Lymphknotenproben und Zeit in Anspruch nahm, konnten letztendlich nicht alle 84 untersuchten WLK in die Auswertung aller Populationen eingeschlossen werden. Die unterschiedliche Anzahl der Proben für die verschiedenen Populationen rührt daher, dass das B- und NK-Zell-Panel früher für endgültige Messungen zur Verfügung stand, während das T-Zell-Panel über einen längeren Zeitraum verändert und verbessert wurde.

Dies macht die Auswertung natürlich uneinheitlich und die Ergebnisse für die verschiedenen Populationen weniger gut miteinander vergleichbar. Um statistisch relevante und signifikante Resultate vorzustellen, müsste man die hier gewonnene Erfahrung nutzen, um gewisse Populationen in größerem Umfang, mit höheren Fallzahlen zu untersuchen.

Deshalb kann es in dieser Arbeit nicht darum gehen, Signifikanzen zu postulieren, sondern darum, einen breiten Querschnitt durch das Immunsystem zu untersuchen und Tendenzen der Veränderung bei melanozytärem Befall der WLK zu beschreiben. Durch weitere Forschung können interessante Beobachtungen dann quantifiziert werden.

Dass aus technischen Gründen, wie zum Beispiel Laserschwankungen, hin und wieder Proben ausgeschlossen werden müssen, wird sich wohl nie ganz vermeiden lassen. Insgesamt wurden aber auch 15 Proben aus der Auswertung ausgeschlossen, da mehrere Proben von einem Patienten stammten (vgl. 3.3.1).

Diese Mehrfachproben von einzelnen Patienten könnten auch die Chance bieten, Unterschiede innerhalb einer Lymphknotenstation zu untersuchen. Hier konnte nicht genau geklärt werden, bei welchem Lymphknoten es sich um den WLK handelt und welcher Lymphknoten ein nachgeschalteter Lymphknoten ist. Wäre dies allerdings bekannt, würden sich gerade solche Proben zur weiteren Erforschung der Immunregulation eignen.

Zu beachten ist außerdem, dass grundsätzlich eine Selektion der Melanompatienten vorgenommen wurde, dadurch dass WLK nur bei Patienten mit einer Tumordicke  $> 1$  mm entnommen wurden. Allerdings muss bei dünneren Melanomen weder von einer Metastasierung noch von immunologischen Veränderungen ausgegangen werden. Es gibt auch bei dieser Auswahl an Patienten eine Mehrheit an WLK mit  $MZD = 0$ . Da die  $MZD$  mit der Tumordicke korreliert [14], dürfte diese Selektion, zumal sie der klinischen Realität entspricht, nicht zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen.

Des weiteren mag eine Selektion durch die Größe der Proben stattgefunden haben. Untersucht werden konnten nur die Lymphknoten, bei denen nach der LDI noch wenigstens eine Million Zellen übrig waren. Es lässt sich also diskutieren, ob Lymphknoten, die immunologisch weniger aktiv waren oder weniger von Melanozyten befallen waren, weniger untersucht wurden.

Auch dies würde aber dafür sprechen, dass der Anteil an Proben mit  $MZD = 0$  kleiner sei, als der Anteil an Proben mit melanozytärem Befall. Dies ist hier offensichtlich nicht

der Fall.

Was die Verblindung der Studie angeht, so ist festzustellen, dass jeder Lymphknoten eine Nummer erhielt und uns während der gesamten Färbung, Messung und Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse außer dieser Nummer nichts über die Probe, geschweige denn die MZD, bekannt war.

Allein bei der Kontroll-Probe war uns bewusst, dass es sich nicht um einen Lymphknoten eines Melanompatienten handelt.

## 5.2 Überblick über die großen Lymphozytenpopulationen

Das menschliche Immunsystem ist ein komplexes Zusammenspiel vieler Mechanismen und Zellpopulationen, die über vielfältige Rezeptoren und Botenstoffe kommunizieren. So lohnt es sich, bevor man einzelne Rezeptoren oder Subpopulationen untersucht, einen Blick auf die grobe Verteilung der Lymphozyten zu werfen.

### 5.2.1 B-Zellen

Was die B-Zellen betrifft, messen wir eine signifikante Erhöhung der gesamten B-Zellzahl bei zunehmender MZD im WLK (vgl. 4.1). Bei einer geringen Anzahl melanozytärer Zellen in WLK ( $0 < \text{MZD} \leq 100$ ) ist bereits eine Tendenz zu erhöhter B-Zellzahl zu sehen. Bei diesen Melanozyten handelt es sich vermutlich um Mikrometastasen, die durch das Immunsystem kontrolliert werden. Diese Annahme passt zu den geringfügigen Veränderungen, die zu beobachten sind.

Bei größerer Zahl an Melanozyten ( $\text{MZD} > 100$ ) ist eine signifikante Zunahme der gesamten B-Zellpopulation zu beobachten ( $p = 0,0052$ ). Diese WLK mit  $\text{MZD} > 100$  (Gruppe 3) beinhaltet vermutlich Zellen, die bereits proliferieren [65], was die im Vergleich zu Gruppe 2 deutliche Zunahme der B-Zellen erklärt.

Dieses Ergebnis passt zu Beobachtungen verschiedener Arbeitsgruppen. Neagu et al. berichteten erst kürzlich von erhöhter B-Zellzahl unter tumorinfiltrierenden Lymphozyten bei Melanomen mit einer Tumordicke  $> 4$  mm (pT4) [66]. Außerdem beobachteten sie statistisch mehr zirkulierende B-Zellen im peripheren Blut von Patienten fortgeschrittener Melanomstadien [66].

Die Zahl der B-Zellen ist zudem von prognostischer Relevanz. So geht eine geringe Zahl melanominfiltrierender B-Zellen mit einer guten Prognose einher [66].

Diese Angaben von Neagu et al. beziehen sich auf Lymphozyten des peripheren Blutes bzw. auf tumorinfiltrierende Lymphozyten. Diese beiden Populationen zeigen ver-

gleichbare Reaktionen in Patienten mit malignem Melanom, allerdings ohne perfekte Übereinstimmung [66]. Unsere Ergebnisse zeigen, dass sich auch in WLK ein vergleichbares Bild zeigt.

Auch für Lymphknoten gibt es Daten, die bezeugen, dass Lymphknoten, die sich näher am Primärtumor befinden und somit vermutlich eher von Mikrometastasen befallen sind, mehr B-Zellen enthalten [67].

Insgesamt gibt es wenige Daten, die von der Gesamtzahl der B-Zellen berichten. Die Messungen, die jedoch publiziert wurden, sprechen alle für eine Zunahme der B-Zellpopulation und stimmen damit mit unseren Ergebnissen überein.

Wie sich die Funktion der B-Zellen in Tumorpatienten unabhängig von ihrer Anzahl verändert, ist bisher wenig verstanden [68]. B-Zellen erfüllen als Antigen präsentierende Zellen in der Interaktion mit T-Zellen eine wichtige Rolle in der Qualität und Effektivität der Immunantwort, außerdem sind sie wichtige Zytokinproduzenten und sind durch ihre Differenzierung zu Plasmazellen auch für die humorale Immunantwort verantwortlich [53]. Es ist also davon auszugehen, dass sie wichtige Funktionen in der Tumorbekämpfung erfüllen und dass sie durch die Antikörperproduktion der Tumorzellen und weitere Interaktion mit infiltrierenden Tumorzellen beeinflusst werden [68]. Ob dieser Einfluss jedoch eher immunsupprimierend oder aktivierend ist, ist nicht abschließend geklärt und sicherlich von der jeweiligen Art der B-Zelle abhängig [68].

Zumindest in vitro aktivieren B-Zellen durch Antigenpräsentation die gegen den Tumor gerichtete T-Zellantwort [68]. Andererseits fördern B-Zellen auch chronische Entzündungen, die wiederum zu Karzinogenese führen können [68].

Es bestehen auch regulatorische, suppressive B-Zellen [68]. Es wäre interessant heraus zu finden, ob diese prognostisch ungünstige Zellpopulation bei zunehmender Tumorlast vergrößert ist und damit zu der beobachteten Zunahme der Gesamtzahl der B-Zellen führt.

Es ist auch unklar, wie funktionstüchtig diese B-Zellen bei melanozytärem Befall sind. Carpenter et al. beobachteten in vitro, dass CD27<sup>-</sup> B-Zellen, also B-Zellen ohne Gedächtnisfunktion, die besonders bei Krebspatienten überexprimiert sind [68], weniger stark auf Stimulation reagieren und auch selbst eingeschränkt dazu in der Lage sind, T-Zellen zu stimulieren [68].

### 5.2.2 T-Zellen

T-Zellen spielen bei der körpereigenen Abwehr von Malignomen eine wichtige Rolle. So wird auch die Immunsuppression, die in WLK von Patienten mit malignem Melanom vermutet wird, vor allem einer supprimierten T-Zellfunktion zugeschrieben.

Unsere Messungen zeigen eine starke Reduktion der T-Zellzahl, die mit zunehmendem melanozytärem Befall deutlicher wird. Es besteht also eine negative Korrelation zwischen

der MZD und der T-Zelldichte in WLK. In Gruppe 2 ( $0 < \text{MZD} \leq 100$ ) liegt der Median zwar noch innerhalb des Interquartilenbereichs der Kontrollgruppe, der Median der dritten Gruppe ( $\text{MZD} > 100$ ) liegt aber schon deutlich niedriger (vgl. 4.2).

Diese Reduktion der T-Zellen passt zu der Vermutung der Immunsuppression in WLK, wo wir für die meisten T-Zell-Populationen ein Abnehmen erwarten. Für manche Populationen mit supprimierender Wirkung, wie zum Beispiel T-reg-Zellen, rechnen wir mit einer Erhöhung der Zellzahl. Insgesamt spricht eine erniedrigte Zellzahl aber für eine reduzierte Immunkompetenz, wenngleich die Zellzahl allein noch nichts über die Funktionstüchtigkeit der Zellen aussagt.

Verschiedene Studien berichten bereits von reduzierter Gesamtzahl der T-Zellen in WLK [53] und allgemein tumorbefallenen Lymphknoten verglichen mit tumorfreien Lymphknoten bei Patienten mit malignem Melanom Stadium II [67].

Außerdem geht eine hohe Zahl an tumorinfiltrierenden T-Zellen - im Unterschied zu B-Zellen - bei Patienten mit malignem Melanom mit einer verbesserten Prognose einher [66]. Die Zahl der T-Zellen unter tumorinfiltrierenden Lymphozyten ist ein Parameter, der sich erst in fortgeschrittenen Stadien verändert und in frühen Melanomstadien noch keine prognostischen Aussagen zulässt [66].

Eine Tendenz nach unten konnten wir in WLK allerdings schon bei einzelnen Melanozyten beobachten. Dies lässt darauf schließen, dass gerade die Immunantwort in WLK von entscheidender Bedeutung für den weiteren Verlauf der Erkrankung ist, wichtiger als die Immunantwort im Primärtumor oder im peripheren Blut.

### 5.2.3 B:T-Zell-Verhältnis

Durch die beschriebene signifikante Zunahme der B-Zellen und die gleichzeitige Abnahme der T-Zellen kommt es zu einer deutlichen Verschiebung des B:T-Zell-Verhältnisses. Interessanterweise bleibt die Gesamtzahl der Lymphozyten bei melanozytärem Befall in etwa gleich, sodass es zu einer innerlymphozytären Verschiebung der Verhältnisse kommt (vgl. Abb. 4.8).

Physiologischerweise beträgt das Verhältnis zwischen B- und T-Zellen 0,20 - 0,25 [17]. Der von uns gemessene Wert von 0,22 befindet sich somit im physiologischen Bereich. Für WLK mit  $0 < \text{MZD} \leq 100$  zeigen unsere Ergebnisse nur eine geringfügige Erhöhung des Quotienten auf 0,27. Dies kann im Rahmen der Messungenauigkeit liegen oder bereits ein Hinweis auf die steigende Tendenz sein. Signifikant höher liegt der Quotient für WLK mit stärkerem melanozytärem Befall ( $\text{MZD} > 100$ ) bei 0,54 und hat sich damit mehr als verdoppelt ( $p = 0,0477$ ).

Da wir mit  $\text{MZD} = 100$  als untere Grenze der dritten Gruppe eine recht niedrige Schwelle für WLK mit "hohem" melanozytärem Befall setzen, bedeutet dies, dass diese



Veränderungen schon bei früher Mikrometastasierung auftreten. T-Zell-Supprimierung und eine signifikante Erhöhung des B:T-Zell-Verhältnisses gehören also zu den frühen immunologischen Veränderungen in WLK von Patienten mit malignem Melanom.

Allerdings machen unsere Ergebnisse auch deutlich, dass diese immunologischen Veränderungen einer Metastasierung nicht voraus gehen. WLK mit  $0 < MZD \leq 100$ , die schon von ersten Melanozyten erreicht wurden, weisen dennoch einen nahezu physiologischen Wert des B:T-Zell-Verhältnisses auf. Somit lässt sich sagen, dass eine Erhöhung des B:T-Zell-Verhältnisses schon bei früher Metastasierung auftritt, ihr aber nicht voraus geht. Sie scheint eine Folge der beginnenden Invasion zu sein.

Es stellt sich die Frage, ob die Zunahme der B-Zellen in der Zunahme immunsupprimierender B-Zellen begründet und Zeichen eines geschwächten Immunsystems ist, oder ob B-Zellen kompensatorisch bei reduzierter T-Zellzahl zunehmen. Neagu et al. beschreiben eine derartige Kompensation durch Verschiebung der Lymphozytenanteile zwischen B- und NK-Zellen und damit zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem [66]. Eine Verschiebung der Lymphozytenanteile zwischen B- und T-Zellen könnten auf eine Kompensation innerhalb des adaptiven Immunsystems hindeuten.

Außerdem wäre es interessant, ob dieser Quotient für WLK prognostisch aussagekräftig ist. Neagu et al. beschreiben entsprechend für den Primärtumor tumorinfiltrierende Lymphozytenpopulationen, die reich an T-Zellen und arm an B-Zellen sind, als prognostisch günstige Konstellation bei Patienten mit malignem Melanom [66]. Es bleibt also zu untersuchen, ob diese prognostische Relevanz auch für Lymphozytenpopulationen in WLK gilt.

Veränderungen des B:T-Zell-Verhältnisses bei Patienten mit immunogenen Tumoren sind sowohl für tumorinfiltrierende Lymphozyten als auch für das periphere Blut und WLK bisher kaum erforscht. Es wäre interessant zu prüfen, ob die Erhöhung dieser Ratio auch bei anderen immunogenen Tumoren zu beobachten ist und wie dieses Wissen für die Weiterentwicklung der Tumorthherapie verwendet werden kann.

## 5.3 B-Zellsubpopulationen

### 5.3.1 B-Gedächtniszellen

B-Zellen, die CD27 an ihrer Oberfläche exprimieren, sind B-Gedächtniszellen [20]. CD27 befindet sich aber auch auf den meisten T-Zellen, NK-Zellen und Plasmazellen [69]. Es gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren [70].

CD27<sup>+</sup> B-Zellen werden schnell aktiviert, können große Mengen an IgA, IgG, IgM und IgG sezernieren [69] und haben über diese Immunglobuline und Zytokine co-stimulato-

rische Wirkung auf B- und T-Zellen [71]. Diese Aktivierung zeigt sich in Proliferation, Rekombination der Immunglobulinklassen und somatischer Hypermutation [71]. Andererseits hemmt CD27 die terminale Differenzierung von aktivierten B-Zellen in Plasmazellen und fördert im Gegenzug die Bildung von B-Gedächtniszellen [17].

Somit wirken CD27<sup>+</sup> B-Zellen vor allem aktivierend [71] und bilden ein immunologisches Gedächtnis, aber auch immunsupprimierend durch die Hemmung der Plasmazellen [70]. Angesichts der vielseitigen Aufgaben des CD27-Rezeptors wären unterschiedliche Reaktionen bei melanozytärem Befall denkbar.

Wir stellen in unseren Messungen eine deutliche Erhöhung der CD27<sup>+</sup> B-Gedächtniszellen in WLK mit MZD > 100 fest. Bei WLK mit nur geringem melanozytärem Befall (Gruppe 2) ist kein Unterschied zur Kontrollgruppe zu sehen.

Diese Messungen, passen zu der Vermutung, dass einzelne Tumorzellen sich auch in immunkompetenten WLK ansiedeln können, allerdings durch das Immunsystem kontrolliert werden. Es ist anzunehmen, dass Melanozyten in WLK die Gedächtnisfunktion des Immunsystems anregen und damit aktivierend wirken. Gleichzeitig spricht dies für eine Hemmung der Plasmazellproduktion und einer damit verbundenen Schwächung des Immunsystems.

Carpenter et al. zeigten, dass bei Patienten mit fortgeschrittenem malignem Melanom und anderen soliden Tumoren eine Dysregulation der B-Zellhomöostase besteht [68]. Dies zeigt sich in einer Reduktion der CD27<sup>+</sup> B-Gedächtniszellen im peripheren Blut, wobei die B-Zelldysfunktion und die Reduktion der CD27<sup>+</sup> B-Zellen korrelieren [68].

Dieser Unterschied zu unseren Ergebnissen könnte zum einen an den vielschichtigen Funktionen der CD27<sup>+</sup> B-Zellen liegen. Außerdem handelt es sich bei unseren Messungen um Gewebeproben des WLK und nicht um peripheres Blut, was andere Zusammensetzungen und Funktionen erwarten lässt. Auch das Patientengut ist unterschiedlich. Wo wir hauptsächlich Patienten in frühen Melanom-Stadien untersuchten, sprechen Carpenter et al. von fortgeschrittenen Stadien.

Das Verhalten dieser CD27<sup>+</sup> B-Zellen bei Tumorpatienten und speziell in WLK von Patienten mit malignem Melanom ist bisher wenig untersucht. Gerade in Anbetracht unserer Ergebnisse würde sich weitere Erforschung dieses Gebietes zur Bestätigung dieser Messungen und zur Klärung ihrer Bedeutung lohnen.

### 5.3.2 CD25<sup>+</sup> B-Zellen

CD25 bezeichnet eine  $\alpha$ -Untereinheit des IL-2-Rezeptors [72] und ist während der B-Zellreifung auf späten Pro-B-Zellen und großen und kleinen Prä-B-Zellen zu finden [17].

Auf B-Zellen gilt CD25 als Aktivierungsmarker und ist charakteristisch für eine immunmodulatorische B-Zellsubpopulation [72]. Die immunmodulatorischen Fähigkeiten

bestehen in der Aktivierung CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen zur Proliferation, in Antigenpräsentation und in verstärkter Produktion von IL-10 [72] [73].

Auch CD27<sup>+</sup> B-Gedächtniszellen können CD25<sup>+</sup> sein [73]. Amu et al. postulieren, dass Gedächtniszellen sogar zu 60% CD25<sup>+</sup> sind, während naive B-Zellen nur zu 10-20% CD25 exprimieren [73]. Insgesamt ist CD25 Marker für Reife und Aktivität von B-Zellen [72].

Wir beobachten bei der Charakterisierung dieser Population eine geringfügige Erhöhung der medianen Zellzahl bei melanozytärem Befall (vgl. Abb. 4.3). Wie auch bei der CD27<sup>+</sup> Population besteht diese Vergrößerung der Zellpopulation erst in Gruppe drei bei WLK mit einer MZD > 100, nicht aber bei geringem melanozytärem Befall (Gruppe 2).

Allerdings ist auch eine sehr breite Streuung der gemessenen Werte bei insgesamt wenigen Messungen ( $N = 7$ ) festzustellen, was Zweifel an der Signifikanz dieser Erhöhung mit sich bringt.

### 5.3.3 CD69<sup>+</sup> B-Zellen

CD69 ist Aktivierungsmarker nicht nur für B-Zellen, sondern auch für T- und NK-Zellen, Makrophagen, Monozyten, verschiedene Granulozyten und Thrombozyten [17] [74] und kann somit auf fast allen Blutzellen exprimiert werden.

Vor allem für die frühe Aktivierungsphase von Leukozyten ist CD69 charakteristisch und wird daher auch als activation inducer molecule (AIM) bezeichnet [75] [74]. Es wirkt als Co-stimulator für Aktivierung, Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen [76] und induziert neben Zytokinproduktion auch zytotoxische Zellaktivität [74].

Über die Herabregulation von Sphingosin-1-Phosphat hemmt CD69 die Lymphozytenzirkulation und damit den Austausch zwischen Lymphozyten in WLK und tumorinfiltrierenden Lymphozyten [66].

Auch bei CD69<sup>+</sup> B-Zellen messen wir tendenziell eine Erhöhung der Zellzahl bei melanozytärem Befall. Allerdings ist hier der Unterschied noch geringer als bei CD27<sup>+</sup> oder CD25<sup>+</sup> B-Zellen, sodass er sich auch rein durch statistische Schwankungen erklären lässt (vgl. Abb. 4.4).

Neagu et al. beobachteten bei Melanompatienten im Stadium III eine Aktivierung der tumorinfiltrierenden T-Zellen mit CD69 als frühen Aktivierungsmarker [66]. Sie untersuchten aber weder Lymphozyten in WLK noch CD69<sup>+</sup> B-Zellen.

Es ist durchaus denkbar, dass CD69 als Aktivierungsmarker nicht nur auf T-Zellen, sondern auch auf B-Zellen in fortgeschrittenen Stadien erhöht ist. Da unsere Messungen bei Patienten in frühen Stadien durchgeführt wurden, ist diese Erhöhung nur ansatzweise zu sehen.

Dass eine geringe Anzahl CD69<sup>+</sup> T-Zellen prognostisch signifikant günstiger ist, publizierten Hernberg et al. schon vor einigen Jahren [77]. Diese Studie unterstreicht das

prognostische Potential zirkulierender T-Zellen mit diesem frühen Aktivierungsmarker.

Es wäre zu prüfen, ob in fortgeschrittenen Melanomstadien auch die Anzahl CD69<sup>+</sup> B-Zellen zunimmt und ob dies prognostisch relevant ist.

### 5.3.4 CD69<sup>+</sup>/25<sup>+</sup> B-Zellen

Die Co-Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 ist insgesamt eher selten, vermutlich da ihrer Expression verschiedene Aktivierungsschritte zu Grunde liegen [17].

In unseren Messungen zeigen sich auch nur sehr wenige B-Zellen für CD25 und CD69 doppelt positiv und eine Veränderung bei melanozytärem Befall ist nicht zu beobachten.

Insgesamt sprechen unsere Messungen, was CD25<sup>+</sup> und CD69<sup>+</sup> B-Zellen angeht, damit gegen eine Immunsuppression in WLK mit melanozytärem Befall. Ob die Immunfunktion auf die Tumorzellen reagiert, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen. Tendenziell zeigt sich hier aber eher eine Aktivierung des Immunsystems, vor allem was CD25 als Aktivierungsmarker angeht. Eine Reduktion der Aktivierungsmarker kann nicht bestätigt werden.

Dies würde darauf hindeuten, dass eine mögliche Immunsuppression in WLK durch das Melanom als immunogenen Tumor, sich eher auf T- als auf B-Zellen konzentriert.

Da B-Zellen in ihrer Funktion allerdings sehr vielschichtig sind und sich nicht auf diese beiden Marker reduzieren lassen, würde sich eine genauere Analyse dennoch lohnen.

### 5.3.5 Plasmazellen

Plasmazellen sind enddifferenzierte Effektorzellen des humoralen Arms des adaptiven Immunsystems [78]. Über viele Aktivierungs- und Differenzierungsschritte entwickeln sie sich aus B-Zellen und sind in der Lage, spezifische Antikörper und Immunglobuline zu produzieren [79]. Damit bilden Plasmazellen die Verbindung zwischen dem zellulären und dem humoralen Anteil des adaptiven Immunsystems. Als enddifferenzierte, ruhende Zellen sind sie nicht in der Lage zu proliferieren oder Tochterzellen zu generieren [79].

Es gibt lang- und kurzlebige Plasmazellen [80]. Langlebige Plasmazellen stellen das humorale Gedächtnis dar, indem sie für persistierende Antikörpertiter sorgen [80]. Sie befinden sich hauptsächlich im Knochenmark [81] und können lebenslang persistieren [78].

In sekundärem lymphatischem Gewebe wie Lymphknoten befinden sich hauptsächlich kurzlebige Plasmazellen kurz nach ihrer Antigenexposition [81]. Sie werden ohne die Hilfe von T-Zellen aktiviert [79] und haben eine Halbwertszeit von nur ungefähr zwei Wochen [78].

Carpenter et al. zeigen, dass fortgeschrittene Stadien des malignen Melanoms mit einer Dysfunktion der B-Zellen im peripheren Blut einhergehen, was sich unter anderem an einer Erhöhung der Plasmazellen zeigt [68].

Auch für melanominfiltrierende Lymphozyten ist beschrieben, dass wenige oder gar keine Plasmazellen mit einer guten Prognose assoziiert sind [66]. Umgekehrt sind Plasmazellen in fast allen Tumorregressionszonen und Ulzerationen zu finden [66].

Da eine Zunahme der Zellzahl für eine Immunaktivierung spricht, ist davon auszugehen, dass progrediente Melanome mit schlechter Prognose durchaus zu einer Immunaktivierung und nicht Suppression führen, die aber nicht mehr ausreicht, um den Tumor zu bekämpfen, oder zu spät kommt.

Unsere Daten zeigen keine Erhöhung der Plasmazellzahl in WLK bei zunehmendem melanomzytärem Befall. Es ist aber auch keine Reduktion der Zellzahl zu sehen.

Ob das Immunsystem an dieser Stelle noch nicht auf die Tumorzellen reagiert oder ob es völlig immunkompetent bleibt wie in WLK ohne Tumorbefall, lässt sich damit nicht eindeutig klären.

### 5.4 T-Helfer- und T-Killer-Zellen

Unsere Messungen ergeben weder für T-Helfer- noch für T-Killer-Zellen Veränderungen bei zunehmendem melanozytärem Befall (vgl. 4.2.4).

CD8<sup>+</sup> T-Killer-Zellen gelten neben NK-Zellen als die besten Effektorzellen in der körpereigenen Tumorabwehr [82]. Gerade tumorantigenspezifische zytotoxische T-Zellen limitieren den metastasierenden Progress [83] und es wurde beobachtet, dass eine Reduktion dieser Zellen zu viszerale Metastasen führt [83]. Umgekehrt aktivieren neoplastische Zellen in Lymphknoten und große Tumorlast bei metastasierten Erkrankungen die durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermittelte Immunantwort [28].

Bei der Auswertung unserer Ergebnisse ist zu beachten, dass sich die Werte der T-Zell-Subpopulation auf die Gesamtzahl der T-Zellen bezieht (vgl. 4.2.1). Da die T-Zellen insgesamt abnehmen, ist davon auszugehen, dass auch die T-Helfer- und T-Killer-Zellen abnehmen. Dass unsere Ergebnisse keine Veränderungen zeigen, bedeutet also lediglich, dass sich an ihrem Verhältnis zueinander nichts verändert.

Für zytotoxische T-Zellen hätten wir zumindest in Gruppe 3 zunehmende Werte erwartet [66]. Vielleicht ist eine erhöhte Zahl CD8<sup>+</sup> Zellen erst in fortgeschritteneren Stadien zu beobachten oder ein Unterschied kann aufgrund der geringen Fallzahl (Gruppe 3:  $N = 6$ ) nicht festgestellt werden.

Bei CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen wären keine starken Veränderungen zu erwarten gewesen. Farzad et al. berichten von signifikant weniger CD4<sup>+</sup> T-Zellen in metastasierten Lymph-

knoten im Vergleich zu tumorfreien Lymphknoten bei entsprechender Zunahme der CD8<sup>+</sup> T-Zellen [67]. Wobei neuere Studien eine leichte, aber nicht signifikante Zunahme der T-Helfer-Zellen beobachten [66].

Interessanter als die einzelnen Werte, ist jedoch der CD4:CD8-Quotient, der nach Bestrahlung oder Chemotherapie, bei Tumorerkrankungen und unter Kortison erniedrigt sein kann [21]. Es konnte gezeigt werden, dass Melanompatienten, die eine Chemoimmuntherapie erhalten, mit einem steigenden CD4:CD8-Quotienten bessere mittlere Überlebensraten zeigen als Patienten mit einem sinkenden Quotienten [84]. Ein zunehmender CD4:CD8-Quotient gilt also als günstiger prognostischer Faktor und umgekehrt [85] [86].

Auch neuere Studien bestätigen, dass der CD4:CD8-Quotient der zirkulierenden Lymphozyten mit dem Melanomstadium korreliert [66]. Fortgeschrittene Tumore zeigen einen niedrigeren Quotienten [67], während eine Zunahme des CD4:CD8-Verhältnisses für eine bessere Prognose spricht [66]. Im Unterschied zur Gesamtzahl der T-Zellen, die sich erst in fortgeschrittenen Stadien verändert, lässt der CD4:CD8-Quotient schon in frühen Stadien prognostische Aussagen zu, unabhängig von Therapie und Stadium [66].

Da nach unseren Messungen die Zahl der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in etwa gleich bleibt, bleibt auch der CD4:CD8-Quotient in den drei Gruppen gleich.

## 5.5 T-Zell Reifestadien

Geht man von veränderter T-Zellfunktion in WLK mit melanozytärem Befall aus, so kann sich dies in veränderter T-Zellzahl, T-Zellfunktion oder in veränderter Verteilung der T-Zellen auf verschiedene Subpopulationen ausdrücken [23]. Hier betrachten wir die Verteilung der T-Zellen auf verschiedene Reifestadien und ziehen darüber Rückschlüsse auf ihre Funktion.

### 5.5.1 Naive T-Zellen

Naive T-Zellen (N) stammen aus dem Thymus, stehen am Anfang ihrer Differenzierung und hatten noch keinen Kontakt mit Antigenen. Bis sie sich durch Antigenkontakt weiter differenzieren, durchwandern sie verschiedenes peripheres lymphatisches Gewebe (vgl. 1.2.4).

Bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen messen wir eine deutliche Zunahme der naiven T-Zellen. So liegen die Mediane der Gruppen mit melanozytärem Befall oberhalb des Interquartilenbereiches der Kontrollgruppe. Unter den CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist dies für WLK mit  $0 < \text{MZD} \leq 100$  ebenso zu beobachten, während WLK mit  $\text{MZD} > 100$  diese Erhöhung nicht zeigen (vgl. 4.2.5).

Diese Zunahme an naiven T-Zellen muss im Verhältnis zur Gesamtzahl der T-Zellen gesehen werden und ist bereits vorbeschrieben. Mortarini et al. beobachteten in Lymphknoten mit Melanometastasen vor allem EM und N T-Zellen, wobei EM T-Zellen etwa ein Drittel und N T-Zellen zwei Drittel ausmachen [28]. T-Gedächtniszellen können nur wenige gefunden werden [28]. Auch bei gesunden, vor allem jungen Menschen, macht die Population der naiven T-Zellen einen großen Anteil aus, da in wenigen Lebensjahren auch weniger Antigenkontakte der T-Zellen stattfinden, die zu einer Reifung führen (vgl. [26], Abb. 4.11 und Abb. 4.12).

Diese deutliche Zunahme naiver T-Zellen in WLK mit melanozytärem Befall spricht für einen mangelnden Antigenkontakt mit Tumorzellen und eine unzureichende Differenzierung zu Effektorzellen [24].

Eine wichtige Besonderheit sind außerdem MART-1 (melanoma antigen recognized by T-cells 1 oder Melan-A) spezifische T-Zellen, die, obwohl sie ein spezifisches Antigen erkennen, einen N Phänotyp aufweisen [26]. Sie exprimieren besonders viel CD27 und weniger CD28, obwohl die Aktivierung und das Prägen von T-Zellen normalerweise ein umgekehrtes Bild zeigen [26]. Auch Mortarini et al. berichten von melanomspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit N-Phänotyp in den meisten melanozytär befallenen Lymphknoten [28].

Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass sich unter der zunehmenden Population der naiven T-Zellen nicht nur verhältnismäßig mehr unreife Zellen als Effektorzellen befinden, sondern auch zunehmende Zahlen an melanomspezifischen T-Zellen.

Da diese MART-1 spezifischen T-Zellen allerdings einen N Phänotypen aufweisen, bleibt fraglich, ob sie sich, trotz ihrer Tumorspezifität, überhaupt adäquat an der Immunantwort gegen Melanomzellen beteiligen können, solange sie nicht zu Effektor-T-Zellen ausdifferenzieren. Somit spricht diese verhältnismäßige Zunahme der naiven T-Zellen in WLK mit melanozytärem Befall insgesamt eher für eine Kompromittierung der Immunantwort.

Eine Abnahme naiver T-Zellen ist aufgrund der Involution des Thymus und des „Verbrauchs“ an N durch das Immunsystem im Laufe des Lebens für ältere Menschen beschrieben [25] [23]. Dies kann zu einer geschwächten Immunantwort bei älteren Patienten führen. Im Umkehrschluss bedeutet dies allerdings nicht, dass eine Zunahme an N für eine starke Immunantwort steht, da diese Zellen noch unreif sind und somit allein die Möglichkeit zu einer Immunantwort bieten.

### 5.5.2 T-Gedächtniszellen

Nicht nur Central Memory T-Zellen sondern auch Effektor Memory 1 (EM1) T-Zellen werden nach aktuellem Forschungsstand zu den T-Gedächtniszellen gezählt (vgl. 1.2.4) [26].

Unsere Messungen zeigen keine Veränderungen der CM Zellzahl in WLK bei mela-

nozytärem Befall. EM1 Zellen nehmen in Gruppe 2 ab, um sich dann aber in Gruppe 3 wieder der Kontrollgruppe anzugleichen (vgl. 4.2.5). Diese Tendenzen können durch die geringe Fallzahl vor allem in der zweiten Gruppe ( $N = 3$ ) erklärt werden.

Vor allem unter den  $CD8^+$  T-Zellen, aber auch den  $CD4^+$  T-Zellen, nehmen Gedächtniszellen mit zunehmendem Alter zu [25]. Dies gilt für CM-Zellen, während EM1-Zellen eher abnehmen [23]. Dies ist durch den zunehmenden Erfahrungsschatz an Antigenkontakten im Laufe des Lebens erklärt. Da das maligne Melanom als Tumor jedoch neu auftritt, ist nicht zu erwarten, dass bereits ein melanomspezifisches immunologisches Gedächtnis besteht. Daher sind aus physiologischer Sicht keine Veränderungen der Zahl an Gedächtniszellen zu erwarten.

Auch Mortarini et al. beobachteten im Vergleich zu N nur sehr wenige EM1 T-Zellen in metastasierten Lymphknoten, wobei sie berichten, dass ein Progress des malignen Melanoms mit einer Akkumulation von T-Gedächtniszellen in tumorinfiltrierten Lymphknoten assoziiert ist [28]. Dass sich dies durch unsere Messungen nicht bestätigen lässt, kann durch den relativ geringen melanozytären Befall unserer Proben bedingt sein.

### 5.5.3 T-Effektorzellen

Innerhalb der Effektorzellen besteht eine große Varianz an unterschiedlichen Zelltypen, die verschieden weit ausdifferenziert sind (vgl. 1.2.4). Das Endstadium bilden die Effektorzellen (E).

Von EM2 bis E Zellen beobachten wir für  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen immer wieder leichte Schwankungen der Zellzahl beim Vergleich von WLK mit melanozytärem Befall mit tumorfreien WLK. Diese leichten Unterschiede bleiben aber meist innerhalb des Interquartilenbereiches der Kontrollgruppe und sind zum großen Teil auf Faktoren wie geringe Fallzahl und erhöhte statistische Wahrscheinlichkeit bei multiplem Testen zurück zu führen.

In reiferen Stadien (pE2, EM4, EM3 und E) wurden insgesamt oft so wenige Zellen gemessen, dass der Median bei null liegt. Diese geringen Zahlen lassen zum einen keine Abweichung nach unten zu, zum anderen kommt es sehr leicht zu Ausreißerwerten, was die statistische Beurteilung erschwert.

Laut unseren Messungen bilden N, CM, EM1 und pE1 die zahlenmäßig stärksten Populationen. Damit sind alle großen Populationen  $CD27$  und  $CD28$  doppelt positiv, was mit physiologischen Werten übereinstimmt [26].

Der einzige auffällige Unterschied der Zellzahlen bei melanozytärem Befall liegt in der Population der  $CD8^+$  EM2 Zellen. Hier ist eine deutliche Zunahme zu sehen, mit Medianen in Gruppe 2 und 3, die außerhalb des Interquartilenbereiches der Kontrollgruppe liegen (vgl. Tab. 4.4).



Auch Anichini et al. untersuchten die T-Zelldifferenzierung in von Tumor befallenen und freien Lymphknoten von Patienten mit malignem Melanom im Stadium III [24]. Sie beobachteten eine Verschiebung der Populationen in Richtung der reiferen EM und TEMRA Zellen, was mit einer erhöhten zytotoxischen Aktivität einhergeht [24]. Dies können unsere Messungen nicht bestätigen.

Es gibt eine steigende Frequenz von MART-1, gp100 und Tyrosinase-Epitopen bei Melanompatienten der Stadien III und IV, verglichen mit den Stadien I und II [28]. Diese melanomspezifischen Antigene aktivieren bei metastasierten Erkrankungen die zytotoxische T-Zellaktivität [28]. Doch selbst wenn eine Differenzierung in tumorinfiltrierten Lymphknoten stattgefunden hat, erreicht die Reifung der antigenspezifischen T-Zellen keine enddifferenzierten Stadien wie EM3 oder E und weder  $CCR7^-CD45RA^+$  noch  $CD27^-CD28^-$  Populationen [28] [27] [22]. Dies ist selbst bei Patienten mit hoher Frequenz an melanomspezifischen Antigenen der Fall [28].

Möglicherweise hindern Zytokine T-Zellen daran, diesen Reifungsprozess bis zum Ende zu durchlaufen [28]. Dies hat zur Folge, dass schließlich, trotz aller melanomspezifischen Antigenkontakte, keine Effektorzellen mit zytolytischen und zytotoxischen Fähigkeiten zur Verfügung stehen. Es könnte auch durch einen Mangel an  $CD4^+$  T-Zellen bedingt sein, dass  $CD8^+$  T-Zellen nicht völlig ausdifferenzieren [28].

Es ist jedenfalls davon auszugehen, dass die Ursache zumindest teilweise lokal in WLK begründet ist, denn im peripheren Blut und in tumorfreien WLK konnten schon alle Reifestadien nachgewiesen werden [28].

Sowohl reifere EM als auch TEMRA Zellen nehmen im Alter zu, sodass bei älteren Menschen das Immunsystem insgesamt aus mehr differenzierten Zellen besteht als aus naiven [23]. Dies spricht dafür, dass eine gesunde Immunreaktion auch bei Melanompatienten eine Zunahme dieser enddifferenzierten Stadien wäre. Woran es genau liegt, dass diese nicht eintritt und wodurch diese Reifung beeinflusst werden kann, wäre interessantes Gebiet weiterer Forschung.

## 5.6 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen regulieren die Immunantwort und können zu Immunsuppression und Tumorentwicklung führen (vgl. 1.2.4) [32].

Sie sind  $CD4^+$ ,  $CD25^+$  (IL-2-Rezeptor) und  $FoxP3^+$  (forkhead box p3) [33]. Allerdings ist keiner dieser Rezeptoren hochspezifisch für regulatorische T-Zellen.

Ursprünglich galten CD4 und CD25 als die Erkennungsmarker regulatorischer T-Zellen. Da bei Immunaktivierung aber auch T-Zellen, die keine regulatorische oder immunsuppressive Funktion erfüllen, CD25 exprimieren [33], wurde FoxP3 als Marker gewählt [87].

Auch dabei gibt es Uneindeutigkeiten, da FoxP3 auch auf CD25<sup>-</sup> Zellen, auf aktivierten T-Zellen und auf Tumorzellen zu finden ist [35]. Daher wird heute auch eine niedrige Expression von CD127 in Kombination mit CD4 und CD25 als T-reg-Marker verwendet [33] [88]. Diese Möglichkeit wurde in der vorliegenden Arbeit gewählt (vgl. 3.2.5).

Weiterer elementarer Marker, der von regulatorischen T-Zellen exprimiert wird, ist CTLA-4. Dieser Ligand bindet an CD80 und CD86 auf dendritischen Zellen. Die immunsuppressive Funktion der T-reg-Zellen korreliert mit der intrazellulären CTLA-4 Expression [33]. Die Heterogenität der Expression dieser Marker lässt annehmen, dass es sich um mehrere Subpopulationen mit verschiedenen Funktionen handelt [33].

Ob WLK immunsupprimiert oder immunkompetent sind, wurde in den letzten Jahren viel diskutiert und es konnte bisher noch kein Konsens gefunden werden [53].

Es gibt Studien, die zeigen, dass bei Patienten mit malignem Melanom metastasierte WLK mehr T-reg-Zellen enthalten als WLK ohne Tumorbefall [35]. Genauso war in tumorpositiven WLK die Zahl der T-reg-Zellen im Vergleich zu anderen Lymphknoten der selben Lymphregion ohne Wächterfunktion und ohne Tumorbefall erhöht [35]. Auch Mohos et al. beobachten, dass T-reg-Zellen ihre Suppressorfunktion in metastasierten Lymphknoten besser ausführen [53].

Bei verschiedenen anderen Tumoren, z.B. dem Mamma- und Lungen-Karzinom, wurde eine Assoziation einer erhöhten T-reg-Zellzahl mit metastasierten WLK festgestellt [53] [35]. In Mausmodellen wurde gezeigt, dass die Frequenz regulatorischer T-Zellen in tumordrainierenden Lymphknoten und der Milz von tumortragenden Mäusen erhöht ist und dass die Immunkompetenz durch ihre Anwesenheit reduziert ist [33].

Neagu et al. publizierten erst kürzlich eine Verdoppelung der T-reg-Zellen unter tumorinfiltrierenden Lymphozyten in fortgeschrittenen Stadien des malignen Melanoms [66]. Genauso beschreiben sie auch eine Zunahme der zirkulierenden T-reg-Zellen, die allerdings nur bei Melanompatienten in Stadium IV, nicht aber in den Stadien I-III, signifikant wird [66].

Im Gegensatz dazu gibt es Studien, die keinen Unterschied in der Anzahl regulatorischer T-Zellen zwischen positiven und negativen WLK bei Melanompatienten feststellen können [89]. Mohos et al. beobachten zwar beim Vergleich zwischen WLK und anderen Lymphknoten im selben Lymphabflussgebiet signifikant mehr T-reg-Zellen in WLK, beim Vergleich zwischen positiven und negativen WLK können sie aber keinen signifikanten Unterschied feststellen [53].

Insgesamt wird die Hypothese, dass WLK funktional kompetent sind, von der Mehrheit der Studien unterstützt [53].

Peripher zirkulierende T-reg-Zellen nehmen mit dem Melanomstadium zu, allerdings korreliert die Zahl der Metastasen nicht mit der Zahl der zirkulierenden T-reg-Zellen [90].

Eine Abnahme der T-reg-Zellen ist im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen nirgendwo beschrieben. Es besteht aber große Einigkeit darin, dass eine hohe Dichte an T-reg-Zellen in positiven, nicht aber negativen, WLK mit Tumorprogression und geringerem Überleben assoziiert sind [53].

Die Dichte der T-reg-Zellen im Primärtumor des malignen Melanoms halten manche für prognostisch relevant [29], andere Studien können keine prognostische Relevanz sehen [91].

Unsere Messungen lassen zwar bei Betrachtung der Mediane der drei gebildeten Gruppen die Erwartung eines Trends nach oben zu, wir beobachten aber keine signifikanten Veränderungen ( $p = 0,2650$ ) der Anzahl der T-reg-Zellen in WLK bei zunehmendem melanozytären Befall (vgl. 4.2.6).

Dies passt zu einigen neueren Studien, die eine Erhöhung der T-reg-Zellzahl wenn überhaupt nur im Stadium IV nachweisen können [53] [89] [90] und mit einer Stimulierung des Immunsystems durch Tumorantigene rechnen [53].

Dennoch steht die Beobachtung durch Studien und auch klinische Erfahrung im Raum, dass WLK immunsupprimiert sind, melanozytäre Metastasierung zulassen und eine reduzierte Zahl an T-Zellen besitzen.

Diese Diskrepanz kann zum Teil durch die Unterschiedlichkeit der Studien erklärt werden. Manche vergleichen befallene mit tumorfreien WLK, andere WLK mit anderen Lymphknoten. Manche Studien messen im peripheren Blut, andere im Primärtumor [53]. Auch die Unterschiedlichkeit des Patientenguts, was Tumorstadien und Tumordicke angeht, ist sehr groß [35]. Wie oben beschrieben, ist auch die Wahl der Oberflächenmarker für T-reg-Zellen nicht einheitlich. Außerdem bieten viele Studien, wie auch unsere, eine relativ geringe Anzahl an Proben [53].

Oft ist gleichzeitig Aktivierung und Dysfunktion zu sehen. Vermutlich ändert sich die Immunaktivität mit der Zeit entsprechend der Tumorprogression [53].

Da unsere Proben hauptsächlich von Patienten früher Melanomstadien stammen, ist es gut möglich, dass eine Immunsuppression durch Erhöhung der Zahl regulatorischer T-Zellen noch nicht signifikant ist, zumal eine Tendenz nach oben in Gruppe 3 eher zu beobachten ist als in Gruppe 2. Unter Betrachtung der momentanen Forschungslage ist die Immunsuppression durch T-reg-Zellen in WLK jedenfalls nicht so ausgeprägt wie vielleicht erwartet.

### 5.6.1 Mögliche Therapieansätze durch regulatorische T-Zellen

Die Modulierung bzw. Hemmung der T-reg-Zellen gilt als vielversprechender Ansatz in der Immuntherapie des malignen Melanoms.

Ein weit erforschtes Beispiel ist die Blockade des CTLA-4 Rezeptors durch Ipilimumab (Anti-CTLA-4 oder Anti-CD152) [92]. CTLA-4 ist auf T-reg-Zellen als hemmender Rezeptor exprimiert [93]. Durch Ipilimumab kann die positive Feedbackschleife zwischen T-reg-Zellen und dendritischen Zellen (vgl. 1.2.4) unterbrochen werden [93].

In Phase-3-Studien konnte gezeigt werden, dass Ipilimumab bei Patienten mit metastasiertem malignem Melanom das Gesamtüberleben verbessert [93]. Inzwischen wurde Ipilimumab für die Behandlung des metastasierten Melanoms zugelassen, obwohl es wegen seiner hohen Toxizität in der Klinik eine genaue Überwachung fordert [92].

Weiterer möglicher Angriffspunkt ist CD25. Allerdings wird CD25 nicht nur von T-reg-Zellen, sondern auch von aktivierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen exprimiert, was diese Therapie unpräzise macht [33].

Erfolgversprechend ist außerdem die Kombination aus Immun- und Chemotherapien, da manche Chemotherapieregime aufgrund der großen Anzahl an T-reg-Zellen ihre Wirkung nicht entfalten können. Außerdem gibt es Chemotherapien, wie zum Beispiel Cyclophosphamid, die das Potential besitzen, T-reg-Zellen zu eliminieren, oder zumindest zu einer bisher nicht weiter spezifizierten Lymphopenie führen [33].

## 5.7 NKT-Zellen

NKT-Zellen gehören zu den regulatorischen T-Zellen und erfüllen sowohl immunregulatorische als auch tumorprotektive Funktionen (vgl. 1.2.5). Sie erkennen Glykolipidantigene, die auf CD1d, einem MHC-I-Molekül, von Antigen präsentierenden Zellen präsentiert werden und reagieren dabei, im Unterschied zu T-Zellen, eher mit präsentierten Lipiden und Glykolipidantigenen als mit Peptiden [41].

Für die Tumorbekämpfung stellen Typ 1 NKT-Zellen (invariant NKT cells) die wichtigste Gruppe dar [94]. Sie dienen als Brücke zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem und bekämpfen Tumorzellen, indem sie IFN- $\gamma$  produzieren. IFN- $\gamma$  aktiviert NK-Zellen dazu, MHC-negative Tumorzellen zu zerstören, und zytotoxische T-Zellen dazu, direkt MHC positive Tumorzellen zu zerstören [95]. Somit können über invariant NKT-Zellen MHC-positive und -negative Tumorzellen eliminiert werden, was ihnen eine einzigartige Stellung einräumt. Beide dieser Tumorzelltypen kommen gleichzeitig in Krebspatienten vor [95].

Allerdings sind die Mechanismen der invariant NKT-Zell-Aktivierung und Immunmodulation bisher wenig verstanden [41].

Unsere Messungen zeigen, dass die Gesamtzahl der NKT-Zellen in Lymphknoten mit melanozytärem Befall im Vergleich mit der Kontrollgruppe Extrempositionen beziehen (vgl. 4.3). Keine der vier Messungen befindet sich im Interquartilenbereich der Kontroll-

gruppe und alle drei Lymphknoten mit  $MZD > 100$  zeigen Ausreißerwerte. Obwohl dies sehr auffällig ist, lässt sich kein klarer Trend daraus ableiten, da die Werte zum Teil besonders hoch, zum Teil aber auch besonders niedrig sind.

Es wäre sehr interessant mit größeren Fallzahlen zu untersuchen, ob bei melanozytärem Befall tatsächlich mit starken Veränderungen der NKT-Zelldichte zu rechnen ist und wovon es abhängt, ob sich die Anzahl der NKT-Zellen nach oben oder unten verschiebt.

Abnormalitäten in Anzahl und Funktion von NKT-Zellen wurden bei Patienten mit verschiedenen Malignomen beobachtet [96]. Für das maligne Melanom ist eine signifikante Reduktion der Anzahl und Funktion von NKT-Zellen im peripheren Blut beschrieben [38], was bei drei von vier Proben mit unseren Messungen übereinstimmt.

Auch Hernberg et al. beobachteten bei Patienten mit malignem Melanom prognostisch relevante Veränderungen der NKT-Zellzahl [77]. Eine geringe NKT-Zelldichte ist demnach mit verbessertem Gesamtüberleben assoziiert [77].

Eine Zunahme der NKT-Zellen ist für Autoimmunerkrankungen, virale Infekte, nach Stammzelltransplantation oder hämatolymphoide Neoplasien im peripheren Blut beschrieben [40].

Unabhängig von ihrer Anzahl bieten NKT-Zellen Möglichkeiten zur Tumorthherapie.

Ein therapeutischer Ansatz kann  $IFN-\gamma$  als Schlüsselzytokin sein (vgl. 5.8) oder  $\alpha$ -Galactosylceramid ( $\alpha$ -Gal-Cer). Dendritische Zellen aktivieren iNKT-Zellen über  $\alpha$ -Gal-Cer zur  $IFN-\gamma$ -Produktion [42]. Dies wird bisher experimentell zur Immuntherapie bei Krebs eingesetzt [42].

Bei Patienten mit malignem Melanom erhofft man sich ein Ansprechen auf diese Therapie, da das maligne Melanom mit einer signifikanten Reduktion der Anzahl und Funktion von NKT-Zellen im peripheren Blut einhergeht [38]. Im Mausmodell konnten signifikant weniger Lungenmetastasen bei einer Behandlung mit  $\alpha$ -Gal-Cer beladenen dendritischen Zellen nachgewiesen werden [38]. Mattarollo et al. konnten  $\alpha$ -Gal-Cer beladene Melanomzellen im Mausmodell durch NKT-Zell abhängige  $IFN-\gamma$ -Produktion in ihrem Wachstum unterdrücken [97].

NKT-Zellabhängige Therapieansätze sollten sich aber nicht nur auf die T-Zell-Aktivierung über  $\alpha$ -Gal-Cer und dendritische Zellen konzentrieren, sondern auch aktivierende wie inhibierende NK-Zell-Rezeptoren, die in der NKT-Zell-Entwicklung und -Aktivierung eine wichtige Rolle spielen, berücksichtigen [98].

Mussai et al. konnten zeigen, dass NKT-Zellen in der Lage sind, die Zahl der myeloischen Suppressorzellen bei Melanompatienten zu senken [94]. Da myeloische Suppressorzellen an Tumorprogression beteiligt sind, können hier auch für Melanompatienten Therapeutika entwickelt werden [94].

Auch IL-27 ist wichtig für die Immunantwort beim malignen Melanom. Da es das

Tumorstammung hemmt und die Anzahl und Aktivität von NK- und NKT- Zellen wieder herstellt, bietet auch IL-27 eine Therapiemöglichkeit [99].

Trotz der großen Erfolge in Mausmodellen [43] konnten diese in vivo bislang nicht erzielt werden [100].

### 5.8 NK-Zellen

NK-Zellen sind als Effektorzellen des angeborenen Immunsystems in der körpereigenen Tumorbekämpfung von großer Bedeutung [101]. Durch Hemmung der Proliferation und Angiogenese limitieren sie Wachstum und Streuung verschiedener Tumore [102]. Außerdem erkennen sie Tumorzellen als Zielzellen [101] und töten die meisten Tumorzellen, die in die Zirkulation gelangen [15]. Desweiteren aktivieren sie das adaptive Immunsystem und sind dabei auch an Antikörper-Prozessierung und -Präsentation beteiligt [101].

Die Vielfalt der Funktionen der NK-Zellen wurde in den letzten 20 Jahren immer weiter entdeckt, so dass sie heute nicht mehr als primitive Killer gelten [45]. Es handelt sich um eine inhomogene Gruppe mit verschiedenen Subpopulationen. Inwieweit NK-Zellen auch immunregulatorische Eigenschaften aufweisen, muss noch erforscht werden [45].

In Lymphknoten befinden sich NK-Zellen im Parakortex in tieferen kortikalen Einheiten in enger Nachbarschaft mit T-Zellen (vgl. 1.2.7) und liegen somit in Regionen des WLK, in denen auch häufig Metastasen lokalisiert sind [51]. Basierend auf Spektralanalysen zeigen Studien Mikrometastasen in Lymphknoten als kleine Cluster von Tumorzellen im Parakortex mit T- und NK-Zellen [103]. Trotz dieser strategisch wichtigen Position scheinen sie nicht effektiv gegen Metastasierung vorgehen zu können [15].

Angesichts dieser Koexistenz von NK- und Tumorzellen in WLK ist es ein sehr interessanter Ansatz, durch NK-Zell-Stimulation Mikrometastasen zu behandeln [15].

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen eine Abnahme der NK-Zellen bei zunehmendem melanozytären Befall (vgl. 4.4). Es scheint dabei kaum einen Unterschied zu machen, wieviele Tumorzellen sich im WLK befinden - die Gruppen zwei und drei sind erstaunlich ähnlich. Mit einer Veränderung von ca. 12.000 nach ca. 9.000 Zellen pro Million ist die Abnahme recht deutlich um rund 22%. Dass sie dennoch nicht signifikant wird (negative Korrelation nach Spearman:  $p = 0,0399$ ), dürfte an der geringen Fallzahl liegen.

Es ist natürlich auch denkbar, dass es sich um eine zufällige Verschiebung nach unten handelt, die durch größere Fallzahlen viel mehr zum Verschwinden gebracht wird, zumal die Mediane der Gruppen 2 und 3 noch auf dem 30%-Quantil der Kontrollgruppe liegen.

Nach unseren Messungen bilden die NK-Zellen mit rund 12.000 Zellen/Mio lebende mononukleäre Zellen 1,2%, was den Angaben in der Literatur (1-5%) entspricht [45].

In verschiedenen Tumoren ist eine reduzierte Anzahl von NK-Zellen bereits beschrieben [101], spezifisch für WLK bisher allerdings nicht. Konjevic et al. berichten bei NK-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit metastasiertem Melanom von reduzierter Aktivität, reduzierter IFN- $\gamma$ -Produktion und von Umverteilungen der Subpopulationen [47]. Außerdem wurde in verschiedenen Studien über das metastasierte maligne Melanom ein signifikant niedrigerer Anteil an NK-Zellen mit den Aktivierungsrezeptoren CD16, NKG2D, NKp30 und NKp46 gesehen als bei Gesunden [101]. Der Unterschied wurde nur in früheren Stadien, nicht aber im Stadium IV, deutlich. Es sind also genau die Zellen reduziert, die die Fähigkeit besitzen Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren [47].

Campillo et al. beschreiben jedoch eine Zunahme der NK-Zellen im peripheren Blut in frühen Melanomstadien (vor allem Stadium III ohne Fernmetastasen). In fortgeschrittenen Stadien war die Zunahme der NK-Zellen weniger deutlich [104]. Genauso ist auch eine Zunahme der NK-Zellen in tumorinfiltrierten Lymphknoten (Stadium II) verglichen mit freien Lymphknoten (Stadium I) beschrieben [67].

In beiden Fällen ist allerdings immer von NK-Zellen im peripheren Blut die Rede, die sich auch von ihren Subpopulationen her ganz anders zusammensetzen als NK-Zellen in Lymphknoten (vgl. 1.2.6). Da die Verteilung der Subpopulationen in Lymphknoten zum peripheren Blut sich spiegelbildlich verhält, wäre es auch nicht verwunderlich, wenn die Reaktion auf melanozytären Befall unterschiedlich ausfällt.

Fuertes et al. zeigten, dass bei Patienten mit malignem Melanom ein hoher Serumspiegel an löslichen NK-Zell-Rezeptorliganden, die von Melanozyten ausgeschüttet wurden, mit einer Herabregulation von NK-Zell-Rezeptoren assoziiert ist. Dies könnte zu niedriger NK-Zell-Aktivität beitragen [105].

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich nicht nur die Rezeptordichte, sondern auch die Gesamtzahl der Zellen reduziert.

Dass NK-Zellen in fortgeschrittenen Neoplasien typischerweise nicht in großer Zahl gefunden werden, dürfte daran liegen, dass sie nicht effektiv in malignes Gewebe einwandern [101]. In WLK sind sie jedoch schon an Ort und Stelle, es sind die Tumorzellen, die einwandern. Dass sie dennoch so schlecht bekämpft werden, könnte an der reduzierten Anzahl liegen.

In einer Studie an Patienten mit Magen- und Kolorektalenkarzinomen wurde gezeigt, dass bei hepatischer Metastasierung der Anteil intrahepatischer NK-Zellen deutlich reduziert ist [106]. So könnte hier ein Mangel an NK-Zellabwehr Metastasen Raum geben.

Ob nun ein Mangel an NK-Zellen Metastasierung ermöglicht oder eher die Tumorzellen erst zu diesem Mangel führen, lässt sich auch durch diese Arbeit nicht abschließend klären.

### 5.8.1 NK-Zell-Subpopulationen

#### CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>dim/-</sup> NK-Zellen

Die weniger reifen Subpopulationen der NK-Zellen, CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>dim/-</sup>, sind in Lymphknoten mit 75-95% aller NK-Zellen deutlich stärker vertreten als im peripheren Blut (10%) [40] (vgl. 1.2.6). Wir haben mit 67% CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>dim/-</sup> NK-Zellen einen etwas geringeren Anteil gemessen.

Es handelt sich also insgesamt um eine Minderheit der NK-Zellen, aber um die Mehrheit in sekundären lymphatischen Organen wie Lymphknoten [45].

Als unreife Vorläuferzellen besitzen sie noch keine KIR, je nach Gruppe wenig oder gar kein CD16 und in Lymphknoten ist auch CD94/NKG2A nur schwach exprimiert. Dies sind Marker, die für die zytotoxische Aktivität der CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup> NK-Zellen benötigt werden. Eine antikörpervermittelte Zytotoxizität ist ohne CD16 nicht möglich [45]. NKp46, der zu den unspezifischen zytotoxischen Rezeptoren gehört, ist allerdings sehr hoch exprimiert. [45] Diese Rezeptoreigenschaften bedeuten für diese Subpopulation eine geringe zytotoxische Aktivität, die nicht antikörpervermittelt, sondern unspezifisch ist.

Als einzige NK-Zellen exprimieren CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>dim/-</sup> NK-Zellen CD117, der zu den hämatopoetischen Stammzellmarkern gehört [45]. Dies unterstreicht die Theorie, dass es sich um Vorläuferzellen der CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup>-Population handelt (vgl. 1.2.6). Durch IL-15 werden sie zur Proliferation angeregt.

CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen produzieren signifikant mehr IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$  und - $\alpha$ , Granulozyten/Makrophagen Kolonie stimulierenden Faktor (GM-CSF), IL-10, IL-13, als CD56<sup>dim</sup> NK Zellen, die davon fast nichts produzieren [107]. Damit sind sie gerade in der frühen Abwehr und für die Gestaltung der adaptiven Immunantwort von großer Bedeutung. Ob sie auch regulatorische Funktionen erfüllen, muss noch erforscht werden [45].

Somit ist festzuhalten, dass in Lymphknoten durch den großen Anteil dieser Subpopulationen wenig zytotoxische Aktivität, dafür aber um so mehr Immunregulation stattfindet.

Unsere Ergebnisse der beiden CD56<sup>bright</sup> NK-Zellpopulationen zeigen beide eine Abnahme der Zellzahl bei melanozytärem Befall, die sich in den Gruppen 2 und 3 der verschiedenen MZD und in den beiden Subpopulationen der CD16<sup>dim</sup> und CD16<sup>-</sup> NK-Zellen gleich stark ausprägt (vgl. 4.4.3).

Diese kollektive Abnahme in allen vier Gruppen, die wir physiologisch als eine Einheit betrachten, spricht dafür, dass es sich hierbei nicht um einen Zufallsbefund handelt. Wir werden daher auch im Folgenden die Ergebnisse der beiden CD56<sup>bright</sup> NK-Zellpopulationen gemeinsam diskutieren, da diese nicht nur in unseren Ergebnissen, sondern auch in der Literatur, eine Einheit bilden [45].



Da die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellpopulationen in Lymphknoten die große Mehrheit ausmachen, ist davon auszugehen, dass die Abnahme der Gesamtzahl der NK-Zellen an der reduzierten Anzahl dieser Subpopulation liegt. Konjevic et al. beschreiben im peripheren Blut eine Zunahme der CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>dim/-</sup> NK-Zellen bei Patienten mit metastasiertem malignem Melanom [47].

Da sich jedoch der Charakter der NK-Zellen im Blut von denen in Lymphknoten deutlich unterscheidet, was sich zum Beispiel an der spiegelbildlichen Verteilung der Untergruppen zeigt, muss diese Beobachtung nicht als Widerspruch zu unseren Messungen gesehen werden. So könnte es zum Beispiel sein, dass bei melanozytärem Befall gerade die großen Populationen abnehmen, während die kleinen eher zunehmen.

Eine Abnahme dieser Populationen wurde im peripheren Blut bei allergischem Asthma, bzw. allergischer Rhinitis, juveniler rheumatoider Arthritis und bei koronaren Herzerkrankungen festgestellt, bei letzterer nehmen allerdings alle NK-Zell-Populationen ab [45]. Zu spezifischen Veränderungen dieser Populationen in Lymphknoten gibt es bisher keine Daten.

Man könnte auch annehmen, dass sich die abnehmende Zellzahl daraus ergibt, dass NK-Zellen bei melanozytärem Befall reifen und sich zu CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup> NK-Zellen weiter entwickeln. Dann müsste aber entsprechend eine Zunahme dieser Population zu beobachten sein, was in unseren Messungen nicht der Fall ist.

### **CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup> NK-Zellen**

CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup> NK-Zellen weisen mehr zytotoxische Aktivität auf und besitzen daher auch mehr Perforine, Granzyme und andere zytolytische Granula [45]. Durch die starke Expression von CD16 (Fcγ-R1IIIA), der an den Fc Teil von IgG bindet, besitzen diese Zellen ein großes Potential an antikörpervermittelter Zytotoxizität [45]. Für die Tumorbekämpfung ist außerdem die MHC-I abhängige Zytotoxizität von großer Bedeutung. Schon das Fehlen eines einzelnen MHC-I Allels, was oft in Tumorzellen vorkommt, aktiviert diese NK-Zellen zur Zytotoxizität [44].

Tumorzellen, die MHC-I Moleküle präsentieren, werden von zytotoxische T-Zellen gefunden. Tumorzellen, die zu wenige MHC-I Moleküle präsentieren, werden von NK-Zellen erkannt. Manche Tumorzellen verlieren nur einzelne MHC-I-Moleküle. Da diese einzelnen aber MHC-I-Moleküle sein könnten, die zytotoxische T-Zellen spezifisch erkannt hätten [46], würde dies der Tumorzelle bereits ein Versteck vor T-Zellen ermöglichen. Bei manchen MHC-I Molekülen reicht es allerdings aus, wenn auch nur eins fehlt, um NK-Zellen angreifen zu lassen, was die Lücke wieder schließt [46].

Obwohl diese Population im Blut mit 90% der NK-Zellen die absolute Mehrheit darstellt, spielt sie in Lymphknoten eine eher untergeordnete Rolle. Angelockt werden sie von akuter

Entzündung und migrieren leichter als CD56<sup>bright</sup> Populationen [45].

Unsere Messungen zeigen keine Veränderungen der Anzahl dieser Subpopulation bei melanozytärem Befall (vgl. 4.4.3). Konjevic et al. beschreiben im Unterschied zu CD56<sup>bright</sup> Populationen eine Abnahme im peripheren Blut bei Patienten mit metastasiertem Melanom [47]. Dies muss, wie oben beschrieben, nicht im Widerspruch zu unseren Messungen stehen, da im Lymphknoten die Verhältnisse anders sind. Die fehlende Reaktion dieser Population auf Tumorzellen könnte daran liegen, dass sie mengenmäßig keine bedeutende Rolle spielt. Wenn verminderte Zytotoxizität bei NK-Zellen in Tumorpatienten beschrieben ist [101], handelt es sich um Angaben zum peripheren Blut, wo zytotoxische NK-Zellen 90% ausmachen und damit von viel größerer Relevanz sind.

### 5.8.2 Mögliche Therapieansätze durch NK-Zellen

Da NK-Zellen sich in WLK in räumlicher Nähe zu Melanommetastasen befinden [15] und da sie in ihrer Funktion schon das Potential zur Tumorbekämpfung tragen, bietet es sich an, sie zur Bekämpfung von Metastasen zu stimulieren.

Obwohl Tumorzellen, im Unterschied zu Viren oder andern Antigenen, sich erst neu gebildet haben, scheinen sie einen Selektionsvorteil zu haben [46] und werden dadurch nicht immer ausreichend vom Immunsystem bekämpft. Es ist schwer festzustellen, wieviele Tumore auftauchen und erfolgreich vom Immunsystem beseitigt werden. Es lohnt sich daher nicht nur zu suchen, wie Tumore sich verstecken, sondern wie sie normalerweise bekämpft werden, um entsprechende Therapien zu entwickeln [46].

So wurde eines der wichtigsten NK-Zelltoxine, tumor necrosis factor- $\alpha$  related apoptosis inducing ligand (TRAIL), als mögliches Chemotherapeutikum entdeckt [44]. Es konnte gezeigt werden, dass TRAIL in Tumorzellen Apoptose induziert. Da dieses Toxin an der körpereigenen Abwehr beteiligt ist, verschont es körpereigene Zellen, was ein großer Vorteil gegenüber anderen Chemotherapeutika ist, die auch nicht-tumoröse Zellen töten [15].

Erst kürzlich publizierten Hervieu et al., dass Dacarbazin nicht nur zytotoxisch, sondern auch immunmodulatorisch über NK-Zellen wirkt [108]. Dacarbazin ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Alkylanzien und gehört seit den 70er Jahren zur Therapie der Wahl bei Patienten mit metastasiertem Melanom, obwohl die Ansprechraten relativ gering sind [109]. Nach diesen Daten führt Dacarbazin in Melanozyten zu einer Überexpression von NKG2D-Liganden. An diese wiederum binden NK-Zellen mit ihrem aktivierenden NKG2D-Rezeptor, wirken zytotoxisch und aktivieren die T-Zell-Antwort über IFN- $\gamma$  [108].

Ein anderer Ansatz ist die Stimulation der NK-Zellen über Interleukine. IL-2 und IL-12 steigern deutlich die Zytotoxizität in allen Gruppen [45]. IL-12 induziert die IFN- $\gamma$  Produktion in NK-Zellen, was über TRAIL und FasL zu Apoptose in verschiedenen

Tumoren führt [44]. IL-21 induziert die zytotoxischen CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> NK-Zellen, die über CD16 Antikörper abhängig Zellen lysieren [44]. Zytokine bewegen die NK-Zellen außerdem zur Migration und Infiltration in den Tumor [44].

Trotz der großen Anzahl an Studien, die die Fähigkeit von NK-Zellen Tumorzellen zu töten in vitro und in vivo im Tierversuch zeigen, bewies die NK-Zell aktivierte Krebstherapie in der Klinik bisher nur in einzelnen Fällen ihre Wirkung [44].

Ein Problem der NK-Zell-Therapie von Lymphknoten-Metastasen ist auch die Unterrepräsentation zytotoxischer NK-Zellen in Lymphknoten, die nach heutigem Forschungsstand den größten antitumorösen Effekt aufweisen. Aus diesem Grund ist die Wirkung der NK-Zell-Therapie in Lymphknoten geringer als im peripheren Blut [45].

Außerdem handelt es sich in Lymphknoten oft um inaktive schlafende Metastasen, die besser vom adaptiven Immunsystem bekämpft werden [15] [101]. Für das Melanom konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen einen größeren Antitumoreffekt gegen "frische" Tumorzellen haben [44].

## 6 Zusammenfassung

Aufgrund seiner frühzeitigen lymphogenen Metastasierung gehört das maligne Melanom zu den besonders bösartigen Tumoren. Lymphknotenmetastasen sind an sich noch nicht tödlich, sie führen aber zu hämatogenen Organmetastasen mit potentiell letalem Ausgang. Außerdem ist das maligne Melanom ein immunogener Tumor, was Kenntnisse über die Interaktion zwischen Melanom und Immunsystem besonders relevant macht. Zur Forschung auf diesem Gebiet sind Wächterlymphknoten ideal, da sie als Ort der frühesten Metastasen und gleichzeitig als Schlüsselstelle der Immunantwort das Organ darstellen, wo Tumorzellen und Immunsystem aufeinander treffen und entscheidend interagieren.

Bisher beschränkt sich die Charakterisierung des Immunsystems auf Untersuchungen des peripheren Blutes oder des Primärtumors, wobei WLK meist histologisch untersucht wurden. Mit der Methode der Lymphknoten-Disaggregations-Immunzytologie bietet sich die Möglichkeit WLK zu untersuchen, die als Zellsuspension vorliegen. Somit können wir mit durchflusszytometrischen Untersuchungen verschiedene Lymphozytenpopulationen in WLK charakterisieren und beobachten, ob und wie sich die Größe dieser Populationen bei zunehmendem melanozytärem Befall verändert.

Unsere Ergebnisse zeigen eine signifikante Zunahme der B-Zellen in WLK mit einer MZD  $> 100$  ( $p = 0,0052$ ). Gleichzeitig nimmt die Anzahl der T-Zellen deutlich ab. Schon in WLK mit  $0 < \text{MZD} \leq 100$  ist diese Abnahme zu sehen, in WLK mit MZD  $> 100$  ist sie noch deutlicher. Damit steigt das B:T-Zell-Verhältnis signifikant auf einen mehr als doppelt so hohen Wert in WLK mit einer MZD  $> 100$  ( $p = 0,0477$ ).

Dies bedeutet, dass schon die Mikrometastasierung mit MZD  $> 100$  zu einer T-Zell-Supprimierung und einer signifikanten Erhöhung des B:T-Zell-Verhältnisses führt. Allerdings geht diese immunologische Veränderung der Metastasierung nicht voraus, was anhand der Proben mit  $0 < \text{MZD} \leq 100$  deutlich wird, die einen nahezu physiologischen Wert des B:T-Zell-Verhältnisses aufweisen. Die prognostische Relevanz des B:T-Zell-Verhältnisses bleibt zu prüfen.

Weiterhin beobachten wir eine Zunahme der B-Gedächtniszellen. Es würde sich lohnen, diese Beobachtung mit einer höheren Fallzahl zu erforschen und auf Signifikanz und prognostische Relevanz zu prüfen.

Auch bei naiven T-Zellen (N) beobachten wir eine deutliche Zunahme bei melano-

zytärem Befall. Möglicherweise besteht zu wenig Antigenkontakt, sodass naive T-Zellen nicht ausreichend zu Effektorzellen ausreifen. Da auch MART-1 spezifischen T-Zellen ein N-Phänotyp zugesprochen wird, wäre es sehr interessant zu untersuchen, ob die Zunahme naiver T-Zellen eine Zunahme an MART-1 spezifischen T-Zellen bedeutet.

Bei WLK mit melanozytärem Befall nimmt die Zahl der NKT-Zellen Ausreißerwerte sowohl oberhalb als auch unterhalb der Kontrollgruppe an. Da dies sehr auffällig ist, würde es sich lohnen, diese Population mit größeren Fallzahlen zu untersuchen, um zu sehen, ob tatsächlich mit starken Veränderungen der NKT-Zelldichte zu rechnen ist, und wovon es abhängt, ob sich die Anzahl der NKT-Zellen nach oben oder unten verschiebt.

Wir beobachten eine deutliche Reduktion der NK-Zellzahl, die allerdings nicht signifikant ist ( $p=0,0399$ ) (vgl. 3.3.3). Diese Abnahme wird nach unseren Messungen in der Gruppe der  $CD56^{bright} CD16^{dim/-}$  NK-Zellen besonders deutlich. Diese NK-Zellsubpopulation stellt in Lymphknoten die große Mehrheit der NK-Zellen dar und wirkt vor allem über Zytokinproduktion immunregulatorisch. Es wäre wichtig zu überprüfen, ob diese Abnahme bei größeren Fallzahlen signifikant wird und ob dies prognostisch relevant ist.

Bei folgenden Lymphozytenpopulationen konnten wir keine Veränderungen beobachten: Der CD4:CD8-Quotient bleibt nach unseren Messungen unverändert. Wir hätten allerdings eine Abnahme mit prognostischer Relevanz erwartet. An dieser Stelle würde es sich lohnen, diese Messungen noch einmal mit höheren Fallzahlen durchzuführen, um diese Erwartungen zu prüfen.

Was die regulatorischen T-Zellen betrifft, so zeigen unsere Ergebnisse einen tendenziellen Anstieg bei melanozytärem Befall. Eine Immunsuppression durch Zunahme der T-reg-Zellen ist demnach nicht so deutlich wie vielleicht erwartet. In der Literatur sind in den letzten Jahren zu diesem Thema sehr unterschiedliche Meinungen und Ergebnisse zu finden, so dass dieses Thema noch nicht endgültig geklärt ist.

Unter B-Zellen mit CD25 und/oder CD69 als Aktivierungsmarker und Plasmazellen sind genauso wenig Veränderungen zu beobachten wie unter den T-Gedächtniszellen (CM und EM1), den T-Effektorzellen (EM2, pE1, pE2, EM4, EM3 und E) und den  $CD56^{dim} CD16^{bright}$  NK-Zellen.

Der gesamte Überblick über lymphozytäre Populationen mit einigen ihrer Subpopulationen, der in dieser Arbeit gewonnen werden konnte, zeigt uns, dass die bislang beschriebene T-Zell-Supprimierung in WLK bei Patienten mit malignem Melanom auch mit einer signifikanten Erhöhung der B-Zellen einher geht. Diese bei früher Mikrometastasierung auftretende Verschiebung des B:T-Zell-Verhältnisses scheint Folge der beginnenden melanozytären Invasion zu sein und ihr nicht voraus zu gehen. In Zukunft gilt es in der Melanomforschung sich nicht nur auf T-Zellen zu konzentrieren, sondern auch die Aktivität der B-Zellen zu untersuchen.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Gernot Rassner. *Dermatologie Lehrbuch und Atlas*. 9. Tübingen: Urban und Fischer, 2009.
- [2] O. Braun-Falco, G. Plewig, H.H. Wolff, W.H.C. Burgdorf und M. Landthaler. *Dermatologie und Venerologie*. 5. Springer, 2005.
- [3] Deutsches Krebsforschungszentrum. *Krebsinzidenz in Deutschland 2008*. website. 14.11.2013. URL: [http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/mort\\_5.html](http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/mort_5.html).
- [4] M. Neagu, C. Constantin, G. Manda und I. Margaritescu. "Biomarkers of metastatic melanoma". In: *Biomarkers in Medicine*, vol. 3, no. 1, pp. 71–89, 2009. (2009).
- [5] Deutsches Krebsforschungszentrum. *20 häufigste Krebstodesursachen in Deutschland 2010*. website. 14.11.2013. URL: <http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/organ.html>.
- [6] P. Altmeyer und Paech. *Enzyklopädie der Dermatologie, Allergologie, Umweltmedizin*. 2. Springer, 2013.
- [7] L. Jansen, O.E. Nieweg, J.L. Peterse, C.A. Hoefnagel, R.A. Olmos und B.B. Kroon. "Reliability of sentinel lymph node biopsy for staging melanoma." In: *Br J Surg*. 2000 Apr 87(4):484-489. (2000).
- [8] H. Snow. "Melanotic cancerous disease". In: *Lancet* 2, 872-874 (1892) (1892).
- [9] S.J. Neuhaus, M.A. Clark und J.M. Thomas. "Dr. Herbert Lumley Snow, MD, MRCS (1847–1930): The Original Champion of Elective Lymph Node Dissection in Melanoma". In: *Annals of Surgical Oncology September 2004, Volume 11, Issue 9*, pp 875-878 (2004).
- [10] A.J Cochran, R.R. Huang, J Lee, E. Itakura, S.P.L. Leong und R. Essner. "Tumor-induced immune modulation of sentinel lymph nodes". In: *Nature Reviews*, Vol.6, September 2006, 659-670 (2006).
- [11] D.L. Morton, D.R. Wen, J.H. Wong, J.S. Economou, L.A. Cagle, F.K. Storm, L.J. Foshag und A.J. Cochran. "Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma." In: *Arch Surg*. 1992 Apr;127(4):392-399 (1992).

- [12] H. Starz. "Pathology of the sentinel lymph node in melanoma." In: *Semin Oncol* 31:357-362 (2004).
- [13] A. Ulmer und G. Fierlbeck. *Nachweis okkultes Melanomzellen im Wächterlymphknoten. Kapitel 21, S. 245-252 aus Management des Melanoms von Garbe, C. aus der Reihe Onkologie aktuell*. 1. Springer, 2006.
- [14] A. Ulmer, J.R. Fischer, S. Schanz, K. Sotlar, H. Breuninger, K. Dietz, G. Fierlbeck und C.A. Klein. "Detection of Melanoma Cells Displaying Multiple Genomic Changes in Histopathologically Negative Sentinel Lymph Nodes". In: *Clin Cancer Res* 11(15) August 1, 2005, 5425-5432 (2005).
- [15] S. Chandrasekaran, M.J. McGuire und M.R. King. "Sweeping lymph node micrometastases off their feet: an engineered model to evaluate natural killer cell mediated therapeutic intervention of circulating tumor cells that disseminate to the lymph nodes". In: *The Royal Society of Chemistry 2013, LabChip*, DOI: 10.1039/c3lc50584g (2013).
- [16] T.L. Whiteside. "Down-regulation of zeta-chain expression in T cells: a biomarker of prognosis in cancer?" In: *Cancer Immunol Immunother* (2004) 53: 865-878 (2004).
- [17] C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport und M.J. Shlomchik. *Immunobiology the immune system in health and disease*. 6. Garland Science, 2005.
- [18] Florian Horn, Isabelle Moc, Nadine Schneider, Christian Grillhösl, Silke Berghold und Gerd Lindenmeier. *Biochemie des Menschen*. 3. Thieme, 2005.
- [19] Wolfgang Piper. *Innere Medizin*. 1. Heidelberg: Springer, 2007.
- [20] K. Agematsu, S. Hokibara, H. Nagumo und A. Komiyama. "CD27: a memory B cell marker." In: *Immunol Today* 2000;21:204-6. (2000).
- [21] Gerd Herold. *Innere Medizin*. Köln: Arzt + Information, 2013.
- [22] V. Appay, P.R. Dunbar, M. Callan, P. Klenerman, G.M. Gillespie, L. Papagno, G.S. Ogg, A. King, F. Lechner, C.A. Spina, S. Little, D.V. Havlir, D.D. Richman, N. Gruener, G. Pape, A. Waters, P. Easterbrook, M. Salio, V. Cerundolo, A.J. McMichael und S.L. Rowland-Jones. "Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections." In: *Nat Med*. 2002 Apr;8(4):379-85. (2002).
- [23] S. Koch, A. Larbi, E. Erhovanesion, D. Özcelik, E. Naumova und G. Pawelec. "Multiparameter flow cytometric analysis of CD4 and CD8 T cell subsets in young and old people". In: *Immunity and Aging* 2008, 5:6 (2008).

- [24] A. Anichini, A. Scarito, A. Molla, G. Parmiani und R. Mortarini. “Differentiation of CD8+ T Cells from Tumor-Invaded and Tumor-Free Lymph Nodes of Melanoma Patients: Role of Common gamma-Chain Cytokines”. In: *The Journal of Immunology*, 2003, 171: 2134-2141. (2003).
- [25] T. Fülöp, A. Larbi und G. Pawelec. “Human T Cell Aging and the Impact of Persistent Viral Infections”. In: *Front Immunol.* 2013; 4: 271. (2013).
- [26] P. Romero, A. Zippelius, I. Kurth, M.J. Pittet, C. Touvrey, E.M. Iancu, P. Corthesy, E. Devereux, D.E. Speiser und N. Rufer. “Four Functionally Distinct Populations of Human Effector-Memory CD8+ T Lymphocytes”. In: *The Journal of Immunology*, 2007, 178: 4112–4119. (2007).
- [27] P. Champagne, G.S. Ogg, A.S. King, C. Knabenhans, K. Ellefsen, M. Nobile, V. Appay, G.P. Rizzardi, S. Fleury, M. Lipp, R. Förster, S. Rowland-Jones, R.P. Sékaly, A.J. McMichael und G. Pantaleo. “Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes.” In: *Nature*. 2001 Mar 1;410(6824):106-11. (2001).
- [28] R. Mortarini, A. Piris, A. Maurichi, A. Molla, I. Bersani, A. Bono, C. Bartoli, M. Santinami, C. Lombardo, F. Ravagnani, N. Cascinelli, G. Parmiani und A. Anichini. “Lack of Terminally Differentiated Tumor-specific CD8+ T Cells at Tumor Site in Spite of Antitumor Immunity to Self-Antigens in Human Metastatic Melanoma”. In: *Cancer Research* 63, 2535–2545, May 15, 2003 (2003).
- [29] A. Facciabene, G.T. Motz und G. Coukos. “T-Regulatory Cells: Key Players in Tumor Immune Escape and Angiogenesis”. In: *Cancer Res* 2012;72:2162-2171. (2012).
- [30] M.J. Smyth, M.W.L. Teng, J. Swann, K. Kyparissoudis, D.I. Godfrey und Y. Hayakawa. “CD4+ CD25+ T Regulatory Cells Suppress NK Cell-Mediated Immunotherapy of Cancer”. In: *J Immunol* 2006; 176:1582-1587 (2006).
- [31] Simon Metenou und Thomas B. Nutman. “Regulatory T Cell Subsets in Filarial Infection and Their Function”. In: *Front Immunol.* 2013, 4: 305, p.1-26 (2013).
- [32] A. Dasgupta und R. Saxena. “Regulatory T cells: a review.” In: *Natl Med J India*. 2012 Nov-Dec;25(6):341-51. (2012).
- [33] U. Petrusch, C.H. Poehlein, S.M. Jensen, C. Twitty, J.A. Thompson, I. Assmann, S. Puri, M.G. LaCelle, T. Moudgil, L. Maston, K. Friedman, S. Church, E. Cardenas, D.P. Haley, E.B. Walker, E. Akporiaye, A.D. Weinberg, S. Rosenheim, T.S. Crocenzi, H.M. Hu, B.D. Curti, W.J. Urbani und B.A. Fox. “Cancer Immunotherapy: The Role Regulatory T cells Play and What can be Done to Overcome their Inhibitory Effects”. In: *Curr Mol Med*. 2009 August ; 9(6): 673–682. (2009).



- [34] Guillaume Darrasse-Jèze und Katrina Podsypanina. “How Numbers, Nature, and Immune Status of Foxp3+ Regulatory T-Cells Shape the Early Immunological Events in Tumor Development”. In: *Front Immunol.* 2013, 4: 292, p.1-13 (2013).
- [35] M.W. Ma, R.C. Medicherla, M. Qian, E. Vega Saenz de Miera, E.B. Friedman, R.S. Berman, R.L. Shapiro, A.C. Pavlick, P.A. Ott und N. Bhardwaj. “Immune response in melanoma: an in-depth analysis of the primary tumor and corresponding sentinel lymph node.” In: *Mod Pathol* 2012, 25:1000–1010. (2012).
- [36] D.M. Zhao, A.M. Thornton, R.J. DiPaolo und E.M. Shevach. “Activated CD4+ CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes”. In: *Blood.* 2006;107: 3925-3932 (2006).
- [37] F. Scheuplein, A. Thariath, S. MacDonald, A. Truneh, R. Mashal und R. Schaub. “A Humanized Monoclonal Antibody Specific for Invariant Natural Killer T (iNKT) Cells for In Vivo Depletion”. In: *Plos one* 8(9): e76692, p.1-11 (2013).
- [38] S. Fujii. “Exploiting dendritic cells and natural killer T cells in immunotherapy against malignancies.” In: *Trends in Immunology Vol.29 No.5, 2008, p. 242-249* (2008).
- [39] P.J. Brennan, M. Brigl und M.B. Brenner. “Invariant natural killer T cells: an Innate activation scheme linked to diverse effector functions.” In: *Nat Rev Immunol* 13:101-117. (2013).
- [40] S.E. Gibson, S.H. Swerdlow und R.E. Felgar. “Natural killer cell subsets and natural killer–like T-cell populations in benign and neoplastic B-cell proliferations vary based on clinicopathologic features”. In: *Human Pathology* (2011) 42, 679–687 (2011).
- [41] L. Van Kaer. “NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions.” In: *Curr Opin Immunol* 19: 354-364 (2007).
- [42] L. Van Kaer, V.V. Parekh und L. Wu. “Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptive immunity”. In: *Cess Tissue Res* 343:43-55.PubMed:20734065 (2011).
- [43] M. Taniguchi, T. Tashiro, N. Dashtsoodol, Hongo N. und H. Watarai. “The specialized iNKT cell system recognizes glycolipid antigens and bridges the innate and acquired immune systems with potential applications for cancer therapy”. In: *International Immunology, Vol. 22, No. 1, pp. 1–6* (2009).
- [44] L. Zamai, C. Ponti, P. Mirandola, G. Gobbi, S. Papa, L. Galeotti, L. Cocco und M. Vitale. “NK Cells and Cancer”. In: *J. Immunol., 2007, 178, 4011–4016.* (2007).

- [45] A. Poli, T. Michel, M. Theresine, F. Andres E. Hentges und J. Zimmer. "CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset". In: *2009 Blackwell Publishing Ltd, Immunology, 126, 458–465* (2009).
- [46] E.O. Long. "Tumor cell recognition by natural killer cells". In: *CANCER BIOLOGY, Vol. 12, 2002: pp. 57–61* (2002).
- [47] G. Konjevic, K. Mirajaic Martinovi, V. Jurisic, N. Babovic und I. Spuzic. "Bio-markers of suppressed natural killer (NK) cell function in metastatic melanoma: decreased NKG2D and increased CD158a receptors on CD3-CD16+ NK cells". In: *Biomarkers, vol. 14, no. 4, pp. 258–270, 2009.* (2009).
- [48] M.A. Cooper, T.A. Fehniger und M.A. Caliguri. "The biology of human natural killer-cell subsets." In: *Trends Immunol 2001: 22:633-640* (2001).
- [49] S. Cooley, D.J. Weisdorf, L.A. Guethlein, J.P. Klein, T. Wang, C.T. Le, S.G. Marsh, D. Geraghty, S. Spellman, M.D. Haagenson, M. Ladner, E. Trachtenberg, P. Parham und J.S. Miller. "Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia." In: *Blood. 2010 Oct 7;116(14):2411-2419.* (2010).
- [50] R. Lüllmann-Rauch. *Taschenlehrbuch Histologie. 2.* Thieme, 2006.
- [51] M. Bajénoff, B. Breart, A.Y.C. Huang, H. Qi, J. Cazareth, V.M. Braud, R.N. Germain und N. Glaichenhaus. "Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging". In: *J.Exp. Med. Vol. 203, No. 3, March 20, 2006 619–631* (2006).
- [52] G. Parmiani, C. Castelli, P. Dalerba und T. Mortarini. "Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? where are we going?" In: *JNCI 94:805-818* (2002).
- [53] A. Mohos, T. Sebestyén, G. Liskay, V. Plótár, S. Horváth, I. Gaudi und A. Ladányi. "Immune cell profile of sentinel lymph nodes in patients with malignant melanoma – FOXP3+ cell density in metastatic sentinel nodes is associated with unfavorable clinical outcome". In: *Journal of Translational Medicine 2013, 11:43* (2013).
- [54] J. Ahlers. "Identifikation einer Zellpopulation mit Stammzellmarkern mit Korrelation zum klinischen Verlauf bei Diagnosestellung akuter kindlicher Leukämien". Diss. Tübingen: Eberhard Karls Universität Tübingen, 2009.
- [55] A. Raffael. "Grundlagen der analytischen Durchflusszytometrie". In: *Labor-Medizin 11(1988) 89-97* (1988).

- [56] L.A. Herzenberg, J. Tung, W.A. Moore, L.A. Herzenberg und D.R. Parks. “Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed”. In: *Nature Immunology Vol. 7 Nr. 7 (July 2006) 681-685* (2006).
- [57] J. Tung, K. Heydari, R. Tirouvanziam, B. Sahaf, D.R. Parks, L.A. Herzenberg und L.A. Herzenberg. “Modern Flow Cytometry: apractical approach”. In: *Clin Lab Med 27 (2007) 453-468* (2007).
- [58] J. Tung, D. R. Parks, W. A. Moore, L. A. Herzenberg und L. A. Herzenberg. “New approaches to fluorescence compensation and visualization of FACS data”. In: *Clinical Immunology 110 (2004) 277-283* (2004).
- [59] S. Deaglio, K. Mehta und F. Malavasi. “Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors.” In: *Leuk Res, Jg. 25, H. 1, S. 1–12.* (2001).
- [60] H. Charbonneau, N. K. Tonks, K. A. Walsh und E. H. Fischer. “The leukocyte common antigen (CD45): a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase.” In: *Proc Natl Acad Sci U S A, Jg. 85, H. 19, S. 7182–7186.* (1988).
- [61] F. Lacombe, F. Durrieu, A. Briais, P. Dumain, F. Belloc und E. Bascans. “Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia.” In: *Leukemia, Jg. 11, H. 11, S. 1878–1886.* (1997).
- [62] J. Bortz. *Statistik für Sozialwissenschaftler*. 5. Berlin: Springer, 1999.
- [63] J. Bortz und N. Döring. *Forschungsmethoden und Evaluation für Human- und Sozialwissenschaftler*. 3. Berlin: Springer, 2002.
- [64] J.W. Tukey. *Exploratory Data Analysis*. 1. München: Addison Wesley, 1977.
- [65] S. Scheitler, I. Hodak, K. Dietz, P. Lehnert, V. Naimer, B. Polzer, U. Hohenleutner, C. Hafner, M. Berneburg, P. Rümmele, M. Hoffmann, A. Ulmer und C.A. Klein. “Early dissemination and evolutionary dynamics in systemic melanoma progression”. In: *Nature; submitted* (2014).
- [66] M. Neagu, C. Constantin und S. Zurac. “Immune Parameters in The Prognosis and Therapy Monitoring of Cutaneous Melanoma Patients: Experience, Role, and Limitations”. In: *Hindawi BioMed Research International, Volume 2013, p.1-13* (2013).
- [67] Z. Farzad, A.J. Cochran, W.H. McBride, J.D. Gray, V. Wong und D.L. Morton. “Lymphocyte Subset Alterations in Nodes Regional to Human Melanoma”. In: *CANCER RESEARCH 50, 3585-3588, June 15, 1990* (1990).

- [68] E.L. Carpenter, R. Mick, A.J. Rech, G.L. Beatty, T.A. Colligon, M.R. Rosenfeld, D.E. Kaplan, K.M. Chang, S.M. Domchek, P.A. Kanetsky, L.A. Fecher, K.T. Flaherty, L.M. Schuchter und R.H. Vonderheide. "Collapse of the CD27+ B-Cell Compartment Associated with Systemic Plasmacytosis in Patients with Advanced Melanoma and Other Cancers". In: *Clin Cancer Res* 2009;15(13), p.4277-4287, July 1, 2009 (2009).
- [69] K. Agematsu, H. Nagumo und F.C. Yang. "B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production." In: *Eur J Immunol* 1997;27:2073–9. (1997).
- [70] C. Claus, C. Riether, C. Scheurch, M.S. Matter, T. Hilmenyuk und A.F. Ochsenbein. "CD27 Signaling Increases the Frequency of Regulatory T Cells and Promotes Tumor Growth". In: *Cancer Res*; 72(14) July 15, 2012 (2012).
- [71] A.J. De Roos, D.K. Mirick, K.L. Edlefsen, A.Z. LaCroix, K.J. Kopecky, M.M. Madeleine, L. Magpantay und O. Martínez-Maza. "Markers of B-Cell Activation in Relation to Risk of Non-Hodgkin Lymphoma". In: *Cancer Res*; 72(18) September 15, 2012 (2012).
- [72] M. Brisslert, M. Bokarewa, P. Larsson, K. Wing, L.V. Collins und A. Tarkowski. "Phenotypic and functional characterization of human CD25 B cells." In: *Immunology* 2006;117:548–57. (2006).
- [73] S. Amu, A. Tarkowski, T. Dörner, M. Bokarewa und M. Brisslert. "The Human Immunomodulatory CD25+ B Cell Population belongs to the Memory B Cell Pool". In: *Scandinavian Journal of Immunology* 66, 77–86 (2007).
- [74] Guan-Xuan Lin et al. "Leucocyte typing VII". In: *Oxford University Press.*: 519–524 (2002).
- [75] R. Marzio, J. Mauël und S. Betz-Corradin. "CD69 and regulation of the immune function." In: *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1999 Aug;21(3):565-82. (1999).
- [76] S.F. Ziegler, F. Ramsdell und M.R. Alderson. "The activation antigen CD69." In: *Stem Cells.* 1994 Sep;12(5):456-65. (1994).
- [77] M. Hernberg, P.S. Mattila, M. Rissanen, J. Hansson, S. Aamdal, L. Bastholt, H. von der Maase, H. Schmidt, U. Stierner und J. Tarkkanen. "The prognostic role of blood lymphocyte subset distribution in patients with resected high-risk primary or regionally metastatic melanoma." In: *J Immunother.* 2007 Oct;30(7):773-9. (2007).
- [78] M. Shapiro-Shelef und K. Calame. "Regulation of plasma-cell development." In: *Nat. Rev. Immunol.* 5: 230–242. (2005).

- [79] B.P. O'Connor, M.W. Gleeson, R.J. Noelle und L.D. Erickson. "The rise and fall of long-lived humoral immunity: terminal differentiation of plasma cells in health and disease". In: *Immunol Rev.* 2003 August ; 194: 61–76. (2003).
- [80] O. Winter, C. Dame, F. Jundt und F. Hiepe. "Pathogenic long-lived plasma cells and their survival niches in autoimmunity, malignancy, and allergy." In: *J Immunol.* 2012 Dec 1;189(11):5105-11. (2012).
- [81] M.N. Njau, J.H. Kim, C.P. Chappell, R. Ravindran, L. Thomas, B. Pulendran und J. Jacob. "CD28-B7 interaction modulates short- and long-lived plasma cell function." In: *J Immunol.* 2012 Sep 15;189(6):2758-67. (2012).
- [82] L. Zitvogel, A. Tesniere und G. Kroemer. "Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion". In: *Nature Reviews Immunology*, vol. 6, no. 10, pp. 715–727, 2006. (2006).
- [83] J. Eyles, A.L. Puaux, X. Wang, C. Toh B. Prakash, M. Hong, T.G. Tan, L.C. Zheng L. and Ong, Y Jin, M. Kato, A. Prévost-Blondel, P. Chow, H. Yang und J.P. Abastado. "Tumor cells disseminate early, but immunosurveillance limits metastatic outgrowth, in a mouse model of melanoma". In: *J Clin Invest.* 2010;120(6):2030-2039. (2010).
- [84] M.M. Hernberg, M.H. Hahka-Kemppinen und S.O. Pyrhönen. "The prognostic role of CD4+ and CD8+ lymphocytes during chemoimmunotherapy in metastatic melanoma." In: *Melanoma Res.* 2004 Dec;14(6):493-500. (2004).
- [85] T. Muhonen, M. Hahka-Kemppinen, S. Pakkala und S. Pyrhönen. "Decreasing CD4/CD8 ratio during prolonged four-drug chemotherapy plus interferon treatment for metastatic melanoma." In: *J Immunother Emphasis Tumor Immunol.* 1994 Jan;15(1):67-73. (1994).
- [86] M. Hernberg, T. Muhonen, J.P. Turunen, M. Hahka-Kemppinen und S. Pyrhönen. "The CD4+/CD8+ ratio as a prognostic factor in patients with metastatic melanoma receiving chemoimmunotherapy." In: *J Clin Oncol.* 1996 May;14(5):1690-6. (1996).
- [87] H. Yagi, T. Nomura, K. Nakamura, S. Yamazaki, T. Kitawaki, S. Hori, M. Maeda, M. Onodera, T. Uchiyama, S. Fujii und S. Sakaguchi. "Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells." In: *Int Immunol.* 2004 Nov;16(11):1643-56. Epub 2004 Oct 4. (2004).

- [88] R.M. Dunham, B. Cervasi, J.M. Brenchley, H. Albrecht, A. Weintrob, B. Sumpter, J. Engram, S. Gordon, N.R. Klatt, I. Frank, D.L. Sodora, D.C. Douek, M. Paiardini und G. Silvestri. "CD127 and CD25 expression defines CD4+ T cell subsets that are differentially depleted during HIV infection." In: *J Immunol*. 2008 Apr 15;180(8):5582-92. (2008).
- [89] A.S. Mansfield, S.G. Holtan, T.E. Grotz, J.B. Allred, J.W. Jakub, L.A. Erickson und S.N. Markovic. "Regional immunity in melanoma: immunosuppressive changes precede nodal metastasis." In: *Mod Pathol* 2011, 24:487-494. (2011).
- [90] W. Wang, H.D. Edington und U.N.M. et al. Rao. "Effects of highdose IF.2b on regional lymph node metastases of human melanoma: modulation of STAT5, FOXP3, and IL-17". In: *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 24, pp. 8314-8320, 2008. (2008).
- [91] A. Ladányi, A. Mohos, B. Somlai, G. Liskay, K. Gilde, Z. Fejős, I. Gaudi und J. Tímár. "FOXP3+ cell density in primary tumor has no prognostic impact in patients with cutaneous malignant melanoma." In: *Pathol Oncol Res* 2010, 16:303-309. (2010).
- [92] U.H. Acharya und J.M. Jeter. "Use of ipilimumab in the treatment of melanoma". In: *Clinical Pharmacology: Advances and Applications* 2013;5 (Suppl 1) 21-27 (2013).
- [93] F.S. Hodi, S.J. O'Day und D.F. McDermott. "Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma". In: *N Engl J Med* 2010;363:711-723. (2010).
- [94] F. Mussai, C. De Santo und V. Cerundolo. "Interaction between invariant NKT cells and myeloid-derived suppressor cells in cancer patients: evidence and therapeutic opportunities." In: *J Immunother*. 2012 Jul;35(6):449-59. (2012).
- [95] H. Watarai, D. Yamada, S. Fujii, M. Taniguchi und H. Koseki. "Induced pluripotency as a potential path towards iNKT cell-mediated cancer immunotherapy." In: *Int J Hematol*. 2012 Jun;95(6):624-31 (2012).
- [96] S. Motohashi und T. Nakayama. "Natural killer T cell-mediated immunotherapy for malignant diseases." In: *Front Biosci (Schol Ed)*. 2009 Jun 1;1:108-16. (2009).
- [97] S.R. Mattarollo, K. Steegh, M. Li, H. Duret, S.F. Ngiew und M.J. Smyth. "Transient Foxp3+ regulatory T-cell depletion enhances therapeutic anticancer vaccination targeting the immune-stimulatory properties of NKT cells". In: *Immunology and Cell Biology* (2013) 91, 105-114 (2013).

- [98] S.K. Joshi und M.L. Lang. “Fine tuning a well-oiled machine: Influence of NK1.1 and NKG2D on NKT cell development and function.” In: *Int Immunopharmacol.* 2013 Oct;17(2):260-6. (2013).
- [99] J. Wei, S. Xia, H. Sun, S. Zhang, J. Wang, H. Zhao, X. Wu, X. Chen, J. Hao, X. Zhou, Z. Zhu, X. Gao, J.X. Gao, P. Wang, Z. Wu, L. Zhao und Z. Yin. “Critical role of dendritic cell-derived IL-27 in antitumor immunity through regulating the recruitment and activation of NK and NKT cells.” In: *J Immunol.* 2013 Jul 1;191(1):500-8. (2013).
- [100] X. Wena, P. Raoa, L.J. Carrenob, S. Kima, A. Lawrenczyka, S.A. Porcellib, P. Cresswelld und W. Yuana. “Human CD1d knock-in mouse model demonstrates potent antitumor potential of human CD1d-restricted invariant natural killer T cells”. In: *PNAS February 19, 2013 vol. 110 no. 8 2963–2968* (2013).
- [101] E.M. Levy, M.P. Roberti und J. Mordoh. “Review Article: Natural Killer Cells in Human Cancer: From Biological Functions to Clinical Applications”. In: *Journal of Biomedicine and Biotechnology, Volume 2011, Article ID 676198, 11 pages, doi:10.1155/2011/676198* (2011).
- [102] E. Vivier, E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer und S. Ugolini. “Functions of natural killer cells”. In: *Nature Immunology, vol. 9, no. 5, pp. 503–510, 2008.* (2008).
- [103] B. Bird, M. Miljkovic, N. Laver und M. Diem. “Spectral detection of micro-metastases and individual metastatic cells in lymph node histology.” In: *Technol. Cancer Res. Treat., 2011, 10, 135–144.* (2011).
- [104] J.A. Campillo, J.A. Martinez-Escribano, M.R. Moya-Quiles, L.A. Luis A. Marin, M. Muro, N. Guerra, A. Parrado, M. Campos, J.F. Frias, A. Minguela, A.M. Garcia-Alonso und M.R. Alvarez-Lopez. “Natural Killer Receptors on CD8 T Cells and Natural Killer Cells from Different HLA-C Phenotypes in Melanoma Patients”. In: *Clin Cancer Res 2006;12(16) August 15, 2006* (2006).
- [105] M.B. Fuertes, M.V. Girart und L.L. et al. Molinero. “Intracellular retention of the NKG2D ligand MHC class I chain-related gene a in human melanomas confers immune privilege and prevents NK cell-mediated cytotoxicity”. In: *Journal of Immunology, vol. 180, no. 7, pp. 4606–4614, 2008.* (2008).
- [106] M. Gulubova, I. Manolova, D. Kyurkchiev, A. Julianov und I. Altunkova. “Decrease in intrahepatic CD56+ lymphocytes in gastric and colorectal cancer patients with liver metastases”. In: *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica, vol. 117, no. 12, pp. 870–879, 2009.* (2009).

- [107] M.A. Cooper, T.A. Fehniger, S.C. Turner, K.S. Chen, B.A. Ghaheri, T. Ghayur, W.E. Carson und M.A. Caligiuri. "Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset". In: *Blood*. 2001;97:3146-3151 (2001).
- [108] A. Hervieu, G. Mignot und F. Ghiringhelli. "Dacarbazine mediates antimelanoma effects via NK cells." In: *OncoImmunology* 2:4, e23714; April 2013 (2013).
- [109] P. Lui, R. Cashin, M. Machado, M. Hemels, P.K. Corey-Lisle und T.R. Einarson. "Treatments for metastatic melanoma: synthesis of evidence from randomized trials." In: *Cancer Treat Rev* 2007; 33:665-80 (2007).



# 8 Anhang

## 8.1 Abbildungsverzeichnis

1.1	Melanozyt . . . . .	2
1.2	Lymphabflussweg . . . . .	6
1.3	Schema der Hämatopoese . . . . .	10
1.4	Diagramm der T-Zell-Reifestadien . . . . .	13
1.5	Aufbau eines Lymphknotens . . . . .	20
3.1	Zytometer Konfiguration des roten und violetten Lasers . . . . .	28
3.2	Zytometer Konfiguration des blauen und ultravioletten Lasers . . . . .	29
3.3	Gating-Hierarchie B- und NK-Zell-Panel . . . . .	35
3.4	Time window . . . . .	36
3.5	Mononuclear cells . . . . .	36
3.6	Singlets . . . . .	37
3.7	Lebende Zellen . . . . .	37
3.8	Plasmazellen . . . . .	38
3.9	Lymphozyten . . . . .	39
3.10	B- und T-Zellen . . . . .	40
3.11	CD27 <sup>+</sup> B-Zellen . . . . .	40
3.12	B-Zellsubpopulationen CD25 <sup>+</sup> , CD69 <sup>+</sup> und CD69 <sup>+</sup> /25 <sup>+</sup> . . . . .	41
3.13	NK-Zellen . . . . .	42
3.14	Gating Hierarchie des T-Zell Panels . . . . .	43
3.15	T-Zellen . . . . .	44
3.16	CD4 <sup>+</sup> regulatorische T-Zellen . . . . .	45
3.17	T-Zell-Reifestadien: CD45RA und CD197 . . . . .	46
3.18	T-Zell-Reifestadien: N . . . . .	47
3.19	T-Zell-Reifestadien: CM . . . . .	48
3.20	T-Zell-Reifestadien: EM1, EM2, EM3 und EM4 . . . . .	48
3.21	T-Zell-Reifestadien: pE1, pE2 und E . . . . .	49
3.22	Verteilung der MZD der Wächterlymphknoten . . . . .	51

4.1	B-Zellen . . . . .	55
4.2	CD27 <sup>+</sup> B-Zellen . . . . .	57
4.3	CD25 <sup>+</sup> B-Zellen . . . . .	58
4.4	CD69 <sup>+</sup> B-Zellen . . . . .	58
4.5	CD25 <sup>+</sup> und CD69 <sup>+</sup> B-Zellen . . . . .	59
4.6	Plasmazellen . . . . .	60
4.7	T-Zellen . . . . .	62
4.8	Verteilung der Lymphozyten . . . . .	62
4.9	T-Helfer-Zellen (CD4 <sup>+</sup> ) . . . . .	64
4.10	T-Killer-Zellen (CD8 <sup>+</sup> ) . . . . .	64
4.11	Reifestadien CD4 <sup>+</sup> T-Zellen . . . . .	67
4.12	Reifestadien CD8 <sup>+</sup> T-Zellen . . . . .	71
4.13	Regulatorische T-Zellen . . . . .	73
4.14	NKT-Zellen . . . . .	75
4.15	NK-Zellen . . . . .	77
4.16	CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>dim</sup> NK-Zellen . . . . .	78
4.17	CD56 <sup>bright</sup> CD16 <sup>-</sup> NK-Zellen . . . . .	79
4.18	CD56 <sup>dim</sup> CD16 <sup>bright</sup> NK-Zellen . . . . .	79

## 8.2 Tabellenverzeichnis

2.1	Allgemeine Geräte . . . . .	23
2.2	Verbrauchsmaterialien . . . . .	23
2.3	verwendete Chemikalien . . . . .	24
2.4	Konjugierte Antikörper, verwendet im B- und NK-Zell-Panel . . . . .	25
2.5	Konjugierte Antikörper, verwendet im T-Zell-Panel . . . . .	25
2.6	verwendete unkonjugierte Monoklonale Antikörper . . . . .	25
2.7	verwendete unkonjugierte Fluorochrome . . . . .	26
2.8	Beads . . . . .	26
2.9	EDV-Programme . . . . .	26
3.1	UV-Laser . . . . .	30
3.2	Violetter Laser . . . . .	30
3.3	Blauer Laser . . . . .	30
3.4	Roter Laser . . . . .	31
3.5	Pipettierschema des B- und NK-Zell-Panels . . . . .	32
3.6	Pipettierschema des T-Zell-Panels . . . . .	33
3.7	T-Zell-Subpopulationen . . . . .	47

---

3.8	Gruppen der Melanomzelldichte (MZD) . . . . .	50
4.1	B-Zellen . . . . .	55
4.2	CD4 <sup>+</sup> Reifestadien N-EM2 . . . . .	65
4.3	CD4 <sup>+</sup> Reifestadien pE1-E . . . . .	66
4.4	CD8 <sup>+</sup> Reifestadien N-EM2 . . . . .	69
4.5	CD8 <sup>+</sup> Reifestadien pE1-E . . . . .	70
4.6	CD4 <sup>+</sup> regulatorische T-Zellen . . . . .	73
4.7	NKT-Zellen . . . . .	74
4.8	NK-Zellen . . . . .	76
8.1	Messergebnisse 1 . . . . .	123
8.2	Messergebnisse 2 . . . . .	124
8.3	Messergebnisse 3 . . . . .	125
8.4	Messergebnisse 4 . . . . .	126
8.5	Messergebnisse 5 . . . . .	127
8.6	Messergebnisse 6 . . . . .	128
8.7	Messergebnisse 7 . . . . .	129
8.8	Messergebnisse 8 . . . . .	130
8.9	Messergebnisse 9 . . . . .	131
8.10	Messergebnisse 10 . . . . .	132
8.11	Messergebnisse 11 . . . . .	133
8.12	Messergebnisse 12 . . . . .	134
8.13	Messergebnisse 13 . . . . .	135
8.14	Messergebnisse 14 . . . . .	136
8.15	Messergebnisse 15 . . . . .	137
8.16	Messergebnisse 16 . . . . .	138

## 8.3 Messergebnisse

Nummer	MZD	live cells	Bcells	CD27 <sup>+</sup> Bcells	CD69 <sup>+</sup> Bcells	CD25 <sup>+</sup> Bcells	CD25 <sup>+</sup> /69 <sup>+</sup> Bcells	Tcells	NKTcells
LK3425	1	766791	96727	48023	12724	1280	1812	633573	582
LK3427	0	107065	20508	12616	3719	612	808		
LK3428	0	83743	23029	14768	2421	1207	1017		
LK3429	0	765	173	90	52	1	5		
LK3430	4140	350382	122440	106767	2774	20837	9317		
LK3431	0	251337	59528	13600	1612	632	129		
LK3432	0	249601	57501	38647	540	966	94		
LK3433	0	67398	12506	6362	637	440	140		
LK3441	0	140540	20319	10157	1395	301	90		
LK3449	1,25	20989	1393	840					
LK3450	0	84975	13469	9200	303	603	35		
LK3451	0	14252	4395	517	439	106	73		
LK3459	0	891279	313249	153972	10623	8979	970		
LK3460	0	31414	4966	1376	311	131	43		
LK3467	6	163718	32771	9883	1846	777	98		
LK3468	0	119717	24210	10125	495	806	66		
LK3504	0	65623	5318	2147	530	127	33		
LK3505	0	57399	6125	2367	146	182	13		

Tabelle 8.1: Messergebnisse I

Nummer	NKcells	CD16 <sup>+</sup> NKcells	CD16 <sup>-</sup> NKcells	CD16 <sup>high</sup> /56 <sup>low</sup> NKcells	Plasmacells	Tcells	CD4 <sup>+</sup> Tcells	CD8 <sup>+</sup> Tcells
LK3425	13771	2432	8605	811	1622			
LK3427	1341	377	633	78	122			
LK3428	1975	696	1031	83	155			
LK3429	16	3	8	2	2			
LK3430	4042	624	1946	684	275			
LK3431	3692	713	1794	351	173			
LK3432	4369	598	3037	239	250			
LK3433	832	317	248	142	115			
LK3441	939	140	562	66	80			
LK3449	195	29	110	24	4			
LK3450	1470	223	1024	64	35			
LK3451	358	151	149	25	2			
LK3459	6973	1182	4417	433	1389			
LK3460	81	10	56	0	18			
LK3467	1097	303	398	156	147			
LK3468	727	75	335	40	239			
LK3504	3343	138	303	27	423	133606	124278	7506
LK3505	2134	146	190	6	80	160527	150760	8662

Tabelle 8.2: Messergebnisse 2

Nummer	Treg	CD4:CM	CD4:N	CD4:pE1	CD4:E	CD4:pE2	CD4:EM4	CD4:EM1	CD4:EM3	CD4:EM2
LK3425										
LK3427										
LK3428										
LK3429										
LK3430										
LK3431										
LK3432										
LK3433										
LK3441										
LK3449										
LK3450										
LK3451										
LK3459										
LK3460										
LK3467										
LK3468										
LK3504	9170	30735	28182	9546	2	226	62488	52231	5	246
LK3505	7848	36673	27920	11772	10	168	3983	69484	14	231

Tabelle 8.3: Messergebnisse 3

Nummer	CD8:CM	CD8:N	CD8:pE1	CD8:E	CD8:pE2	CD8:EM4	CD8:EM1	CD8:EM3	CD8:EM2	Bemerkung
LK3425										selber Patient
LK3427										
LK3428										
LK3429										kein CD25, CD69
LK3430										
LK3431										
LK3432										
LK3433										
LK3441										
LK3449										
LK3450										
LK3451										
LK3459										
LK3460										Laserschwankungen
LK3467										
LK3468										Laserschwankungen selber Patient
LK3504	361	708	384	1	96	7	5740	1	231	
LK3505	216	273	639	18	135	204	6951	30	244	

Tabelle 8.4: Messergebnisse 4

Nummer	MZD	live cells	Bcells	CD27 <sup>+</sup> Bcells	CD69 <sup>+</sup> Bcells	CD25 <sup>+</sup> Bcells	CD25 <sup>+</sup> /69 <sup>+</sup> Bcells	Tcells	NKTcells
LK3506	0	85896	12334	4371	3269	284	183	105023	66
LK3528	0	133583	25721	13084	1533	87	55	40382	129
LK3529	0	62467	20610	7445	675	265	229	212254	92
LK3531	274,5	353025	129874	45415	3546	180	258	52517	65
LK3533	0	66073	11149	2030	451	6	4	88277	175
LK3534	0	114048	22953	6961	1797	450	102	468463	251
LK3549	725	729426	230304	93293	846	12830	343		
LK3551	27000								
LK3604	0	4395	2624	1876	233	700	388	1334	64
LK3605	0	21257	10811	6599	769	2171	1360	8420	33
LK3606	0	19598	5206	2066				12842	
LK3607	0	21598	2967	1766	388	327	368	18032	20
LK3608	0	466430	79517	56977	6631	7659	6106	374393	423
LK3610	0	554854	103097	38677	823	1237	279	437936	3157
LK3611	0	46643	16629	6810	92	318	18	28244	26
LK3613	0	36944	3985	1316	16	339	5	31345	60
LK3614	0	73370	23298	8338	37	185	1	48050	63
LK3632	0	2791	118	67	4	28	2	2334	3
LK3633	0	35643	2317	1159	194	215	120	29727	35
LK3634	0	477226	117775	47146	2479	17389	5894	347782	495
LK3638	0	526336	190094	127657	246	19772	343	313032	637
LK3639	0	437042	156938	98445	46	2284	24	262022	584

Tabelle 8.5: Messergebnisse 5



Nummer	NKcells	CD16 <sup>+</sup> NKcells	CD16 <sup>-</sup> NKcells	CD16 <sup>high</sup> /56 <sup>low</sup> NKcells	Plasmacells	Tcells	CD4 <sup>+</sup> Tcells	CD8 <sup>+</sup> Tcells
LK3506	949	337	328	63	149	121006	112993	6646
LK3528	1490	203	923	137	105	44975	43057	1626
LK3529	778	151	369	104	98	15271	13173	1840
LK3531	3267	568	1471	665	320	74468	67052	5882
LK3533	672	93	364	49	22	33799	29440	3747
LK3534	1408	341	578	186	81	3321	3026	284
LK3549	4400	1551	1085	586	594	219114	206086	9366
LK3551						211085	198535	9024
LK3604	111	31	49	8	11	1008	716	244
LK3605	917	263	334	76	62	6750	5037	1495
LK3606					21	9365	7334	1714
LK3607	420	66	194	19	36	14547	13922	502
LK3608	6560	1158	3555	366	451	13705	13206	401
LK3610	7827	883	2662	636	651	240150	211490	26309
LK3611	521	58	224	59	117	21397	18874	2175
LK3613	301	11	198	4	67	31580	28021	3147
LK3614	834	187	464	20	176	20955	19503	1170
LK3632	108	15	77	8	3	2507	2019	485
LK3633	1265	228	835	60	128	37141	30006	6905
LK3634	4574	716	2063	419	871	162967	156182	6281
LK3638	13161	1918	8632	247	1200	17892	15226	1427
LK3639	8407	951	5409	356	873	18734	10048	1224

Tabelle 8.6: Messergebnisse 6

Nummer	Treg	CD4:CM	CD4:N	CD4:pE1	CD4:E	CD4:pE2	CD4:EM4	CD4:EM1	CD4:EM3	CD4:EM2
LK3506	6243	23390	23207	8560	5	164	2329	55369	4	169
LK3528	3385	1903	3937	11462	3	7	12359	12153	15	16
LK3529	1225	901	3753	1480	0	28	3450	2998	4	2
LK3531	12253	9585	7669	3458	30	116	15194	28062	31	94
LK3533	2286	3568	1468	2765	30	10	8093	11623	23	15
LK3534	312	242	192	836	0	0	85	1671	0	0
LK3549	52254	24243	76414	21292	8	31	3154	80992	11	31
LK3551	58192	22505	73206	20318	8	32	3064	79496	10	30
LK3604	135	95	46	32	0	0	24	517	0	1
LK3605	723	855	595	288	0	1	191	3090	2	4
LK3606	1044	1299	1895	377	0	3	233	3473	3	8
LK3607	1914	931	4908	1799	0	2	88	6215	0	0
LK3608	3065	1296	3624	1051	0	0	137	7037	0	1
LK3610	22858	11954	40086	81056	0	49	904	77945	0	53
LK3611	3952	1269	1123	6339	0	16	217	9924	1	17
LK3613	6722	2193	3571	11136	0	3	176	11071	0	6
LK3614	2813	1505	8147	1304	0	1	253	8407	4	5
LK3632	306	584	427	148	0	0	32	820	0	0
LK3633	3373	4545	4579	1250	0	0	405	19267	1	0
LK3634	21557	16007	26585	10648	0	4	6041	96156	0	5
LK3638	1796	1745	896	1855	0	1	154	10491	0	11
LK3639	1721	1202	422	1017	0	1	116	7299	0	3

Tabelle 8.7: Messergebnisse 7

Nummer	CD8:CM	CD8:N	CD8:pE1	CD8:E	CD8:pE2	CD8:EM4	CD8:EM1	CD8:EM3	CD8:EM2	Bemerkung
LK3506	273	808	316	2	113	5	4870	0	255	Voltages zu hoch
LK3528	241	195	15	1	7	116	927	2	38	Voltages zu hoch
LK3529	703	804	1	0	0	19	90	3	8	voltages zu hoch
LK3531	998	818	275	14	78	131	3138	26	302	voltages zu hoch
LK3533	1720	672	248	11	53	74	695	6	12	voltages zu hoch
LK3534	18	58	44	0	0	0	164	0	0	voltages zu hoch
LK3549	642	1315	532	0	102	2	6521	0	245	B-, NK-Zell-Panel
LK3551	732	1206	572	0	97	2	6182	0	237	nicht auswertbar
LK3604	26	17	96	0	16	0	89	0	0	selber Patient
LK3605	125	170	530	0	77	0	576	0	12	
LK3606	272	119	33	0	22	0	1202	0	52	roter Laser kaputt
LK3607	80	61	28	0	7	0	324	0	5	selber Patient
LK3608	26	29	154	0	7	0	180	0	6	
LK3610	645	7034	11255	1	403	5	6358	0	546	
LK3611	63	287	1020	1	41	0	698	0	67	selber Patient
LK3613	51	928	1302	0	22	0	846	0	3	
LK3614	116	696	142	0	4	0	196	0	5	
LK3632	115	59	36	0	1	0	272	0	1	selber Patient
LK3633	1301	551	264	0	0	1	4714	0	15	
LK3634	419	267	93	0	18	6	5237	0	196	
LK3638	178	82	30	0	5	1	1080	0	47	
LK3639	158	37	30	0	3	2	924	1	63	selber Patient

Tabelle 8.8: Messergebnisse 8

Nummer	MZD	live cells	Bcells	CD27 <sup>+</sup> Bcells	CD69 <sup>+</sup> Bcells	CD25 <sup>+</sup> Bcells	CD25 <sup>+</sup> /69 <sup>+</sup> Bcells	Tcells	NKTcells
LK3640	0	21942	1437	749	441	55	84	19964	34
LK3642	0	1448534	453875	320630	2332	68192	4057	933353	1440
LK3643	0	1339994	193554	21931	2177	7202	786	1105119	4104
LK3644	0	758293	253831	151696	112	4946	17	479076	1089
LK3646	0	324571	51309	13871	981	3259	969	264439	851
LK3648	0	380775	51854	32935	207	8254	312	315583	642
LK3654	0	14070	3251	2106	249	90	33		
LK3655	0	449955	96313	63811	5212	803	315		
LK3656	0	401861	79175	55968	1707	584	109		
LK3657	0,5	672053	103784	74667	2118	954	190		
LK3660	0	1251474	51295	33497	6980	787	2163		
LK3661	0	204800	9511	4564	313	422	92	192155	248
LK3662	0	1020858	143533	89925	9569	1464	434	848903	1456
LK3663	0	14835	2737	1107	287	28	3	11742	290
LK3664	0	466635	91524	64583	10083	886	418	364852	288
LK3665	0	578949	238408	159233	10418	1421	965	324132	1201
LK3666	0	62190	22843	10912	305	320	18	36407	557
LK3672	2300	610577	98404	59143	12136	279	131	493083	1797
LK3673	22,5	1246701	234169	160811	29781	1252	688	979400	1432
LK3674	0	1206547	357560	137386	10154	2473	187	817438	2724
LK3682	0	1655499	382740	246330	1576	5085	107	1242597	
LK3683	44896	91038	32020	18956	5413	28	31	51005	

Tabelle 8.9: Messergebnisse 9

Nummer	NKcells	CD16 <sup>+</sup> NKcells	CD16 <sup>-</sup> NKcells	CD16 <sup>high</sup> /56 <sup>low</sup> NKcells	Plasmacells	Tcells	CD4 <sup>+</sup> Tcells	CD8 <sup>+</sup> Tcells
LK3640	205	16	84	28	36	10957	6406	571
LK3642	24209	10700	7739	1902	1967	111368	103915	4485
LK3643	17905	2307	6638	2777	584	593980	558468	29446
LK3644	11701	1634	5768	758	206	93707	83024	9109
LK3646	5460	1248	2068	465	271	42990	35407	6819
LK3648	7015	1786	3194	630	96	148085	137866	8637
LK3654	122	19	53	3	48	3679	3394	241
LK3655	5390	848	2656	238	248	76571	72287	3589
LK3656	2605	269	1349	119	204	65425	58879	5344
LK3657	6334	730	2792	365	474	188876	168665	16589
LK3660	12215	505	6807	115	1020	368606	342370	22328
LK3661	1034	221	441	34	55	47506	43451	3825
LK3662	18862	4216	8864	1873	606	496447	420298	64221
LK3663	193	22	93	24	44	4616	4216	345
LK3664	5525	669	3175	233	576	173284	161291	10345
LK3665	10251	2070	5562	443	574	94831	82437	10726
LK3666	1873	427	1118	116	187	14177	12702	1173
LK3672	7942	2704	2476	702	708	323941	293718	27710
LK3673	14740	5209	5373	1607	1411	156664	143373	12333
LK3674	16113	5654	5823	1266	1140	197852	171339	22861
LK3682	17030	6164	5741	2327	549	768746	665894	88870
LK3683	914	227	469	31	145	41508	30999	9648

Tabelle 8.10: Messergebnisse 10

Nummer	Treg	CD4:CM	CD4:N	CD4:pE1	CD4:E	CD4:pE2	CD4:EM4	CD4:EM1	CD4:EM3	CD4:EM2
LK3640	626	737	1931	519	0	0	172	3012	1	0
LK3642	7883	15862	8484	10315	0	0	1569	67758	5	10
LK3643	124566	57816	38347	103486	2	58	7467	352049	1	51
LK3644	10338	12390	14439	1018	0	14	585	54547	0	141
LK3646	7353	3152	11535	1551	0	1	148	19014	4	2
LK3648	22606	20001	44927	3225	0	6	871	69024	0	10
LK3654	207	426	1221	157	0	0	13	1577	0	0
LK3655	5135	8676	29373	2398	0	0	153	31492	0	0
LK3656	4797	7676	1974	6165	0	4	322	42760	0	0
LK3657	17013	22302	11237	19248	0	0	988	114719	0	0
LK3660	28582	85283	88328	5121	0	0	1118	163299	0	0
LK3661	2635	1841	34174	1938	0	2	43	5503	0	1
LK3662	26016	40758	209163	12909	1	30	1663	155079	5	50
LK3663	404	598	1962	244	0	3	39	1369	1	3
LK3664	15855	24499	82254	6418	0	17	484	47372	13	68
LK3665	5017	6529	20739	912	6	50	517	53086	15	572
LK3666	1247	940	3826	181	0	10	109	7560	2	58
LK3672	36992	16927	76331	48565	2	28	2271	149474	2	18
LK3673	20671	12677	47515	9405	0	3	24	73024	0	9
LK3674	7627	15399	66859	12625	0	8	1871	73886	19	19
LK3682	29626	51332	257936	99372	1	263	4783	253957	1	133
LK3683	2329	4218	5804	1382	0	7	250	19158	0	6

Tabelle 8.11: Messergebnisse 11

Nummer	CD8:CM	CD8:N	CD8:pE1	CD8:E	CD8:pE2	CD8:EM4	CD8:EM1	CD8:EM3	CD8:EM2	Bemerkung
LK3640	70	63	87	0	7	1	338	0	7	
LK3642	520	48	323	0	36	16	3452	1	100	
LK3643	1440	3073	1110	0	152	44	22816	11	791	
LK3644	497	1614	317	0	23	14	6557	0	68	
LK3646	158	417	1173	0	100	1	4913	0	37	
LK3648	359	1885	639	0	65	2	5500	0	156	
LK3654	26	30	42	0	0	0	142	0	0	CD3 V500 fehlt selber Patient
LK3655	218	361	178	0	0	2	2806	0	0	CD3 V500 fehlt
LK3656	139	315	143	0	0	2	4740	0	0	CD3 V500 fehlt
LK3657	771	561	888	0	5	3	14385	0	5	selber Patient
LK3660	1032	531	1665	0	0	5	19105	0	0	CD3 V500 fehlt
LK3661	139	2817	160	0	14	0	635	0	42	CD3 V500 fehlt
LK3662	3067	27257	3420	0	198	13	29185	1	312	selber Patient
LK3663	24	160	23	0	4	0	133	0	0	selber Patient
LK3664	410	4504	498	0	88	5	4710	0	44	
LK3665	322	2643	459	0	94	1	6891	0	272	
LK3666	88	287	45	1	4	0	718	0	27	selber Patient
LK3672	1038	2550	1339	1	92	94	22046	3	457	
LK3673	699	880	568	0	44	26	9915	0	150	selber Patient
LK3674	1614	7713	1263	0	125	30	11734	5	290	
LK3682	6621	34694	5632	0	249	113	40598	3	601	
LK3683	553	1468	394	0	52	1	6696	0	357	

Tabelle 8.12: Messergebnisse 12

Nummer	MZD	live cells	Bcells	CD27+ Bcells	CD69+ Bcells	CD25+ Bcells	CD25+/69+ Bcells	Tcells	NKTcells
LK3684	110000	85284	21422	13504	2836	60	26	53211	
LK3701	0	1898904	272737	62661	4625	14356	3694	1593214	
LK3702	0	222112	46825	12301	396	2290	238	169761	
LK3710	0	1540537	504025	155150	3344	33629	2419	988569	
LK3711	0	278578	52924	28223	453	7671	422	222478	
LK3719	0	789884	136258	25995	1897	4807	346	640743	
LK3833	98,5	1149317	245508	84388	454	42582	1218	883536	
LK3834	3473	1491049	507032	148526	5096	94793	6476	936319	
LK3835	23000	1242965	303291	90558	7450	64924	10714	902261	
LK3836	0	1331510	191547	56239	283	30652	1428	1112632	
LK3837	4,5	99782	28195	12533	220	209	27	69964	
LK3838	0	1831930	198994	100925	13267	4730	1156	1582463	
LK3841	0								
LK3842	0	1001707	155297	84194	3822	1893	281	832718	
LK3844	0	120443	17469	10967	435	710	65	100656	
LK3865	0	314619	25419	440	704	1799	480	6487	
LK3866	0	902811	31491	861	174	2652	189	23659	
LK3868	0	16296	2623	1742	108	60	42	13430	
LK3869	2	16599	4409	2982	131	64	11	11808	
LK3906	0	481942	64178	40380	477	21010	387	408360	
LK3907	0	111766	14442	8226	542	2758	647	95041	
Kontrolle	0	163146	25323	10633	847	843	245	134482	

Tabelle 8.13: Messergebnisse 13



Nummer	NKcells	CD16 <sup>+</sup> NKcells	CD16 <sup>-</sup> NKcells	CD16 <sup>high</sup> /56 <sup>low</sup> NKcells	Plasmacells	Tcells	CD4 <sup>+</sup> Tcells	CD8 <sup>+</sup> Tcells
LK3684	698	146	308	32	188	73352	56908	14719
LK3701	8705	1004	4191	1482	1795	916934	749859	142568
LK3702	2330	249	1078	493	1281	105843	79957	22816
LK3710	13184	5281	2807	1262	2405	558976	475274	73081
LK3711	1388	320	635	136	669	112112	104185	6340
LK3719	4901	2127	1003	145	869	173105	143779	26452
LK3833	4617	1770	806	150	722	251729	219355	28675
LK3834	6570	1780	1141	293	1535	267406	232584	31027
LK3835	10623	1166	1036	223	1210	341360	288038	47835
LK3836	11458	3069	4761	891	1338	233706	216277	14161
LK3837	886	211	418	44	185	36669	29771	5636
LK3838	15328	3486	8563	579	1431	1045659	939445	90885
LK3841						55813	42743	10508
LK3842	6600	879	4219	263	598	775059	644344	121042
LK3844	1598	289	988	115	56	31620	25367	5699
LK3865					2235	99799	84581	10562
LK3866					1219	504787	431624	58356
LK3868	149	52	55	15	16	936	847	66
LK3869	187	50	85	12	13	22109	20078	1500
LK3906	3072	1406	1091	241	1197	193043	178629	12415
LK3907	1157	483	362	76	299	76088	68547	4855
Kontrolle	2013	162	1108	94	517	55297	46937	7305

Tabelle 8.14: Messergebnisse I4

Nummer	Treg	CD4:CM	CD4:N	CD4:pE1	CD4:E	CD4:pE2	CD4:EM4	CD4:EM1	CD4:EM3	CD4:EM2
LK3684	5168	4919	11352	5171	0	13	401	34821	1	30
LK3701	41523	36323	338399	71504	0	147	3722	296679	1	170
LK3702	2701	4282	41068	6522	0	39	580	27632	0	32
LK3710	46590	83806	110113	43572	104	169	8901	229203	101	574
LK3711	7492	10462	59851	9256	1	19	424	24428	3	15
LK3719	10337	16652	60415	14131	5	63	403	51832	3	43
LK3833	23315	25398	88585	20369	0	76	819	84792	0	10
LK3834	25083	34777	128166	13983	2	38	455	55784	5	8
LK3835	29583	43318	156386	18149	0	26	560	70259	5	7
LK3836	21903	41211	55822	14941	0	50	2135	100751	50	16
LK3837	2837	3184	7785	2061	4	28	400	16459	2	21
LK3838	35256	162660	270219	90954	3	119	7157	406671	18	79
LK3841	2031	10540	4437	1539	0	124	729	25620	1	26
LK3842	21949	55638	315765	98310	2	326	6355	169182	37	328
LK3844	773	3812	9656	3234	0	62	194	8395	1	54
LK3865	14431	14229	23603	4060	1	56	960	41345	0	164
LK3866	67766	74965	137943	25290	1	56	5420	188765	9	276
LK3868	42	131	334	44	0	0	6	333	0	1
LK3869	2169	2539	9112	1448	0	48	117	6721	1	32
LK3906	28006	30842	52114	14910	0	12	3450	77299	20	83
LK3907	9685	11889	19122	5073	1	3	1722	30515	11	28
Kontrolle	2200	4878	20444	2719	0	61	657	17791	11	215

Tabelle 8.15: Messergebnisse 15

Nummer	CD8:CM	CD8:N	CD8:pE1	CD8:E	CD8:pE2	CD8:EM4	CD8:EM1	CD8:EM3	CD8:EM2	Bemerkung
LK3684	815	4105	607	0	109	7	8361	4	501	selber Patient
LK3701	3574	94440	8917	0	1147	41	30731	11	2819	
LK3702	1164	11425	1713	0	219	0	7327	0	738	selber Patient
LK3710	1988	39704	12668	18	956	86	16275	28	1020	
LK3711	512	2706	386	0	35	3	2531	0	110	
LK3719	693	12115	1778	1	151	6	10655	3	844	
LK3833	1896	11263	1782	0	152	3	12747	0	712	
LK3834	2242	14622	2131	0	223	2	10632	0	975	
LK3835	3013	22860	2984	0	318	3	17176	2	1177	
LK3836	668	1243	934	0	74	3	10949	2	232	
LK3837	140	994	300	0	44	4	3880	0	232	
LK3838	6177	35480	6268	3	254	106	42235	2	463	
LK3841	2021	762	598	0	27	54	6913	0	75	B-, NK-Zell-Panel nicht auswertbar
LK3842	7315	82822	8741	1	750	44	18262	13	1759	
LK3844	789	2979	289	0	83	2	1288	0	223	
LK3865	1076	1993	970	0	61	5	6233	1	235	
LK3866	7596	11256	4025	1	257	100	34350	5	624	
LK3868	2	36	7	0	3	0	15	0	3	
LK3869	82	892	102	0	10	1	396	1	10	
LK3906	930	833	321	6	40	146	9783	8	257	
LK3907	367	387	121	17	29	91	3639	16	112	
Kontrolle	298	3987	293	0	70	8	2009	5	408	

Tabelle 8.16: Messergebnisse 16

## 9 Danksagung

Zunächst möchte ich meinen Dank an Frau Prof. Dr. A. Ulmer für die Annahme als Doktorandin, die zuverlässige Betreuung und die inhaltliche Begleitung richten. Die Treffen mit ihr haben mich immer wieder neu für diese Arbeit motiviert.

Mein herzlicher Dank geht an Dipl. Biologe Kai Witte, der mich mit großer Geduld das “Facsen” lehrte und trotz vollen Terminkalenders immer noch Zeit für mich und meine Fragen hatte.

Mein Dank gilt meinem Betreuer Dr. Martin Ebinger, der mich so freundlich in die Arbeitsgruppe aufnahm und mir jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Seine freundliche, seine Zuverlässigkeit und das schnelle Korrekturlesen haben viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. M. Röcken bedanke ich mich für die Aufnahme in die Hautklinik und bei Herrn Prof. Dr. R. Handgretinger und Prof. Dr. P. Lang für die Aufnahme in die Kinderklinik.

Außerdem möchte ich mich bei Dipl. Biologin Iris Schäfer bedanken für alle praktische Unterstützung im Labor, für ihre unerschöpfliche Hilfsbereitschaft und Freundschaft.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dipl. Biologin Petra Lehnert und Nadine Luz bedanken, durch deren Vorarbeit ich die Lymphknoten-Proben schon so schön als Suspension vorgefunden habe. Danke, dass ihr mir jahrelang treu Bescheid gegeben habt, wenn es Proben für mich gab, obwohl ich sie nicht immer abholen konnte.

Bei dieser Arbeit wurde die methodische Beratung des Instituts für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen in Anspruch genommen. Für die Unterstützung möchte ich mich bei Frau Naumann herzlich bedanken.

An dieser Stelle gilt mein Dank auch Annika Hanke, die mir im Hintergrund die Geheimnisse der Statistik erschlossen hat und mir mit viel Geduld bei Fragen zu Jump weiterhalf.

Mein besonderer Dank geht an meinen Bruder Joram Berger, der mir extra ein Programm geschrieben hat, das mir geholfen hat, die vielen Daten in Tabellen zu kopieren, und mir damit einige Monate an Arbeit erspart hat. Er hat mir LaTeX so gut erklärt, dass mir alles ganz einfach erschien, und er war immer online und hilfsbereit, wenn bei mir Fehlermeldungen auftauchten. Vielen Dank für deine geduldige Hilfe und dein Engagement!

Für das so gründliche Korrekturlesen möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Mama Renate Berger bedanken. Außerdem spreche ich meinen Eltern einen tiefen Dank dafür aus, dass sie mir mein Studium ermöglicht haben und ich in ihnen immer um eine sichere Unterstützung wusste.

Ahlke Spies hat mich nicht nur moralisch und kulinarisch unterstützt, sondern mir auch immer wieder mit ihren Fähigkeiten in Bildbearbeitung und ihrem funktionstüchtigen Scanner und Drucker geholfen.

Außerdem möchte ich mich bei Jael Berger, Dr. Dorothee Hoppe-Sörgel und Dr. Alexandra Ruoff bedanken. Ihr habt euch so manche Klage angehört, auch schlechte Laune nach stressigem Labortag ertragen und mich immer wieder motiviert weiter zu machen. Danke für eure Freundschaft und die gemeinsame Zeit.

Soli Deo Gloria.