

Aus dem Interfakultären Institut für Zellbiologie
der Universität Tübingen
Abteilung Immunologie

**Zellulärer Immunstatus unter primärer Radiotherapie
bei lokalisiertem Prostatakarzinom**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Schädle, Philipp Sebastian

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Rammensee
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. K. Ghoreschi

Tag der Disputation: 04.04.2017

Für meine Großeltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Immunologische Grundlagen.....	1
1.1.1. Das humane Immunsystem	1
1.1.2. Lymphozytensubgruppen.....	3
1.1.3. T-Zellen	5
1.1.4. Ausgewählte Zytokine und ihre Bedeutung.....	10
1.1.5. Tumormunologie	12
1.2. Das Prostatakarzinom	15
1.2.1. Epidemiologie und Ätiologie.....	15
1.2.2. Diagnostik und Stadieneinteilung.....	17
1.2.3. Standardtherapieverfahren bei lokalisiertem Prostatakarzinom.....	20
1.2.4. Perkutane Radiotherapie	22
1.2.5. Immunologische Therapieansätze	23
1.3. Fragestellung	27
2. Material und Methoden.....	28
2.1. Die durchgeführte Studie	28
2.1.1. Design	28
2.1.2. Ein- und Ausschlusskriterien.....	29
2.1.3. Patienten	29
2.1.4. Unterschiedliche Therapien	31
2.1.5. Gesunde Probanden	32
2.2. Geräte	32
2.3. Materialien	34
2.3.1. Verwendete Einzelsubstanzen.....	34
2.3.2. Hergestellte Gemische.....	36
2.4. Bestimmung des Leuko- und Lymphozytenverlaufs	37
2.5. Aufbereitung der PBMC.....	37
2.5.1. Prinzip und Durchführung der PBMC-Isolierung	37
2.5.2. Einfrieren und Auftauen der Zellen	38
2.6. Vorbereitung der Durchflusszytometrie	39
2.6.1. Prinzip	39

2.6.2. HLA-Peptid-Multimere	42
2.6.3. Übersicht über die vier Färbungen und die verwendeten Antikörper	43
2.6.4. Etablierung der Färbeprotokolle	45
2.6.5. Färbungen 1 - 3: Phänotypisierung, Proliferation, Apoptose und Nekrose, Differenzierung und Virus-spezifische T _K -Zellen	45
2.6.6. Stimmulations- und intrazelluläres Färbeprotokoll (Färbung 4)	48
2.6.7. Herstellung der Kompensations-Beads.....	50
2.6.8. Konfiguration des Durchflusszytometers.....	52
2.7. Durchführung der Durchflusszytometrie	53
2.8. Auswertung der Durchflusszytometrie	54
2.8.1. Ausschluss von Experimenten	54
2.8.2. Färbung 1: Phänotypisierung und Proliferation	54
2.8.3. Färbung 2: Apoptose, Nekrose und Virus-spezifische T _K -Zellen	55
2.8.4. Färbung 3: Differenzierung und Proliferation Virus-spezifischer T _K - Zellen	56
2.8.5. ICS (Färbung 4)	56
2.9. Analyse und statistische Auswertung	57
3. Ergebnisse	58
3.1. Voruntersuchungen	58
3.1.1. Etablierung eines kombinierten Live/Dead-Aqua-Protokolls	58
3.1.2. Auswahl von IL-4 vs. IL-5 als Marker für Th2-Zellen.....	59
3.1.3. Kombination verschiedener Qdot-Fluorochrome	60
3.1.4. Stimmulationsagens für die Positivkontrolle des ICS.....	61
3.2. Beispielauswertung.....	62
3.2.1. Färbung 1.....	62
3.2.2. Färbung 2.....	63
3.2.3. Färbung 3.....	64
3.2.4. ICS (Färbung 4)	65
3.3. Durchgeführte Tests	67
3.4. Zellzahlverläufe.....	68
3.4.1. Leukozyten und Lymphozyten	68

3.4.2. T-Zellen	70
3.4.3. B-Zellen	73
3.4.4. NK-Zellen	73
3.5. Proliferation.....	75
3.6. Apoptose und Nekrose	78
3.7. Differenzierung der T-Zellen	78
3.7.1. Erläuterung der unterschiedlichen Zellpopulationen	78
3.7.2. Differenzierung der CD4-positiven Zellen	79
3.7.3. Differenzierung der CD8-positiven Zellen	80
3.8. Virus-spezifische CD8-positive Zellen	81
3.8.1. Übersicht über die HLA-Peptid-Multimer-Positivität	81
3.8.2. Zellverlauf der Virus-spezifischen CD8-positiven Zellen.....	82
3.8.3. Proliferation der Virus-spezifischen CD8-positiven Zellen	83
3.8.4. Apoptose und Nekrose der Virus-spezifischen CD8-positiven Zellen	86
3.8.5. Differenzierung der Virus-spezifischen CD8-positiven Zellen	87
3.9. Zellfunktion	88
3.9.1. Allgemein	88
3.9.2. Stimulation mit SEB	89
3.9.3. Stimulation mit CMV-pp65	90
3.9.4. Stimulation mit EBV-BMLF1.....	90
3.9.5. Stimulation mit EBV-LMP2.....	90
3.9.6. Stimulation mit Influenza-Matrixprotein	90
3.9.7. Stimulation mit HIV (Negativkontrolle)	90
3.9.8. Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem ICS.....	91
3.10. PSA-Verläufe und klinische Daten der Patienten	91
3.10.1. Übersicht	91
3.10.2. Zusammenfassung der PSA-Verläufe.....	93
3.11. Unterschiede zwischen den verschiedenen Therapiegruppen	93
3.11.1. Allgemeines Vorgehen	93
3.11.2. Unterschiedliche Radiotherapie	94
3.11.3. Hormon-ablative Therapie (HAT).....	98

3.11.4. Auswirkungen einer lokalen Steroidtherapie am Enddarm	101
3.12. Vergleich mit den gesunden Spendern.....	102
3.12.1. Allgemeines Vorgehen	102
3.12.2. Zellzahlverläufe	103
3.12.3. Proliferation	106
3.12.4. Zell-Viabilität.....	108
3.12.5. Zelldifferenzierung.....	108
3.12.6. Virus-spezifische CD8-positive Zellen.....	109
3.12.7. Zytokinproduktion.....	111
3.13. Zusammenfassung der Ergebnisse	118
3.13.1. Ergebnisse der Voruntersuchungen.....	118
3.13.2. Ergebnisse der Hauptversuche für die Patienten.....	119
3.13.3. Ergebnisse aus den Vergleichen von Patienten und gesunden Spendern.....	121
4. Diskussion	123
4.1. Fragestellung	123
4.2. Methoden.....	124
4.2.1. PBMC-Isolierung und -Kryokonservierung.....	124
4.2.2. Versuchsdurchführung	124
4.2.3. Benutzung von Isotyp-Kontrollen	126
4.2.4. Probleme durch die spektrale Überlappung bei der Durchflusszytometrie.....	127
4.2.5. Auswertung	127
4.3. Ergebnisse.....	128
4.3.1. Verlauf der Leukozyten und Lymphozyten der Patienten	128
4.3.2. Einflüsse auf die T-Lymphozyten	129
4.3.3. Auswirkungen auf die B-Zellen	132
4.3.4. Einflüsse auf die NK-Zellen.....	132
4.3.5. Veränderungen bei den Virus-spezifischen CD8-positiven Zellen .	134
4.3.6. Auswirkungen auf die Zellfunktion und Zytokinproduktion	135
4.3.7. Veränderungen durch die lokale Applikation von Steroiden am Enddarm.....	138

4.3.8. Auswirkungen der HAT auf das Immunsystem	139
4.3.9. Interpretation der PSA-Verläufe	139
4.4. Schlussfolgerung	140
5. Zusammenfassung	145
6. Abbildungsverzeichnis.....	147
7. Tabellenverzeichnis.....	151
8. Abkürzungsverzeichnis	153
9. Literaturverzeichnis	158
10. Erklärung zum Eigenanteil	177
11. Danksagung	178
12. Lebenslauf.....	179
13. Bisherige Poster und Vorträge	181
Anhang	182
I. Übersicht über die Therapie der Patienten	182
II. Übersicht über die gesunden Spender	183
III. Übersicht über die Blutentnahmen	183
IV. Rohdatentabellen aus den durchflusszytometrischen Analysen	185
IV.i. Legende	185
IV.ii. Färbeprotokoll 1	185
IV.iii. Färbeprotokoll 2	197
IV.iv. Färbeprotokoll 3	215
IV.v. Durchgeführte Tests in Färbeprotokoll 4 (ICS)	237
IV.vi. ICS (Färbeprotokoll 4) nach Stimulation mit einem HIV-Peptid	237
IV.vii. ICS (Färbeprotokoll 4) nach Stimulation mit SEB und Abzug der Basisproduktion (Stimulation mit HIV).....	244
IV.viii. ICS (Färbeprotokoll 4) nach Stimulation mit CMV-pp65 und Abzug der Basisproduktion (Stimulation mit HIV)	251
IV.ix. ICS (Färbeprotokoll 4) nach Stimulation mit EBV-BMLF1 und Abzug der Basisproduktion (Stimulation mit HIV)	255
IV.x. ICS (Färbeprotokoll 4) nach Stimulation mit EBV-LMP2 und Abzug der Basisproduktion (Stimulation mit HIV).....	260

IV.xi. ICS (Färbeprotokoll 4) nach Stimulation mit Inf-Mat und Abzug der
Basisproduktion (Stimulation mit HIV).....262

1. Einleitung

1.1. Immunologische Grundlagen

1.1.1. Das humane Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen schützt den Organismus vor Krankheitserregern und anderen schädlichen Substanzen. Dazu stehen zwei ineinander greifende Systeme zur Verfügung: das sofort wirkende, angeborene, Immunsystem auf der einen Seite und zum anderen das verzögert einsetzende, erworbene, spezifische System. Als alternative Einteilung finden sich auch die Begriffe zelluläres und humorales Immunsystem, welche das Immunsystem auf andere Art gliedern.

Das angeborene Immunsystem erkennt über die Toll-like Rezeptoren (TLR) bestimmte körperfremde Substanzen, die so genannten Pathogen-assoziierten molekularen Strukturen (PAMP), direkt und leitet sofort eine Elimination des Fremdstoffes ein. Teil der angeborenen Immunantwort sind vor allem die Makrophagen, die neutrophilen Granulozyten, die dendritischen Zellen und die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Ebenfalls zählen die eosinophilen und basophilen Granulozyten und die Monozyten, sowie das Komplementsystem zum angeborenen Immunsystem [1, 2].

Das adaptive Immunsystem reift erst mit zunehmendem Alter des Menschen heran und ist somit nicht bereits bei Geburt vorhanden wie die angeborene Immunabwehr. Zur Antigenerkennung werden somatisch durch Rearrangement generierte Rezeptoren auf den T- und B-Lymphozyten genutzt. Beispielsweise durch die Prozesse der zentralen und peripheren Toleranz werden diese selektioniert, um körpereigene Strukturen nicht fälschlicherweise zu erkennen. Ein körperfremder Stoff kann von einer T-Zelle nur erkannt werden, wenn er von einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) - meist sind dies dendritische Zellen, aber auch B-Lymphozyten - über ein HLA-Molekül (s.u.) dargeboten wird. Ein aktivierter T-Lymphozyt kann wiederum entsprechende B-Lymphozyten aktivieren und diese zur Produktion spezifischer Antikörper gegen das erkannte Antigen anregen. Auch eine B-Zelle, die selbst ein Antigen

erkannt hat, muss zunächst über einen passenden T-Lymphozyten aktiviert werden [3]. Durch die Entwicklung mancher T- und B-Lymphozyten zu so genannten Gedächtniszellen entsteht das immunologische Gedächtnis, das bei einer Reinfektion mit dem gleichen Erreger eine schnelle Antwort des adaptiven Immunsystems garantiert. Auf dieser Grundlage basieren auch die heute routinemäßig durchgeführten Schutzimpfungen [4].

Die zum adaptiven Immunsystem gehörenden Zellen werden unter 1.1.2. und 1.1.3. genauer erläutert und ihre exakte Funktionsweise vorgestellt. In der folgenden Tabelle 1 sind die wichtigsten Aspekte des angeborenen und erworbenen Immunsystems noch einmal gegenüber gestellt.

Tabelle 1: Vergleich von angeborenem und adaptivem Immunsystem anhand ausgewählter Aspekte, modifiziert nach Janeway et al., 2002 [1].

	Angeborenes Immunsystem	Adaptives Immunsystem
Rezeptoren	direkt im Genom codiert, kein Rearrangement	aus mehreren Segmenten durch Rearrangement zusammengesetzt
Erkannte Strukturen	bestimmte molekulare Strukturen (z.B. bakterielle (Lipopolysaccharid) oder virale Bestandteile)	kleine Teile molekularer Strukturen (Peptide, Kohlenhydrate, etc.)
Unterscheidung zwischen körpereigen und -fremd	durch Selektion über die Evolution keine Erkennung von körpereigenen Antigenen	keine perfekte Unterscheidung durch Selektion in jedem Individuum, dadurch Entstehung von Autoimmunerkrankungen möglich
Reaktionszeit	sofort	verzögert
Immunantwort	Phagozytose der Krankheitserreger oder Lyse der befallenen Zellen durch das Komplementsystem	Antikörperbildung und immunologisches Gedächtnis

Die oben erwähnten HLA-Moleküle (HLA steht dabei für humanes Leukozyten-Antigen) gehören alle zum so genannten Haupthistokompatibilitätskomplex

(MHC). Unter diesem versteht man einen Genkomplex auf Chromosom sechs, in dem die Gene für die verschiedenen HLA-Moleküle abgelegt sind. Die Begriffe HLA und MHC werden oft synonym verwendet. Die Proteine, die sich auf den Oberflächen fast aller Zellen befinden, die einen wichtigen Beitrag zur Unterscheidung von körpereigenem und körperfremdem Material liefern und zur Antigenpräsentation beitragen, lassen sich in zwei Hauptklassen differenzieren. Die MHC-Klasse I-Moleküle (hierzu zählen die HLA-A-, HLA-B- und HLA-C-Moleküle) finden sich auf allen Körperzellen mit Zellkern, sowie auf den Thrombozyten. Über sie werden Fragmente von Proteinen vor allem an CD8-positive T-Lymphozyten (siehe 1.1.3.) präsentiert, die im Zellinneren abgebaut wurden. Eine Unterscheidung von körpereigenen gegenüber -fremden Zellen ist somit möglich. Zu den MHC-Klasse II-Molekülen zählen die Isotypen HLA-DP, -DQ, -DR, -DN und -DO. Sie werden von allen Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert und über sie werden die Fragmente von phagozytierten Proteinen an CD4-positive T-Zellen präsentiert. Darüber hinaus existieren noch HLA-Klasse III-Moleküle, die jedoch eine andere Funktion besitzen. Zu ihnen zählen verschiedene Komplementfaktoren und somit Plasmaproteine, die ihren Beitrag zur unspezifischen Immunabwehr leisten [5-8].

Die Benennung der HLA-Moleküle setzt sich aus drei Teilen zusammen: Am Anfang steht die Abkürzung „HLA“, gefolgt vom Isotyp und der Antigenvariante. Hieraus resultiert zum Beispiel die Benennung HLA-A*02.

1.1.2. Lymphozytensubgruppen

Die Lymphozyten machen beim Erwachsenen 25 - 45 % der Leukozyten im Blut aus. In absoluten Zahlen entspricht dies 1500 - 3000 Zellen pro μl Blut [9]. Die Lymphozyten beinhalten folgende Untergruppen: T-Lymphozyten (siehe 1.1.3.), B-Lymphozyten und NK-Zellen.

Die B-Lymphozyten können durch die Anwesenheit des CD19-Antigens auf ihrer Zelloberfläche gegenüber den T- und NK-Zellen abgegrenzt werden [10]. Sie entstehen im Knochenmark (daher der Name B-Zellen (bone marrow)) aus hämatopoetischen Vorläuferzellen und durchlaufen dort einen Reifungs- und Selektionsprozess, um Autoreaktivität weitestgehend zu verhindern. Während der Reifung findet das Rearrangement der Immunglobulin-Gene statt, was dazu

führt, dass später viele verschiedene Antigene durch den B-Zell-Rezeptor (BCR) erkannt und von den Zellen die entsprechenden Antikörper gebildet werden können. Die Entwicklung der B-Lymphozyten durchläuft verschiedene Stufen: Aus den Vorläuferzellen entstehen zunächst die Pro-B-Zellen, daraus die Prä-B-Zellen und hieraus schließlich die unreifen B-Zellen. Diese differenzieren sich dann zu den reifen naiven B-Zellen [11, 12]. Wird eine B-Zelle nun im Rahmen einer humoralen Immunantwort (siehe 1.1.1.) aktiviert, entstehen zunächst Plasmablasten, die weiterhin viele Eigenschaften der B-Zellen aufweisen, aber bereits Antikörper sezernieren. Diese entwickeln sich weiter zu den Plasmazellen, die hochspezifische Antikörper gegen das erkannte Antigen produzieren, sich jedoch nicht mehr teilen können [11, 13, 14]. Die höhere Spezifität der Antikörper der Plasmazellen ist das Resultat der so genannten somatischen Hypermutation. Dabei werden die produzierten Antikörper durch eine erhöhte Mutationsrate immer leicht verändert, bis ein hochspezifischer Antikörper gegen das zu bekämpfende Antigen vorhanden ist. Im Verlauf findet auch ein Antikörper-Klassenwechsel statt (von den Klassen IgM und IgD zu den Klassen IgG, IgA oder IgE) [15]. Alternativ zur Entwicklung zu Plasmazellen können sich die aktivierten B-Lymphozyten auch zu B-Gedächtniszellen entwickeln, die eine schnelle humorale Immunantwort bei erneutem Antigenkontakt gewährleisten [11, 16].

Die NK-Zellen grenzen sich durch das Fehlen der Oberflächenantigene CD3 (für T-Zellen) und CD19 (für B-Zellen) von den übrigen Lymphozyten ab und können anteilig bis zu 15 % der Gesamtzahl der Lymphozyten ausmachen. Sie entwickeln sich - äquivalent zu den anderen Lymphozytensubpopulationen - aus den lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark. Als Teil des angeborenen Immunsystems tragen sie zur Bekämpfung von infizierten oder maligne entarteten Zellen bei. Ohne weitere Hilfe können sie entsprechend befallene Zellen erkennen und über die Sekretion zytotoxischer Stoffe diese abtöten [7, 17]. Mittels des Oberflächenantigens CD56 können die NK-Zellen in ihrer Funktionsfähigkeit unterschieden werden. Während die regulären, funktionstüchtigen NK-Zellen CD56 auf ihrer Oberfläche exprimieren, wurden

die CD56-negativen NK-Zellen als dysfunktional im Sinne einer verminderten zytotoxischen Aktivität und Abnormitäten in der Rezeptorexpression charakterisiert. Ein anderer, für die NK-Zellen klassischer Oberflächenmarker ist CD16, der in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht wurde [18]. Innerhalb der Population der T-Lymphozyten existiert eine Subgruppe, die den NK-Zellen ähnelt und daher als NKT-Zellen bezeichnet wird [17]. Diese Zellen sind unter 1.1.3. näher beschrieben.

1.1.3. T-Zellen

Bei Betrachtung der T-Lymphozyten muss zunächst zwischen zwei Untergruppen unterschieden werden: die $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten und die $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten (s.u.) [19]. Erstere werden wiederum in CD4-positive (auch T-Helfer-Zellen bzw. T_H genannt) und CD8-positive T-Lymphozyten (auch T-Killer-Zellen bzw. T_K oder zytotoxische T-Zellen genannt) unterteilt [20]. Die T-Lymphozyten stammen wie die B-Zellen (siehe 1.1.2.) von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark ab. Ihre weitere Entwicklung findet jedoch im Thymus statt, was zu ihrer Namensgebung führte [21]. Die Vorgänge dort sind schematisch in Abbildung 1 gezeigt. Während der Reifung im Thymus durchlaufen die T-Zellen auch eine positive und negative Selektion, bei der die meisten autoreaktiven Zellen eliminiert werden. Bei diesen Prozessen wird der T-Zell-Rezeptor (TCR) der unterschiedlichen T-Lymphozyten verschiedensten Antigenen ausgesetzt. Sollte eine Autoreaktivität auf körpereigene Antigene vorhanden sein, wird die Zelle eliminiert. Aus den Prozessen im Thymus gehen naive CD4- oder CD8-positive T-Lymphozyten hervor [22].

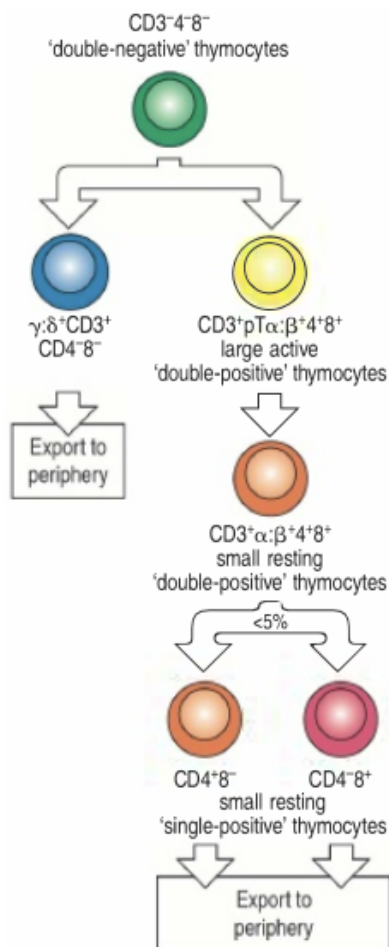


Abbildung 1: Entwicklung der T-Zellen im Thymus. Die Vorläuferzellen wandern aus dem Knochenmark in den Thymus ein, dort wird zunächst der T-Zell-Marker CD3 auf der Oberfläche exprimiert und es erfolgt die Unterscheidung von $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen anhand des T-Zell-Rezeptors (TCR). Die $\alpha\beta$ -T-Zellen exprimieren nun sowohl CD4 als auch CD8 auf ihrer Oberfläche und verlieren im Anschluss wieder eine der beiden Oberflächenstrukturen, was sie zu CD4- oder CD8-positiven T-Lymphozyten werden lässt [21]. Quelle: Janeway's Immunobiology, 8. Auflage, 2012, S. 295, Abb. 8.19, mit freundlicher Genehmigung von Garland Science [7].

Eine gute Übersicht über die verschiedenen reifen CD4-positiven T-Lymphozyten gibt die Arbeit von Geginat et al. (2013), die acht Subgruppen beschreibt. Diese sind in Abbildung 2 gezeigt [20].

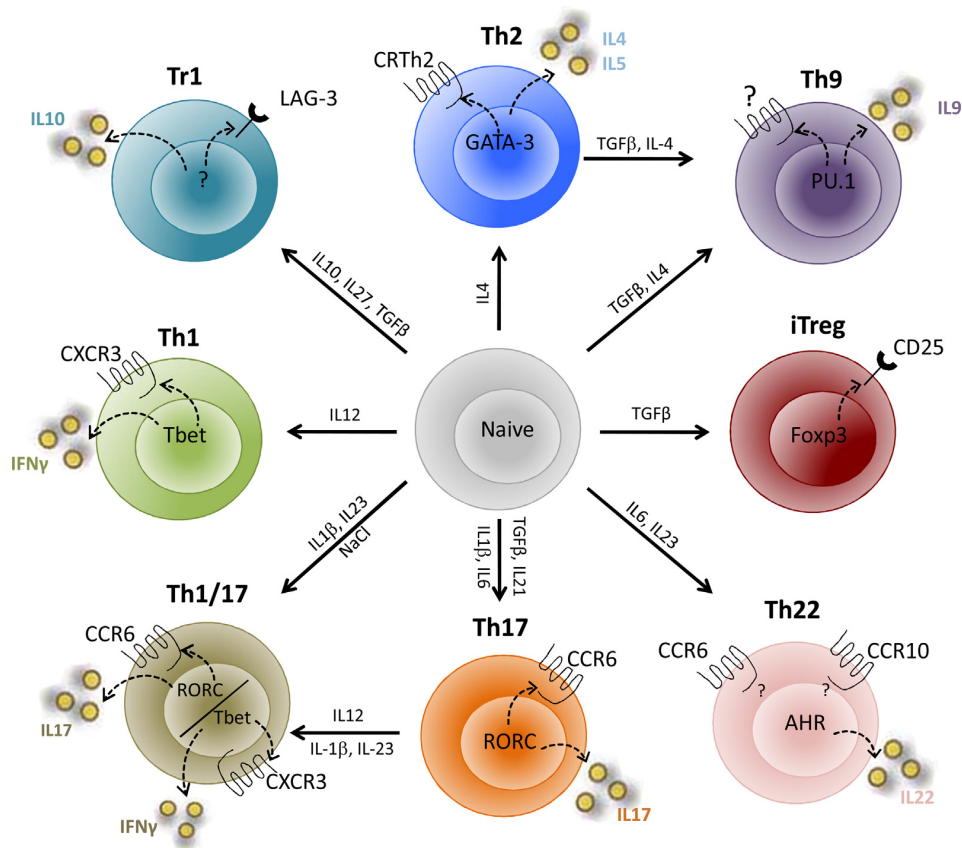


Abbildung 2: Subtypen der reifen CD4-positiven T-Zellen mit ihren Oberflächencharakteristika und Hauptzytokinen. Gezeigt ist die Entwicklung der verschiedenen Zelllinien aus der naiven CD4-positiven T-Zelle (Mitte) und die dafür erforderlichen Faktoren (Pfeilbeschriftungen). Bedeutung der Abkürzungen: Th1 = T-Helfer-1-Zellen; Th2 = T-Helfer-2-Zellen; Th9 = T-Helfer-9-Zellen; Th17 = T-Helfer-17-Zellen; Th22 = T-Helfer-22-Zellen; Th1/17 = T-Helfer-17-Zellen mit Th1-Eigenschaften; Tr1 = Typ-1 regulatorische Zellen; iTreg = CD25⁺Foxp3⁺-regulatorische T-Zellen (auch induzierte regulatorische T-Zellen genannt). Quellen: Geginat et al., 2013 [20] und Chattopadhyay et al., 2005, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier [23].

Die Übergruppe der „klassischen T_H-Zellen“ umfasst die Th1-, Th2- und Th17-Zellen. Während die Th1-Zellen für die Abwehr intrazellulärer Bakterien und Viren zuständig sind, werden durch die Th2-Zellen extrazelluläre Parasiten bekämpft. Sie sind darüber hinaus an der Entstehung von Allergien maßgeblich beteiligt. Die Th17-Zellen spielen eine Rolle bei der Immunantwort gegen Pilzinfektionen und gegen extrazelluläre Bakterien. Die drei verbleibenden T_H-Zellarten wurden erst wesentlich später entdeckt und beschrieben. Die Th1/17-Zellen stammen von Th17-Zellen ab, weisen jedoch Eigenschaften der Th1-Zellen auf und spielen bei chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen eine Rolle. Die Th22-Zellen gehören zur

Immunbarriere in der Haut und die Th9-Zellen können als eine Unterform der Th2-Zellen angesehen werden [20, 24].

Die verbleibenden Populationen innerhalb der CD4-positiven Lymphozyten bilden zusammen die Übergruppe der regulatorischen T-Zellen (T_{reg}). Sie beugen überschießenden Immunreaktionen vor und halten die Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen aufrecht. Ein Fehlen würde somit zu schweren Autoimmunerkrankungen führen. Auch mit der Immunreaktion gegen Tumoren werden die T_{reg} -Zellen in Verbindung gebracht. Die am besten beschriebene Art von T_{reg} -Zellen ist durch die hohe Expression von CD25 auf der Zelloberfläche und den Transkriptionsfaktor Foxp3 im Zellkern charakterisiert. Diese Zellen werden auch als induzierte regulatorische T-Zellen bezeichnet. Die Gruppe der Tr1-Zellen dagegen ist vor allem für die Verhinderung von Abwehrreaktionen gegen die physiologische Darmflora verantwortlich. Darüber hinaus wurde die Gruppe der natürlichen T_{reg} -Zellen (nT_{reg}) charakterisiert (in Abbildung 2 nicht gezeigt), die ebenfalls an der Verhinderung von Autoimmunerkrankungen beteiligt sind. Neben diesen T_{reg} -Zellarten existieren noch weitere T-Zell-Subspezies, denen immunregulatorische Funktionen zugeschrieben werden, beispielsweise die Th3-Zellen [20, 25-28].

Die zytotoxischen T-Zellen kommen vor allem bei der Abwehr von viralen Infektionen zum Einsatz. Über ihren TCR erkennen CD8-positive T-Effektorzellen via MHC-I präsentierte körperfremde Peptide und leiten direkt die Abtötung der befallenen Zellen ein. Das CD8-Molekül dient dabei als Co-Rezeptor für den TCR [29]. Die durch die zytotoxischen T-Zellen sezernierten Stoffe sind in erster Linie Perforin, Granzyme, Granulysin, Interferon- γ (IFN- γ), Leukotoxin- α (LT- α) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) [30, 31].

In der vorliegenden Arbeit wurde unter anderem mit HLA-Multimeren gearbeitet, welche auf Basis des HLA-A*02-Moleküls angefertigt sind. Die HLA-Moleküle sind Bestandteile des MHC auf den Zelloberflächen. Mittels dieser Multimere können beispielsweise Virus-spezifische CD8-positive Lymphozyten durch

spezifische Bindung an den TCR markiert und über einen angekoppelten Fluoreszenzfarbstoff sichtbar gemacht werden (siehe auch 2.6.2.).

T-Lymphozyten können im Anschluss an eine stattgehabte Immunantwort, ebenso wie die B-Lymphozyten (siehe 1.1.2.), Gedächtniszellen bilden. Diese lassen sich mit Hilfe der Oberflächenmarker CCR7, CD27, CD28 und CD45RA genauer charakterisieren. Nachdem sich eine T-Zelle mit ihrem entsprechenden Antigen auseinandergesetzt hat verändern sich zeitabhängig diese Oberflächenstrukturen entsprechend dem Differenzierungsstadium der Zelle (siehe Abbildung 3) [32].

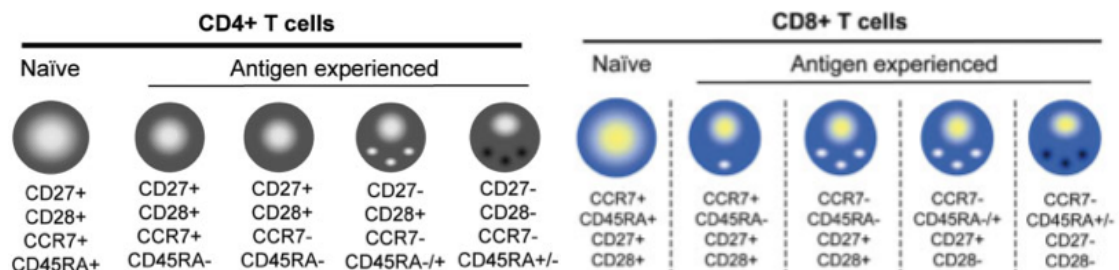


Abbildung 3: Oberflächenantigene auf CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten im zeitlichen Verlauf nach Antigenkontakt. Quelle: Appay et al., 2008, mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons [32].

Die Gedächtniszellen werden sowohl von den CD4- als auch von den CD8-positiven T-Zellen gebildet. Es kann dabei jeweils zwischen zwei verschiedenen Populationen unterschieden werden: den zentralen Gedächtniszellen und den Effektorgedächtniszellen. Den Gedächtniszellen fehlt der Oberflächenmarker CD45RA, wodurch sie gegenüber den Effektoren und den naiven Zellen abgegrenzt werden können. Über die zwei Oberflächenantigene CCR7 und CD28 können sie in die beiden oben genannten Gruppen eingeteilt werden. Die zentralen Gedächtniszellen können somit als $CD45RA^-CCR7^+CD28^+$ charakterisiert werden, während die Effektorgedächtniszellen den Phänotyp $CD45RA^-CCR7^-CD28^-$ aufweisen. Innerhalb der Effektorgedächtniszellen existieren zwei Subpopulationen, wovon eine, die so genannten T_{EMRA} -Zellen, wieder den Marker CD45RA exprimiert. Sie sind nur in sehr geringem Ausmaß zur Proliferation fähig, können dagegen aber eine sehr starke Immunreaktion

durch Zytokinausschüttung und Zelltötung hervorrufen, weshalb sie im Englischen auch als „terminally effector cells“ bezeichnet werden. Die zentralen Gedächtniszellen haben den Vorteil, sehr empfindlich auf einen erneuten Antigenkontakt zu reagieren, benötigen jedoch dann länger, um sich zu Effektoren zu differenzieren. Die Effektorgedächtniszellen dagegen werden nach Stimulation durch ihr Antigen sehr schnell wieder zu Effektoren und können somit schnell große Mengen an Zytokinen produzieren [7, 32-37].

Aktivierte T-Zellen exprimieren den Marker CD25 und können durch ihn gegenüber inaktiven T-Lymphozyten abgegrenzt werden [7].

Die $\gamma\delta$ -T-Zellen stellen die wesentlich kleinere Untergruppe der T-Lymphozyten dar. Sie wurden in der durchgeführten Arbeit nicht näher betrachtet und werden daher hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt. Ihre Funktion ist bis zuletzt nicht endgültig geklärt. In ihrem Aufbau unterscheiden sie sich durch einen veränderten TCR von den $\alpha\beta$ -T-Zellen. Durch ihre Möglichkeit, ein passendes Antigen direkt zu erkennen und bereits früh in der Immunantwort Zytokine zu produzieren, werden sie partiell auch zur angeborenen Immunabwehr gezählt (so genannte innate-like Lymphozyten = ILL) [7, 19, 38].

Eine weitere Zellart der ILL stellen die NKT-Zellen dar. Sie besitzen zum einen die α -Kette des TCR, darüber hinaus aber auch den NK-Zell-Rezeptor (CD 161) auf ihrer Oberfläche. Einmal aktiviert, können sie - äquivalent zur NK-Zell-Antwort - Zellen zerstören und IFN- γ und weitere Zytokine produzieren. Den NKT-Zellen wird ebenfalls eine regulatorische Funktion zugeschrieben [17, 39].

1.1.4. Ausgewählte Zytokine und ihre Bedeutung

Im Folgenden werden lediglich die in den durchgeführten Experimenten untersuchten Zytokine näher erläutert. Eine Vorstellung aller Zytokine findet sich in der verfügbaren Fachliteratur, beispielsweise in "Janeway's Immunobiology" [7].

Tabelle 2: In den durchgeführten Experimenten untersuchte Zytokine und ihre Bedeutung. IFN- γ = Interferon- γ , IL = Interleukin, TNF- α = Tumor-Nekrose-Faktor- α

Zytokin	Charakterisierung
IFN- γ	IFN- γ wird in erster Linie von aktivierten CD4-positiven T _H 1-Zellen, aber auch von CD8-positiven T-Zellen und von NK-Zellen produziert und sekretiert. Es stimuliert die Proliferation von B-Lymphozyten und wirkt auf die humorale Immunantwort, indem es die Isotyp-Klasse der produzierten Immunglobuline beeinflussen kann. Darüber hinaus aktiviert es die Makrophagen, regelt die MHC-I- und MHC-II-Expression, sowie die Antigenprozessierung herauf und hemmt die inhibitorischen Komponenten des Immunsystems. Des Weiteren ist das IFN- γ in der Lage, die Virusreplikation direkt zu hemmen und wird somit auch als Medikament bei viralen Infektionen eingesetzt [15, 40].
IL-2	Das Zytokin IL-2 ist ebenfalls unter dem Namen „T-Zell-Wachstumsfaktor“ bekannt. Es reguliert das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen. Produziert wird es von den Antigen-aktivierten T-Zellen (sowohl CD4- als auch CD8-positiv), aber auch von NK- und NKT-Zellen [41].
IL-5	IL-5 beeinflusst die Entwicklung, die Rekrutierung und das Überleben von eosinophilen Granulozyten positiv und spielt somit in der Pathogenese von Erkrankungen, die mit Überfunktion der eosinophilen Granulozyten assoziiert sind (v.a. Allergien) eine führende Rolle. Produziert wird es von Th2- und von Mastzellen [42].
IL-10	Dieses Interleukin hat hemmende Einflüsse auf die Immunantwort. Es wird unter anderem von den regulatorischen T-Zellen produziert [42]. Vor allem die Funktion der Makrophagen wird durch IL-10 eingedämmt, ebenso schwächt es die Wirkung der proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-12 und TNF- α (s.u.) ab [40].
IL-17A	IL-17 wird von den Th17-Zellen, einer Untergruppe der aktivierten, CD4-positiven T-Zellen, produziert, daneben auch von manchen CD8-positiven T-Zellen und von NK-Zellen. Es spielt eine zentrale Rolle in der Aktivierung der Immunantwort gegen extrazelluläre bakterielle und mykotische Infektionen, trägt jedoch auch zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis bei. Ein Beitrag zur Krebsentstehung und -ausbreitung scheint ebenfalls vorzuliegen [43]. Im Folgenden wird IL-17A nur noch als IL-17 bezeichnet.

TNF- α

Das proinflammatorische Zytokin TNF- α wird von vielen Zellen des Immunsystems produziert. Dazu zählen Makrophagen, T-Zellen und NK-Zellen, aber auch Monozyten und neutrophile Granulozyten. TNF- α trägt zur T-Zell-Aktivierung bei und unterhält die T-Zell-basierte Immunantwort. Ein bestimmter Polymorphismus des TNF- α -Gens (TNF- α -308 G/A) wird derzeit als Risikofaktor für die Entstehung von Prostatakarzinomen diskutiert [44, 45].

Das CD107a-Antigen, das sich vor allem auf aktivierten CD8-positiven Effektor-T-Zellen und aktivierten NK-Zellen findet, kann als Degranulations- bzw. Sekretionsmarker für die genannten Zellarten herangezogen werden. Es wird auch als LAMP-1 bezeichnet und findet sich bei den inaktiven Zellen auf der Membran der Granula. Fusionieren diese, beispielsweise bei der Exozytose von Perforin durch aktivierte CD8-positive T-Zellen, mit der Zellmembran, verbleibt das CD107a auf der Zelloberfläche [46].

1.1.5. Tumorimmunologie

Der Fachbereich der Tumorimmunologie befasst sich mit den Immunreaktionen des menschlichen Körpers, die gegen Tumoren gerichtet sind [15]. Die Ursprünge der Tumorimmunologie sind in Mausmodellen zu sehen. Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse gegen attenuierte Tumorzellen, die ihnen durch injiziert wurden, eine T-Zell-abhängige Immunantwort entwickeln, die sie vor einer Tumorentwicklung schützt, wenn im Anschluss die nicht abgeschwächten Tumorzellen inokuliert werden [47, 48]. Der durch die Mausmodelle erforschte Prozess wurde im Verlauf auch als Immunüberwachung oder Eliminierungsphase bezeichnet. Jedoch entwickeln die Tumore aufgrund des Selektionsdrucks Mechanismen bzw. Mutationen, um der Immunreaktion zu entgehen. Daraus folgt die so genannte Gleichgewichtsphase, in der nicht mehr alle Tumorzellen bekämpft werden können, da diese sich einen nicht mehr immunogenen Phänotyp angeeignet haben und somit vom Immunsystem nicht mehr angegriffen werden können. Beispiele für die Veränderungen sind die Modifikation oder der komplette Verlust der HLA-Expression oder eine Aktivierung von immunsuppressiven T_{reg}-Zellen. Daran schließt sich die

„Entkommensphase“ an, in der die Tumorzellen - nach ausreichend starker Veränderung - wieder ungehindert proliferieren können [49, 50].

Moderne Immuntherapien gegen verschiedenste Krebsarten wurden bereits erforscht und werden derzeit noch weiter entwickelt. Dazu gehören beispielsweise der adoptive T-Zell-Transfer [51], die Therapie mit monoklonalen Antikörpern gegen Tumorantigene oder Wachstumsfaktoren wie VEGF [52, 53] oder eine Verstärkung der anti-tumorösen Immunantwort durch Vakzinierung mit Peptiden oder mRNA, zum Beispiel beim Nierenzellkarzinom oder beim malignen Melanom [54]. Als allgemeines Krebsantigen kann das Enzym TERT (Telomerase reverse Transkriptase) angesehen werden, das von fast allen Krebsarten überexprimiert wird. Eine spezifisch dagegen gerichtete Therapie ist jedoch nicht möglich, da TERT auch bei den hämatopoetischen Stammzellen zu finden ist. Für den Hodenkrebs gibt es bereits mehrere gut erforschte Tumor-assoziierte Antigene wie NY-ESO-1, MAGE-A3 und LAGE-1. Als Antigene für das Prostatakarzinom (PCa) sind beispielsweise das PSA (Prostata-spezifisches Antigen) und das PSMA (Prostata-spezifisches Membran-Antigen) bekannt [55-57].

Hervorzuheben ist die bereits zugelassene Immun-Checkpoint-Blockade mit monoklonalen Antikörpern gegen CTLA-4 (z.B. Ipilimumab) und PD-1 (z.B. Nivolumab). Diese wirken nicht direkt gegen die Tumorzellen wie beispielweise anti-CD20-Antikörper bei Lymphomen, sondern verstärken die anti-tumoröse Immunantwort von cytotoxischen T-Lymphozyten, indem sie wichtige immunsupprimierende Moleküle der Immunantwort auf T-Zellen, Antigen-präsentierenden Zellen oder Tumorzellen, beziehungsweise deren Liganden, blockieren. Mittels der anti-CTLA-4-Antikörper konnten auch beim Prostatakarzinom günstigere Verläufe gezeigt werden (siehe auch 1.2.5.). CTLA-4 bewirkt eine Abschwächung der T-Zell-Immunantwort und PD-1 sorgt dafür, dass Effektor-T-Zellen in ein Stadium der Erschöpfung oder Anergie übergehen. Eine Hemmung dieser beiden Strukturen hat somit einen günstigen Einfluss auf die Anti-Tumor-Immunantwort. Kombinationstherapien, die eine Immun-Checkpoint-Blockade beinhalten sind ein Thema der gegenwärtigen Forschung [58].

Für das Prostatakarzinom bestehen bereits verschiedene Möglichkeiten der Immuntherapie, unter anderem die Therapie mit Ipilimumab (s.o.). Eine gute Übersicht bietet eine Arbeit von Charles G. Drake aus dem Jahr 2010 [59]. Die einzelnen Therapiemöglichkeiten sind in 1.2.5. näher erläutert. Für die meisten existiert bisher jedoch noch keine Zulassung, sodass sie lediglich im Rahmen von Entwicklungsstudien zum Einsatz kommen.

Der Zusammenhang zwischen dem humanen Immunsystem und dem Prostatakarzinom wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Ein Überblick über die relevanten Ergebnisse wurde 2014 von Ness et al. publiziert [60]. Die gesunde Prostata enthält normalerweise nur geringe Anzahlen an Immunzellen. Bei chronischen Erkrankungen der Prostata ist die Anzahl der Lymphozyten im Stroma jedoch erhöht und ihre Zusammensetzung verändert, ebenso bei einem Prostatakarzinom. Die Lymphozyten in den Tumoren (TIL = Tumor-infiltrierende Lymphozyten) gehören vor allem den CD8- und CD4-positiven T-Lymphozyten an. Eine hohe Anzahl an TIL (gesamte Anzahl der T-Lymphozyten im Tumor, sowie Anzahl der CD8-positiven Zellen im Tumor alleine) stellt - im Gegensatz zum Vorhandensein von TIL bei anderen Tumoren - beim Prostatakarzinom einen negativen prognostischen Faktor bezüglich des biochemischen Rezidivrisikos dar. Unter einem biochemischen Rezidiv versteht man den erneuten Anstieg des Tumormarkers PSA im Blut der Patienten nach einer primär erfolgreichen, definitiven, kurativen Therapie. Die Anzahl an CD3-positiven Lymphozyten im Tumor korreliert mit dem Risiko für eine Fernmetastasierung. Des Weiteren wird berichtet, dass die CD8-positiven T-Lymphozyten in Prostata Tumoren nach Antigenkontakt einer klonalen Vermehrung unterliegen. Gleichzeitig wurde eine hohe Expression von PD-1 gefunden, die wiederum die Therapie mit entsprechenden Antikörpern (s.o.) sinnvoll erscheinen lässt [60-64].

Betrachtet man die Menge der CD4- und Foxp3-positiven regulatorischen Zellen im Blut der PCa-Patienten, so korreliert ihre Anzahl mit der Letalität bzw. mit einem schlechteren klinischen Outcome der malignen Erkrankung, was dafür spricht, dass die Unterdrückung des Immunsystems durch den Tumor,

sowie verschiedene Immunevasionsmechanismen bei der Entwicklung eines Prostatakarzinoms eine wichtige Rolle spielen [60, 65, 66].

1.2. Das Prostatakarzinom

1.2.1. Epidemiologie und Ätiologie

Mit 25,4 % der Krebserkrankungen bei Männern ist das Prostatakarzinom nach wie vor die häufigste Krebsart des Mannes. Bei den Krebstodesursachen steht das PCa auf Rang drei (nach Lungenkrebs und Darmkrebs, siehe Abbildung 4) [67, 68].

Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2010

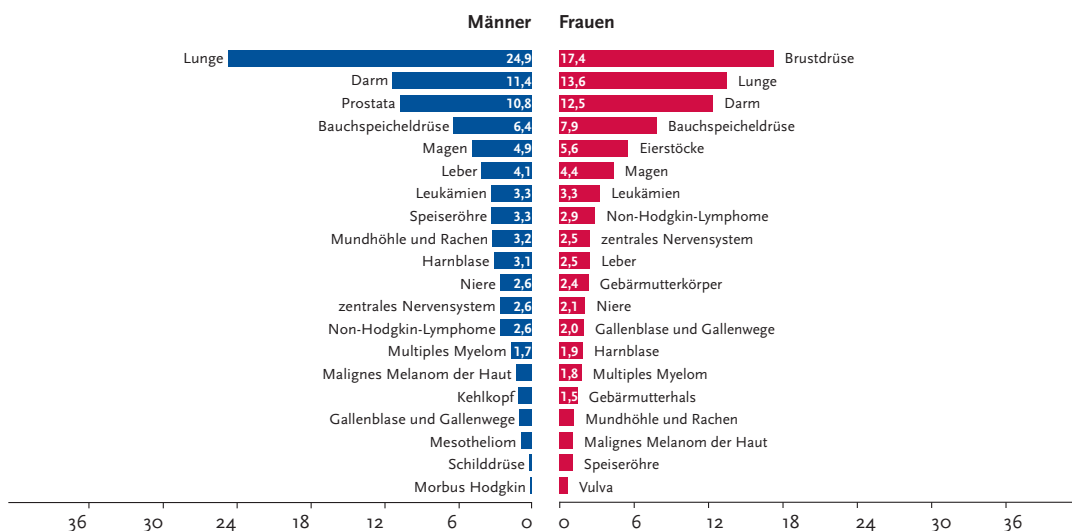


Abbildung 4: Häufigkeit der Krebssterbefälle in Deutschland 2010. Quelle: RKI [68].

Während die altersstandardisierte Erkrankungsrate über die letzten Jahre leicht anstieg und sich derzeit bei etwa 111 Neuerkrankungen pro 100.000 Männer pro Jahr konstant hält, ist die Sterberate des PCa rückläufig (Jahr 2010: 20 / 100.000 / Jahr). Der Median des Erkrankungsalters liegt aktuellen Daten zufolge bei 70 Jahren, die relative Fünfjahres-Überlebensrate bei 93 % [68].

Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten,
ICD-10 C61, Deutschland 1999 – 2010
je 100.000 (Europastandard)

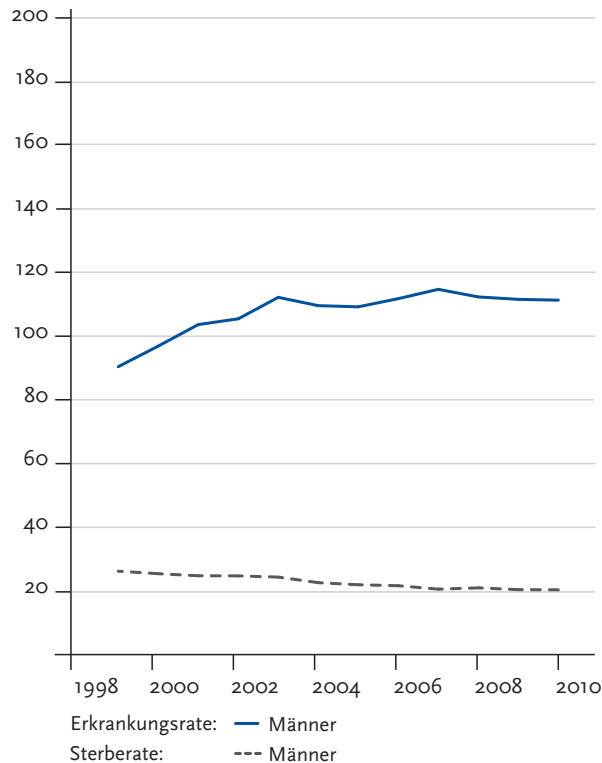


Abbildung 5: Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten für das PCa in Deutschland.
Quelle: RKI [68].

Europaweit lässt sich für das PCa ein Nord-Süd-Gefälle verzeichnen, weltweit zusätzlich ein West-Ost-Gefälle, wobei in Asien die Zahlen am geringsten sind. Bei schwarzafrikanischen Männern kommt Prostatakrebs häufiger vor als bei Europäern und weißen Nordamerikanern [68]. Während in Skandinavien eine hohe Inzidenz und Mortalität herrscht, sind die Zahlen im Mittelmeerraum für Europa am geringsten [67, 69]. Weltweit schwanken die Daten zu Inzidenz und Prävalenz stark, was unter anderem auf die unterschiedlich häufige Anwendung des Screenings mit PSA-Wert-Bestimmung zurückzuführen ist [69]. Der Marker PSA im Blut der Patienten ist unter anderem bei Prostatakrebs erhöht. Er kann jedoch auch bei anderen Erkrankungen der Prostata verändert sein und ist somit kein spezifischer Wert. Aktuell bemüht sich die Forschung um neue Biomarker für das Prostatakarzinom [67, 70].

Es besteht der Expertenkonsens, dass der Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines PCa das Alter ist [67]. Mehrere Metaanalysen haben bewiesen, dass die

nahe Verwandtschaft zu Betroffenen - insbesondere wenn diese sehr jung waren - eine Risikoerhöhung mit sich bringt. Betroffene Brüder stellen dabei ein höheres Erkrankungsrisiko dar als betroffene Väter [71-73]. Diskutiert werden darüber hinaus der Einfluss einer Hormonersatztherapie mit Testosteron, lokale Entzündungsprozesse und die Einnahme von Vitamin E zur Nahrungsergänzung als potenzielle Risikofaktoren für ein PCa [67, 68].

1.2.2. Diagnostik und Stadieneinteilung

Die Früherkennung und Vorsorge des PCa wird in Deutschland Männern ab einem Alter von 45 Jahren angeboten. Ergeben sich Auffälligkeiten bei der digital-rektalen Untersuchung oder beim laborchemisch bestimmten PSA-Wert (dieser wird nur optional auf Wunsch des Patienten ermittelt und ist im Leistungsspektrum der Krankenkassen nicht beinhaltet) aus dem Serum des Patienten (erster Wert kontrolliert ≥ 4 ng/ml oder Anstieg ohne Wechsel des Laborverfahrens), so sollte eine Stanzbiopsie unter sonographischer Kontrolle durchgeführt werden [67, 74-79].

Bei einem Verdacht auf ein Prostatakarzinom erfolgt die sogenannte Primärdiagnostik zur Diagnosesicherung und Stadieneinteilung:

- digital-rektale Untersuchung [80]
- transrektale Sonographie und gezielte Stanzbiopsie [81-83]
- ggf. MRT (Magnetresonanztomographie) [84, 85]

Im Anschluss an die Primärdiagnostik findet das Staging statt, worunter man die Diagnostik der genauen Ausdehnung des Karzinoms (lokale Ausbreitung, Metastasierung und Zuordnung zu einer Risikogruppe) versteht. Die Stadieneinteilung (Tumorgröße, -ausdehnung und Metastasierung) erfolgt dabei nach der international gültigen UICC-Klassifikation (auch bekannt als TNM-Klassifikation) [67]. Im Zuge der Risikostratifizierung werden verschiedene Parameter herangezogen, die in der folgenden Tabelle 3 zusammengefasst sind. Für einen Niedrigrisikotumor müssen alle drei angegebenen Parameter der Kategorie erfüllt sein. Sobald ein Wert der mittleren oder hohen Risikogruppe erreicht ist, wird das PCa mit einem höheren Risiko eingestuft.

Tabelle 3: Risikoeinteilung der Prostatakarzinome unter Beachtung des PSA-Wertes, des Gleason-Scores und der T-Kategorie des Tumors.

Risikogruppe	PSA-Wert (ng/ml)	Gleason-Score	T-Kategorie
niedriges Risiko	≤ 10	≤ 6	≤ 1c
intermediäres / mittleres Risiko	> 10 - 20	7	2a - 2b
hohes Risiko	> 20	≥ 8	≥ 2c

Der Gleason-Score wird bei der pathologischen Untersuchung der Stanzbiopsien ermittelt und setzt sich aus der Punktesumme der zwei am häufigsten vertretenen Gewebearten zusammen (siehe Abbildung 6). Es kann dabei ein Wert von zwei bis zehn erreicht werden. Mit dem Gleason-Score wird das sogenannte Tumorgading durchgeführt, durch welches das PCa in drei Aggressivitätsgrade eingeteilt werden kann: G1 (Gleason-Score ≤ 6), G2 (Gleason-Score 7) und G3 (Gleason-Score ≥ 8) [86, 87].

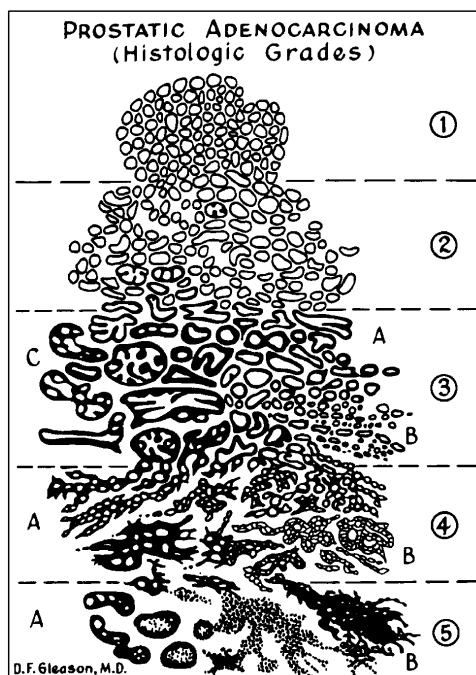


Abbildung 6: Originalgrafik von D. F. Gleason zur Einteilung der histologischen Befunde in den Gleason-Score. Die Punktevergabe erfolgt nach der Drüsenmorphologie, je höher die Ziffer (1-5), desto stärker ist das Gewebe im Tumor im Vergleich zum ursprünglichen Prostatagewebe verändert. Die Punkte 3-5 können durch die Unterkategorien A und B (bei Punkt 3 auch C) noch genauer eingeteilt werden. Quelle: Humphrey, 2004, mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group [86].

Für die Einordnung des T-Stadiums werden in erster Linie die Ergebnisse der digital-rektalen Untersuchung und der apparativen Diagnostik, die bereits für die Primärdiagnose durchgeführt wurde, herangezogen. Auch der pathomorphologische Befund spielt vor allem bei kleinen Tumoren eine wesentliche Rolle [67, 88]. Folgende Einteilung gilt seit dem Jahr 2010:

Tabelle 4: Pathologische TNM-Klassifikation des PCa nach den UICC-Richtlinien. Quelle: Cheng et al. 2012 [88]

Stadium	Bedeutung
Tx - Tumor nicht beurteilbar	
T0 - Kein Hinweis auf einen Primärtumor	
T1 - inapparenter Tumor, nicht palpabel, bildgebend nicht darstellbar	
T1a	Zufallsbefund in $\leq 5\%$ von reseziertem Gewebe
T1b	Zufallsbefund in $> 5\%$ von reseziertem Gewebe
T1c	Tumor durch Nadelbiopsie (z.B. wegen erhöhtem PSA) identifiziert
T2 - Tumor auf die Prostata begrenzt	
T2a	Tumor in weniger als der Hälfte eines Prostatalappens
T2b	Tumor in mehr als der Hälfte eines Prostatalappens, aber nur ein Lappen befallen
T2c	Tumor in beiden Prostatalappen
T3 - Tumor durchbricht die Prostata kapsel	
T3a	Durchbrechung der Kapsel ohne Affektion anderer Gewebe
T3b	Tumorinfiltration in die Samenblasen
T4 - Tumor ist an andere Gewebe fixiert oder invadiert andere Gewebe	
N - Lymphknotenmetastasen	
Nx	regionäre Lymphknoten wurden nicht untersucht
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	regionäre Lymphknotenmetastasen vorhanden
M - Fernmetastasen	
M0	keine Fernmetastasen
M1a	Lymphknotenmetastasen in nicht-regionären Lymphknoten
M1b	Knochenmetastasen
M1c	andere Fernmetastasen

Patienten mit Hoch-Risiko-Konstellationen (Gleason-Score ≥ 8 oder klinisches T-Stadium $\geq T3$), hohen PSA-Werten (> 20 ng/ml) oder Knochenschmerzen sollten weitere Untersuchungen im Rahmen des Stagings erhalten um dieses zu komplettieren. Dazu zählen ein MRT oder CT (Computertomographie) der

Beckenorgane bzw. eine Skelettszintigraphie [67, 89]. Ist das Staging abgeschlossen, wird der Patient über die unterschiedlichen Therapiemöglichkeiten (siehe 1.2.3.) aufgeklärt und beraten und trifft in Absprache mit den behandelnden Ärzten - meist nach Empfehlung einer interdisziplinären Tumorkonferenz - die Entscheidung für das weitere Vorgehen.

Eine allgemeine Aussage zur Prognose des Prostatakarzinoms zu treffen gestaltet sich als überaus schwierig. Durch die sehr unterschiedlichen Aggressivitätsgrade und verschiedenen Therapieoptionen existieren keine einheitlichen Daten zur Mortalität bzw. zum progressionsfreien Überleben.

1.2.3. Standardtherapieverfahren bei lokalisiertem Prostatakarzinom

Die Entscheidung über das genaue therapeutische Vorgehen nach der Diagnosestellung liegt beim Patienten selbst. Er sollte dazu die Möglichkeit haben, sich über die unterschiedlichen Therapieoptionen bei einem Urologen und einem Strahlentherapeuten detailliert zu informieren und sich beraten zu lassen. Die folgenden Standard-Therapieoptionen stehen nach den aktuellen Leitlinien zur Verfügung [67, 90]:

- „Watchful Waiting“ und palliative Therapie:
Eine mögliche Übersetzung des Begriffes Watchful Waiting ins Deutsche könnte das abwartende Offenhalten sein, das eine breite Anwendung in der Allgemeinmedizin hat. Es wird bei Patienten mit einer krebsunabhängigen Lebenserwartung von weniger als zehn Jahren angewendet. Ein therapeutisches Eingreifen im Sinne von hormonablativer Therapie (s.u.) oder palliativen Maßnahmen erfolgt nur bei einer Einschränkung der Lebensqualität durch den Tumor [67, 90-93].
- Aktive Überwachung („Active Surveillance“):
Unter der aktiven Überwachung versteht man die engmaschige Kontrolle des PCa mit PSA-Wert, digital-rektaler Untersuchung und vor allem mit erneuten Biopsien. Eine aktive Überwachung sollte nur bei Tumoren mit einem PSA-Wert ≤ 10 ng/ml, einem Gleason-Score ≤ 6 und einem klinischen T-Stadium $\leq T2a$ durchgeführt werden. Eine weitere

Voraussetzung ist, dass bei den Biopsien der Primärdiagnostik in maximal zwei Stenzen ein Tumor nachgewiesen werden konnte und dieser jeweils höchstens 50 % des untersuchten Gewebes infiltriert hat. Kommt es im Verlauf zu einem PSA-Anstieg oder wird in den Biopsien ein Tumor mit einem höheren Gleason-Grad gefunden, ist ein Übergang zum Watchful Waiting oder zu einer definitiven Therapieform (Radiotherapie oder Resektion) indiziert [94, 95].

- Radikale Prostatektomie:

Die radikale, operative Entfernung der Prostata stellt eine der definitiven Therapieformen für das lokalisierte PCa dar. Vor allem, wenn mit hoher Sicherheit eine komplette Tumorentfernung (so genannte R0-Resektion) möglich ist, ist die chirurgische Prostataentfernung eine Option. Sie kann offen-chirurgisch, laparoskopisch und Roboter-gestützt durchgeführt werden [78, 91, 96, 97]. Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren wird auch eine Lymphadenektomie diskutiert [67].

- Perkutane Strahlentherapie:

siehe 1.2.4.

- Brachytherapie:

Unter Brachytherapie versteht man eine interne Radiotherapie, bei der die Strahlungsquelle direkt in die Prostata eingebracht wird. Je nach Stadium des Tumors kann eine so genannte low oder high dose rate-Brachytherapie (LDR- / HDR-Brachytherapie) durchgeführt und gegebenenfalls mit einer perkutanen Strahlentherapie (siehe 1.2.4.) kombiniert werden [67, 98-103].

- Hormon-ablative Therapie (HAT) bzw. Androgendeprivation:

Eine primäre HAT findet nur beim Watchful Waiting (s.o.) und im metastasierten Stadium Verwendung [104, 105]. In Kombination mit der Strahlentherapie wird die HAT häufig bei Tumoren der mittleren oder hohen Risikogruppe in adjuvanter oder neoadjuvanter Form eingesetzt. Die Dauer richtet sich nach dem Tumorrisiko und wird nach klinikinternen Leitlinien der Universitätsklinik Tübingen für sechs Monate bis drei Jahre durchgeführt [67, 106-108]. Die Therapie wird mit bilateraler

Orchiektomie (dauerhaftes Verfahren, hierfür konnte in Kombination mit der Radiotherapie ein signifikanter Vorteil gegenüber den anderen Verfahren gezeigt werden [109, 110], trotzdem wird die so genannte chirurgische Kastration nur sehr selten durchgeführt), LHRH-Analoga (Luteinisierungs-Hormon Releasing-Hormon-Analoga), GnRH-Blockern (Gonadotropin-Releasing-Hormon-Blocker) oder Antiandrogenen durchgeführt [111]. Durch die HAT wird die Testosteronproduktion herabgesetzt und somit das Wachstum der Prostatazellen reduziert.

- Interventionelle Verfahren:

Für die Therapie des lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinoms stehen noch weitere interventionelle Therapieverfahren zur Verfügung, für deren alleinigen Einsatz es bisher jedoch keine Therapieempfehlung gibt. Dazu gehören der hochintensive fokussierte Ultraschall (HIFU), die Kryotherapie, sowie die Hyperthermiebehandlung. Diese Methoden werden jedoch immer mit einer anderen Therapieform, beispielsweise einer Radiotherapie, kombiniert [112, 113].

- Chemotherapie:

Eine Chemotherapie - beim Prostatakarzinom wird vor allem Docetaxel eingesetzt - kommt für die Therapie des lokalisierten Karzinoms nicht in Frage. Sie wird erst bei einer Erkrankung im metastasierten Stadium eingesetzt, die auf eine HAT nicht oder nicht mehr anspricht [67, 114]. Da sich die vorliegende Arbeit nur mit nicht metastasierten Tumoren befasst, soll die Chemotherapie hier nur ergänzend erwähnt werden.

1.2.4. Perkutane Radiotherapie

Für das lokal begrenzte PCa stellt die Radiotherapie in konformaler Technik den aktuellen Therapieleitlinien zufolge eine definitive Behandlungsmöglichkeit dar. Die Gesamtstrahlendosis kann dabei zwischen 74 und 80 Gray (Gy) gewählt werden, pro Fraktion werden 1,8 bis 2,0 Gy appliziert [67, 115-118]. Bei Tumoren mit intermediärem Risiko kann, bei hohem Risiko sollte die Bestrahlung durch eine HAT unterstützt werden [119, 120].

Liegt ein lokal fortgeschrittenes PCa vor, ist die Radiotherapie ebenfalls als primäre kurative Therapie einsetzbar. Sie wird dazu grundsätzlich mit einer HAT

über zwei bis drei Jahre kombiniert [121-124]. Nach den in der Klinik für Radioonkologie der Universitätsklinik Tübingen verwendeten Therapieplänen können die Lymphabflusswege im Becken bei lokal fortgeschrittenen Tumoren mit einer Gesamtdosis von 50,4 Gy mitbestrahlt werden. Die Expertenmeinung hierzu variiert derzeit [125-127]. Supportiv kann eine Therapie mit fakultativ steroidhaltigen Cremes am Enddarm, mit Stuhlregulanzen oder mit Nichtopioidanalgetika erfolgen.

1.2.5. Immunologische Therapieansätze

Im Laufe der letzten Jahre wurde die Immuntherapie des PCa kontinuierlich weiterentwickelt und teilweise bereits in klinischen Studienprotokollen untersucht [128, 129]. Es wurden verschiedene Strategien eingesetzt, um den Prostatakrebs durch immunologische Verfahren zu beeinflussen, die im folgenden Abschnitt näher beleuchtet werden sollen. Häufig wurden die immuntherapeutischen Ansätze nur in fortgeschrittenen Karzinomen getestet (z.B. kastrationsresistentes oder metastasiertes PCa). Für den lokalisierten Prostatakrebs gibt es bisher nur wenige veröffentlichte Publikationen bezüglich einer Immuntherapie. Fast alle im Folgenden erwähnten Ansätze sind nach wie vor experimentelle Therapien im Rahmen von klinischen Studien. Gute Übersichten zu den unterschiedlichen Vorgehensweisen liefern die Arbeiten von Drake et al. (2012) [130], Bedke et al. (2012) [131], Gerritsen (2012) [132] und Schweizer et al. (2014) [133].

- **GVAX:**

Beim GVAX-Verfahren wird ein Impfstoff aus zwei PCa-Zelllinien gewonnen, die zuvor bestrahlt, immortalisiert und durch den Einbau des GM-CSF-Gens verändert wurden. Es handelt sich somit um eine allogene Tumorzellvakzine. In verschiedenen Studien konnte gegenüber anderen Therapieverfahren jedoch kein Vorteil im Gesamtüberleben gezeigt werden. GVAX wurde jedoch nur bei Patienten mit kastrationsresistentem PCa getestet [131].

- **Sipuleucel-T:**

Die Impfung Sipuleucel-T basiert auf dendritischen Zellen, die als Antigen-präsentierende Zellen eine wesentliche Rolle spielen. Die

dendritischen Zellen der Patienten werden, neben anderen Immunzellen, zunächst durch Leukapherese isoliert, um dann nach mehreren Bearbeitungsschritten mit der prostatistischen sauren Phosphatase (PAP) als Fusionsprotein mit GM-CSF kultiviert zu werden. Im Anschluss werden die Zellen aus der in vitro-Kultur an den Patienten zurück gegeben und lösen dort eine Immunantwort gegen das PCa aus (siehe auch Abbildung 7). Das Verfahren ist seit 2010 in den USA zugelassen, in Europa erfolgte die Zulassung im Jahr 2013. Letztere wurde im Mai 2015 jedoch zurück genommen. Anwendung findet das Sipuleucel-T-Verfahren beim kastrationsresistenten, metastasierten PCa. Dabei konnte ein Überlebensvorteil von mindestens 3,9 Monaten gegenüber der Kontrollgruppe gezeigt werden [129-132, 134-136].

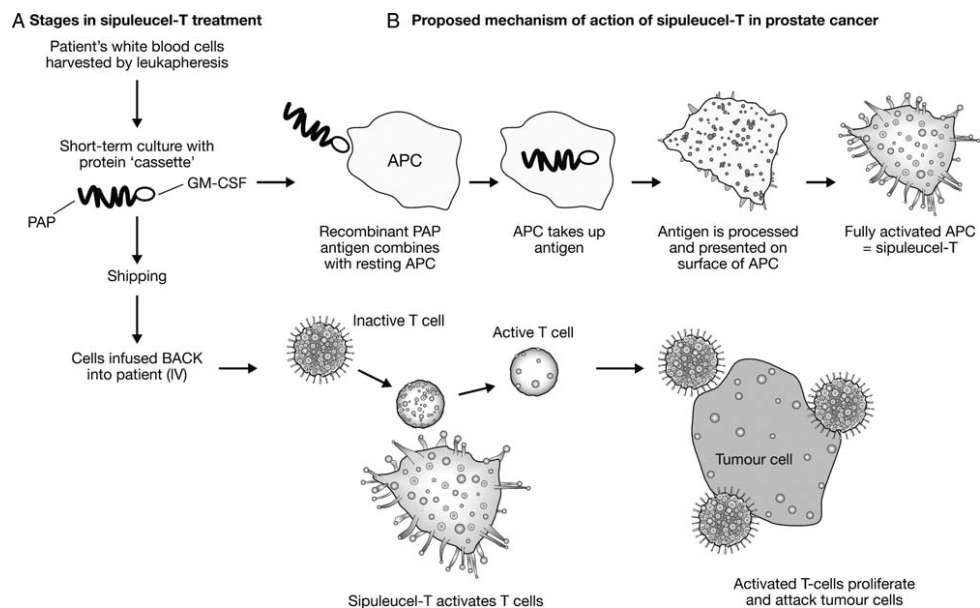


Abbildung 7: A: Ablauf der Behandlung mit Sipuleucel-T; B: Vermuteter Wirkmechanismus von Sipuleucel-T, Quelle: Gerritsen, 2012, mit freundlicher Genehmigung der Oxford University Press [132].

- ProstVac-VF:

Der ProstVac-VF-Impfstoff beinhaltet Pockenviren, die auch Gene für PSA und mehrere costimulatorische Moleküle (B7.1, ICAM-1 und LFA-3) enthalten. Die endgültigen Ergebnisse der derzeit laufenden Phase 3-Studie liegen im Moment noch nicht vor. Bereits vorhandene

Zwischenergebnisse und die Endergebnisse der abgeschlossenen Phase 2-Studie für den kastrationsresistenten, metastasierten Prostatakrebs sind jedoch vielversprechend, da bereits eine verringerte Sterbensrate, sowie ein verbessertes Gesamtüberleben nachgewiesen werden konnte [130-132, 137-139].

- **pTVG-HP:**
Hierbei handelt es sich um eine DNA-Vakzine, die für PAP codiert. DNA-Impfstoffe sind deutlich weniger immunogen als beispielsweise virusbasierte Vakzinen (s.o.), jedoch lieferten die bisherigen Phase 2-Studien gute Ergebnisse für die Immunantwort und konnten eine Verlängerung der PSA-Verdopplungszeit nachweisen. Das pTVG-HP-Verfahren wurde in Patienten mit biochemischem Rezidiv nach definitiver Therapie (Operation oder Bestrahlung) ohne klinisch manifeste Metastasen getestet [130, 140].
- **mRNA-Vakzinierung:**
Bei dieser Vakzinierungsart wird stabilisierte mRNA, die für unterschiedliche tumorassoziierte Antigene (TAA) codiert, dem Patienten verabreicht. In bereits durchgeführten Studien waren dies PSA, PSCA, PSMA und STEAP1. Bei knapp 80 % der Patienten mit kastrationsresistentem PCa (mit und ohne klinisch manifesten Metastasen) konnte eine Immunantwort gegen mindestens ein TAA nachgewiesen werden [131, 141, 142].
- **Peptidvakzinierung:**
Die Vakzinierung mit Peptiden funktioniert ähnlich wie die mRNA-Vakzinierung und wird auch in Kombination getestet. Intradermal oder subcutan werden den Patienten Fragmente von TAA meist zusammen mit einem Adjuvanz verabreicht. Die verwendeten Peptide sind dabei HLA-bindende T-Zell-Epitope. Es werden dabei entweder speziell für einen Patienten ausgewählte Peptide verabreicht oder ein Cocktail aus mehreren Peptiden. Mit dem zweiten Ansatz wird versucht, eine verbesserte Immunantwort zu erzielen [128, 131, 143, 144]. Eine weitere Möglichkeit bietet sich durch die Beladung von dendritischen Zellen mit

entsprechenden Antigenen und deren Verabreichung an Patienten mit Hormon-refraktärem PCa [145]. Die experimentelle Therapie der Peptidvakzinierung wird in besonderem Maße durch das Institut für Immunologie der Universität Tübingen in Kooperation mit der Universitätsklinik Tübingen erforscht und vorangetrieben.

- anti-CTLA-4-Antikörper (Ipilimumab und Tremelimumab):
Die humanen monoklonalen Antikörper Ipilimumab und Tremelimumab hemmen das CTLA-4-Molekül auf CD4- und CD8-positiven T-Zellen, das an sich eine hemmende Wirkung auf das Immunsystem hat. Man spricht dabei von einer „Immun-Checkpoint-Blockade“. Somit wird eine verstärkte anti-Tumor-Immunantwort ermöglicht. Ursprünglich wurden die Antikörper für die Therapie des malignen Melanoms entwickelt, jedoch konnten verschiedene Studien für Ipilimumab auch Vorteile für die Therapie des PCa zeigen. Weitere monoklonale Antikörper (gegen CTLA-4, sowie gegen neu entdeckte Strukturen) sind derzeit in Entwicklung [58, 130-132, 146-149].
- anti-PD-1-Antikörper (z.B. Nivolumab):
Ähnlich wie CTLA-4 hat auch der Rezeptor PD-1 bei Aktivierung eine negative Wirkung auf das Immunsystem. Der entsprechende Pfad resultiert in Anergie oder Immunerschöpfung (siehe auch 1.1.5.). Somit konnte mit dem PD-1-Molekül auch ein potenzielles Ziel für die Antikörpertherapie ausgemacht werden. Zur Wirksamkeit eines entsprechenden Antikörpers existieren für kastrationsresistenten Prostatakrebs bereits einige Studien [58, 133, 150, 151].
- J591 und ¹⁷⁷Lu-J591:
Ein weiterer monoklonaler Antikörper (J591), der allerdings passiv durch die Bindung an PSMA wirkt und dessen Internalisierung veranlasst, wurde bereits 1997 entwickelt [152]. Die Bindung an PSMA erfolgte in hohem Maße, jedoch konnte nur eine geringe antitumoröse Wirkung gezeigt werden. In der weiteren Entwicklung wurde der J591-Antikörper mit ¹⁷⁷Lutetium radioaktiv markiert und sorgte somit zusätzlich für eine vielversprechende innere Bestrahlung des PCa. Studien mit diesem

Ansatz wurden bisher nur bei Patienten mit kastrationsresistentem PCa mit Metastasen durchgeführt [130, 153-155].

Bisher ist noch nicht endgültig geklärt, zu welchem Zeitpunkt die immunologischen Therapieverfahren im kurativen Ansatz optimalerweise eingesetzt werden sollten. Ebenfalls herrscht nach wie vor Unklarheit über die Kombination verschiedener immunologischer Verfahren, genauso wie für die Kombination der unter 1.2.3. und 1.2.4. genannten Standardtherapieverfahren mit der Immuntherapie [130, 132]. In Studien wurde die Kombination aus Immuntherapie und Bestrahlung sowohl beim lokalisierten (beispielsweise intraprostatiche Injektion von dendritischen Zellen als Immuntherapie), als auch beim metastasierten (z.B. Ipilimumab als Immuntherapie) PCa bereits getestet. Die Studienergebnisse weisen auf die Möglichkeit hin, dass ein immuntherapeutisches Verfahren mit der Radiotherapie kombiniert werden kann [148, 156].

1.3. Fragestellung

Diese Arbeit befasst sich mit den Auswirkungen der Strahlentherapie bei lokalisiertem PCa auf das humane Immunsystem. Mehreren Patienten wurde dazu vor, während und nach der Radiotherapie Blut abgenommen und daraus die Immunzellen bzw. PBMC (peripheral blood mononuclear cells = mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) isoliert. Durch jeweils vier Färbungen mit mehreren Fluoreszenzfarbstoff-beladenen Antikörpern wurden mittels der Mehrfarben-Durchflusszytometrie Erkenntnisse über die Immunzellen der Patienten gewonnen. Zum einen wurden die Ergebnisse über den Zeitverlauf der Therapie beurteilt, zum anderen verschiedene Patientengruppen miteinander verglichen (beispielsweise HAT vs. keine HAT und zusätzliche pelvine Lymphabflussbestrahlung vs. Standard-Bestrahlung). Des Weiteren wurde sechs gesunden Spendern Blut abgenommen und deren PBMC ebenfalls isoliert und entsprechend gefärbt, sodass die Gesamtheit der Patienten auch mit einer gesunden Kohorte verglichen werden konnte. Die erhobenen Parameter des Immunsystems waren neben den Zellzahlverläufen der verschiedenen Lymphozytensubgruppen auch die Proliferationsrate, die

Zellviabilität und die Differenzierungsstufen der Immunzellen. Darüber hinaus konnten durch intrazelluläre Zytokinfärbungen Aussagen über die Zellfunktion getroffen werden.

Als primäres Ziel der Arbeit sollen die Auswirkungen der therapeutischen Bestrahlung beim lokalisierten PCa auf das humane Immunsystem erforscht werden, vor allem in Anbetracht einer potenziellen Kombination der Radiotherapie mit einer Peptidvakzinierung als immuntherapeutisches Verfahren.

Das zweite, längerfristige Ziel ist die Integration der bereits in der Klinik erprobten therapeutischen Peptidvakzinierung [128, 157] in das Radiotherapie-Protokoll des PCa. Über die durchgeführten Untersuchungen zum Immunsystem während der Bestrahlungstherapie sollen außerdem Aussagen zum optimalen Zeitpunkt der Vakzinierungen abgeleitet werden.

2. Material und Methoden

2.1. Die durchgeführte Studie

2.1.1. Design

Das Ziel der Studie war, eventuell stattfindende Veränderungen im Immunstatus unter Radiotherapie bei lokalisiertem, nicht-metastasiertem, Prostatakarzinom zu erkennen. Ursprünglich waren für die Studie 20 Prostatakrebspatienten und fünf gesunde Spender mit einem ähnlichen Altersspektrum vorgesehen. Tatsächlich wurden 21 Patienten und sechs gesunde Spender eingeschlossen (siehe Abbildung 8).

Die Studie wurde als Kooperation zwischen der Klinik für Radioonkologie und dem Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie durchgeführt. Federführend waren Dr. Franziska Eckert und Dr. Cihan Gani aus der Klinik für Radioonkologie und Dr. Cécile Gouttefangeas aus der Abteilung Immunologie für die Studie verantwortlich. Die Rekrutierung der Patienten erfolgte in der Klinik für Radioonkologie des Universitätsklinikums Tübingen. Ein

positives Votum der Ethikkommission der Universitätsklinik Tübingen wurde zuvor eingeholt (Projekt-Nr. 402/2010BO2).

2.1.2. Ein- und Ausschlusskriterien

In die Studie wurden nur Patienten mit lokalisiertem Prostatakarzinom (T1-4 N0 M0) eingeschlossen, die mit definitiver Radiotherapie, ggf. in Kombination mit einer HAT, behandelt wurden und für die MHC-Klasse I das Allel HLA-A*02 aufwiesen. Letzteres war für die Durchführung der HLA-Multimer-Färbungen zwingend erforderlich. (siehe 2.6.2.). Zur Feststellung des HLA-Status wurde vor Studieneinschluss vom Zentrum für klinische Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen eine entsprechende Typisierung durchgeführt. Die Patienten mussten außerdem volljährig und selbst einwilligungsfähig sein.

Ausschlusskriterien waren das Vorliegen einer Anämie (Hb < 12 g/dl), sowie das Vorhandensein von regionären oder Fernmetastasen. Bei einer parallelen Kortison- oder Chemotherapie oder der Einnahme anderer Immunsuppressiva konnten die Patienten ebenfalls nicht teilnehmen. Ausgeschlossen wurden des weiteren Patienten mit einer floriden Autoimmunerkrankung.

Ein Abbruch der Teilnahme konnte jederzeit auf Wunsch des Patienten erfolgen.

2.1.3. Patienten

Zwischen Juni 2011 und März 2012 wurde Patienten, die sich in der Klinik für Radioonkologie der Universitätsklinik Tübingen zur Bestrahlung ihres nicht-metastasierten Prostatakarzinoms vorstellten, die Teilnahme an der Studie angeboten. 63 Patienten wurden daraufhin vom Zentrum für klinische Transfusionsmedizin der Universität Tübingen HLA-typisiert. Davon waren 25 Patienten HLA-A*02-positiv. Sie wurden mit den Patienten-Codierungen RTP1 bis RTP25 verschlüsselt. Von den 25 möglichen Patienten willigten schlussendlich 21 zur Studienteilnahme ein.

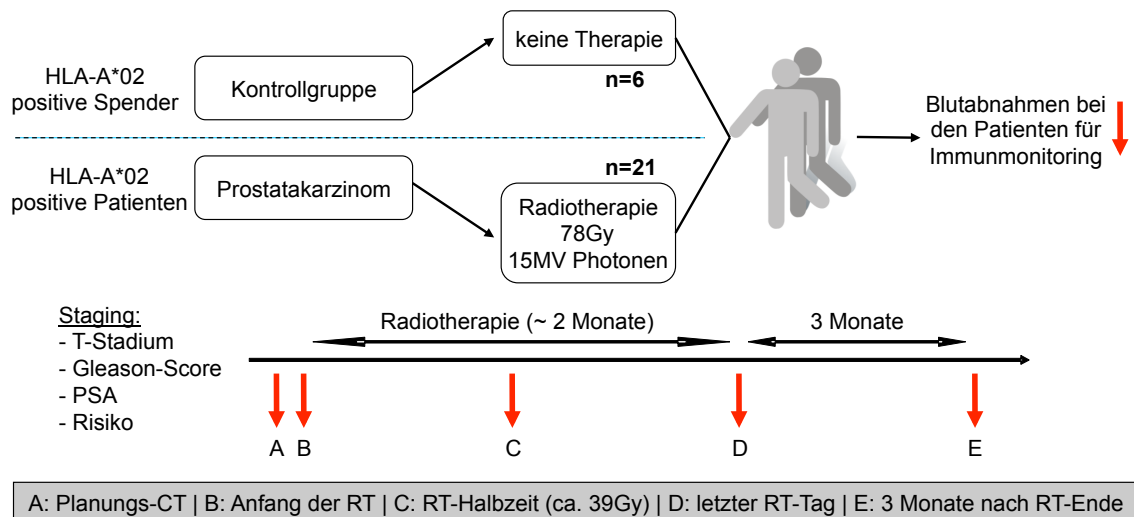


Abbildung 8: Design der durchgeführten Studie mit 21 Patienten und 6 gesunden Spendern (GS). Die RT der Patienten wurde wenn möglich bis 78 Gy durchgeführt, teilweise wurden auch niedrigere Dosen verabreicht (minimal 70 Gy), beispielsweise zur Schonung benachbarter Organe. Die Blutentnahme A wurde nicht bei allen Patienten durchgeführt. Wenn A und B vorhanden waren, wurde für die weitere Analyse der Mittelwert berechnet. Für die Analysen wurde entweder der allein vorhandene Wert von Zeitpunkt B oder der Mittelwert von Zeitpunkt A und B (wenn beide verfügbar) verwendet und wurde generell als Zeitpunkt AB bezeichnet. Von den gesunden Spendern wurde dreimal jeweils im Abstand von einem Monat Blut abgenommen. Grafik in Anlehnung an K. Laske.

Die Patienten wurden vor Beginn der Untersuchungen ausführlich über die Studie, die Risiken durch die Blutentnahme von 50 ml Blut (örtliche Blutergüsse und Entzündungen, Missempfindungen in der Umgebung des Einstichs, Bildung kleiner Narben, Thrombophlebitis, Thrombose, Embolie, vasovagale Reaktion) und den Datenschutz aufgeklärt. Zusätzlich zu den geplanten Blutentnahmen wurde bei manchen Patienten auch das Differenzialblutbild über den Bestrahlungszeitraum hinweg kontrolliert, jedoch nur bei einem gegebenen klinischen Anlass (z.B. Leukopenie).

Das Altersspektrum der Patienten reichte bei Studieneinschluss von 58 bis 82 Jahre mit einem Mittelwert von 74,05 Jahren und einem Median von 75 Jahren. Die Gleason-Scores (histologisches Dignitätskriterium, siehe 1.2.2.) der eingeschlossenen Patienten reichten von sechs bis neun.

Ein Patient hatte einen Tumor mit niedrigem Risiko und elf Patienten einen Tumor mit mittlerem Risiko. Bei den verbleibenden neun Patienten lag ein Hochrisikotumor vor. Die Risikoklassifikationen, Gleason-Scores und weitere

klinische Daten sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Genaue Angaben zu den einzelnen Blutentnahmen finden sich im Anhang.

Tabelle 5: Klinische Patientendaten (P = Prostata, L = Lymphabflusswege im Becken, G = Gynäkomastrieprophylaxe; Mo. = Monate, J. = Jahre). Die HAT (falls durchgeführt) wurde grundsätzlich vor Beginn der RT eingeleitet und meist auch über sie hinaus fortgeführt.

Patienten-ID	Alter bei Studieneinschluss (Jahre)	Hb (g/dl)	T-Stadium	Gleason-Score	PSA bei Diagnosestellung (ng/ml)	Risiko	Bestrahlung	HAT
RTP1	75	15,0	1c	4+3=7	5,4	mittel	P	6 Mo.
RTP2	79	14,7	2c	3+3=6	5,0	mittel	P	9 Mo.
RTP3	74	15,1	3b	4+4=8	8,0	hoch	P + L + G	2-3 J.
RTP5	79	13,3	3a	4+3=7	35,0	hoch	P + L + G	2-3 J.
RTP6	74	14,6	2b	3+3=6	10,7	mittel	P	keine
RTP7	59	15,9	2a	3+4=7	12,1	mittel	P	6 Mo.
RTP8	79	12,0	3a	4+4=8	11,0	hoch	P + L + G	2-3 J.
RTP9	82	13,2	3b	3+3=6	22,0	hoch	P + L + G	dauerhaft
RTP11	71	14,4	1c	3+4=7	7,4	mittel	P	6 Mo.
RTP12	65	12,5	3a	4+4=8	6,6	hoch	P	2-3 J.
RTP13	75	14,7	2c	3+4=7	8,9	mittel	P	6 Mo.
RTP14	67	15,3	1c	3+3=6	7,6	niedrig	P	keine
RTP15	74	14,2	2c	4+4=8	13,3	hoch	P + L	2-3 J.
RTP16	75	16,8	2a	3+4=7	5,4	mittel	P	keine
RTP18	70	14,0	3b	3+4=7	25,2	hoch	P	9 Mo.
RTP19	68	14,9	2a	3+4=7	6,0	mittel	P	keine
RTP20	76	13,0	1c	3+3=6	12,6	mittel	P	~ 1 J.
RTP21	81	13,8	2c	5+4=9	9,3	hoch	P	2-3 J.
RTP23	80	15,6	2a	3+3=6	11,9	mittel	P	4 Mo.
RTP24	82	14,0	3a	4+4=8	5,3	hoch	P	6 Mo.
RTP25	74	15,4	2c	4+3=7	4,8	mittel	P	6 Mo.

2.1.4. Unterschiedliche Therapien

Die Patienten wurden nach den klinikinternen Leitlinien risikoadaptiert behandelt und konnten somit in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Alle Patienten erhielten eine Bestrahlung der Prostata und der Samenblasenbasis in 39 Fraktionen bis 78 Gy (bei einigen Patienten wurde bei zu hoher Strahlenbelastung für Nachbarorgane die RT mit einer geringeren Gesamtdosis durchgeführt, es wurden jedoch immer mindestens 70 Gy verabreicht). Fünf von neun Patienten mit einem Hochrisikotumor erhielten eine zusätzliche Bestrahlung der pelvinen Lymphabflusswege mit 50,4 Gy in 28 Fraktionen.

Allen Patienten mit einem Tumor mit mittlerem und hohem Risiko wurde eine HAT angeboten. Diese wurde grundsätzlich vor Beginn der Bestrahlung begonnen und bei fast allen Patienten bis nach Bestrahlungsende fortgeführt. Bei Tumoren mit mittlerem Risiko wurde die HAT für sechs Monate bei neun von elf Patienten, bei hohem Risiko für zwei bis drei Jahre bei allen neun Patienten durchgeführt.

Zeigten sich klassische Nebenwirkungen einer RT am Enddarm (z.B. Proktitis) wurden bei einem Teil unter anderem Steroid-haltige Lokaltherapeutika eingesetzt.

2.1.5. Gesunde Probanden

Insgesamt sechs HLA-A*02-positive gesunde Spender mit vergleichbarer Altersstruktur zu den 21 eingeschlossenen Patienten (Altersspektrum von 49 bis 63 Jahre, Mittelwert: 55,83 Jahre, Median: 52,5 Jahre) wurden im Oktober und November 2012 in die Studie mit eingeschlossen. Vor den Blutabnahmen (ebenfalls 50ml pro Blutentnahme) wurden auch die gesunden Spender über die Studie und die Risiken der Blutabnahmen aufgeklärt. Auch die gesunden Spender erhielten Codenummern (RTP101 und RTP103 bis RTP107). Die Blutabnahmezeitpunkte der gesunden Spender wurden mit B, C und D bezeichnet und lagen 23 bis 50 Tage auseinander. Weitere Informationen zu den Blutabnahmen bei den gesunden Probanden finden sich im Anhang. Aus den analysierten Werten (Prozent der untersuchten Immunzell-Subpopulationen) der gesunden Spender wurde ein Mittelwert gebildet, mit dem die Patientenwerte verglichen wurden:

$$\bar{M} = \frac{\overline{RTP101_{B-D}} + \overline{RTP103_{B-D}} + \overline{RTP104_{B-D}} + \overline{RTP105_{B-D}} + \overline{RTP106_{B-D}} + \overline{RTP107_{B-D}}}{6}$$

2.2. Geräte

Autoklav	11-6-9 HS1-FD, Sauter, Mühldorf am Inn, Deutschland
Blutentnahmekanüle	Safety-Multifly-Kanüle 0,8mm, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Blutröhrchen	S-Monovette Lithium-Heparin 20, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland

Cryobox	5100-0001 Cryo 1°C Freezing Container, Thermo Scientific Nalgene, Waltham, Massachusetts, USA
Durchflusszytometer	BD LSR Fortessa, BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA, Software: BD FACS Diva
Eismaschine	AF30, Scotsman, Mailand, Italien
FACS-Software	FlowJo for Mac V9.2, BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA
Gefrierschrank (-20°C)	GS-Serie, Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank (-80°C)	Skadi Green Line DF8520GL, Ede, Niederlande
Inkubator	Heraeus Function Line B12/UB12, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Kühlschrank 1 (4°C)	öko-super glass-line, Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlschrank 2 (4°C)	profi-line, Liebherr, Bulle, Schweiz
Lichtmikroskop	Leica DM IL, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Neubauer improved 552/712, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim/Rhön, Deutschland
Pipettenpumpe	Pipetboy acu, Integra Biosciences GmbH, Ruhberg, Deutschland
zugehörige Pipetten:	BD Falcon 2/5/10/25/50ml, BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA
Pipetten 1	Pipetman classic 2-20/50-200/200-1000µl, Gilson, Middleton, Wisconsin, USA
Pipetten 2	Discovery Comfort 0,5-2/2-10/20-200µl, Kinesis-Abimed, Langenfeld, Deutschland
Mehrkanalpipette	Discovery Comfort 20-200µy, Kinesis-Abimed, Langenfeld, Deutschland
Sterilbank	Technoflow 3F120-IIGS, Integra Biosciences GmbH, Ruhberg, Deutschland
Stickstofftank	K-Series 24K, Taylor-Wharton, Theodore, Alabama, USA

Tischzentrifuge 1	Biofuge fresco, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Tischzentrifuge 2	Biofuge pico, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Vortexer	Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Uetze-Hänigsen, Deutschland
Zentrifuge 1	Megafuge 2.0 R, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge 2	Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge 3	Labofuge 400, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland

2.3. Materialien

2.3.1. Verwendete Einzelsubstanzen

AbC Anti-Mouse Bead Kit	LifeTechnologies, Carlsbad, Kalifornien, USA, #A10344
Annexin V Binding Buffer	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA, #422201
Antikörper	siehe 2.6.3.
ArC Amine Reactive Compensation Bead Kit	LifeTechnologies, Carlsbad, Kalifornien, USA, #A10346
β-ME	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz, 1mM in PBS, 2000X, steril filtriert mit 0,2µl-Filter
BSA	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, #A4628
Brefeldin A	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, #B7651, 1mg/ml in PBS

D-Biotin	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, #B4501 (100mM in 200mM Tris)
DMSO	Merck, Darmstadt, #1.02952.1000
DNase I	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, #DN25 (1mg/ml)
EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
FCS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich, #A15-101, hitzeinaktiviert
Fixation/Permeabilization-Diluent	eBioscience, San Diego, Kalifornien, USA, #00-5223-56
Fixation/Permeabilization-Concentrate	eBioscience, San Diego, Kalifornien, USA, #00-5123-43
Glycerol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Golgi-STOP (Monensin)	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA, #554724
HS	c.c.pro GmbH, Oberdorla, Deutschland, #S41M, hitzeinaktiviert
IMDM	BioWhittaker, Verviers, Belgien, #BE12- 722F
LSM	Biocoll Separating Solution, Biochrom AG, Berlin, Deutschland, #L6115
NaAzid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PBS	hergestellt in der Abteilung für Immunologie der Universität Tübingen (Claudia Falkenburger)
PenStrep	BioWhittaker, Verviers, Belgien, #DE17- 602E)
Permeabilization buffer (10X)	eBioscience, San Diego, Kalifornien, USA, #00-8333-56

Propidiumiodid (PI)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, #P4170
Proteaseinhibitor	Complete inhibitor tablet, Roche, Mannheim, Deutschland, #11697498001 (gelöst in 2ml Tris 20mM)
Qdot 585 Streptavidin-Conjugate	LifeTechnologies, Carlsbad, Kalifornien, USA, #Q10113MP
Qdot 605 Streptavidin-Conjugate	LifeTechnologies, Carlsbad, Kalifornien, USA, #Q10103MP
Qdot 655 Streptavidin-Conjugate	LifeTechnologies, Carlsbad, Kalifornien, USA, #Q10123MP
Qdot 705 Streptavidin-Conjugate	LifeTechnologies, Carlsbad, Kalifornien, USA, #Q10163MP
Saponin	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, #P8139
Staphylococcus Enterotoxin B (SEB)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, #S4881
Tris	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, #252859
Trypanblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, #1.11732

2.3.2. Hergestellte Gemische

Einfrierlösung: 90 % sterilfiltriertes, hitzeinaktiviertes FCS, 10 % DMSO

Kulturmedium: 500 ml IMDM, 50 ml hitzeinaktiviertes HS, 5 ml PenStrep, 250 µl β-ME 2000X

Auftaedium: 500 ml IMDM, 12,5 ml hitzeinaktiviertes HS, 5 ml PenStrep, 250 µl β-ME 2000X

Waschmedium: 500 ml IMDM, 1 ml PenStrep, 250 µl β-ME 2000X

FACS-Waschpuffer: 500 ml PBS, 500 µl NaAzid 10 %, 2 ml EDTA 0,5 M, 10 ml FCS

Multimerlösung: 20 ml PBS, 40 µl NaAzid 10 %, 160 µl EDTA 0,5 M, 20 ml FCS

Permwash-Puffer: 500 ml PBS, 1 ml NaAzid 10 %, 2,5 g BSA, 0,5 g Saponin
Fixation-/Permeabilization-Puffer: 9 Teile Fixation/Permeabilization-Diluent, 1
Teil Fixation/Permeabilization-Concentrate
Permeabilization-Puffer: 45 ml ddH₂O, 5 ml Permeabilization buffer 10X

2.4. Bestimmung des Leuko- und Lymphozytenverlaufs

Bei gegebenem klinischem Anlass wurde das Zentrallabor des Universitätsklinikums Tübingen von den betreuenden Ärzten aus der Klinik für Radioonkologie damit beauftragt, Differenzialblutbilder für die Patienten zu erstellen. Diese wurden aus EDTA-Blut, das von den Patienten steril gewonnen wurde, maschinell angefertigt.

2.5. Aufbereitung der PBMC

2.5.1. Prinzip und Durchführung der PBMC-Isolierung

Die Isolierung der PBMC erfolgte größtenteils durch die Mitarbeiter der Abteilung für Radioonkologie des Universitätsklinikums Tübingen. Die PBMC wurden mit einer Dichtegradient-Zentrifugation über einem Lymphozyten-abtrennenden Medium (LSM) mit einer Dichte von 1,077 g/ml aus 50 ml frisch abgenommenem, heparinisierendem Blut (es wurden Blutröhrchen verwendet, in denen bereits Heparin vorlag, siehe 2.2.) der Patienten oder gesunden Spender nach dem im Labor üblichen Protokoll durchgeführt (s.u.). Durch die Dichtegradient-Zentrifugation setzen sich die Erythrozyten als Bodensatz ab, in der darüber liegenden Schicht findet sich das LSM. Darüber wiederum bildet sich eine dünne Schicht aus mononukleären Zellen (die PBMC), bestehend aus Lymphozyten und Monozyten, die mit der Pipette abgesaugt werden kann. Die oberste Phase bildet das Blutplasma.

Vor Beginn der PBMC-Isolation wurden die LSM-Lösung und das PBS bei 37°C im Wasserbad vorgewärmt, die benötigte Einfrierlösung aus 90 % sterilfiltriertem FCS und 10 % DMSO bei 4°C bereitgestellt und alle benötigten Materialien bereitgelegt. Alle Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Zunächst wurde das Blut auf 50ml-Falconröhrchen verteilt und jeweils 1:1 mit vorgewärmtem PBS verdünnt, sodass sich eine Gesamtmenge von 35 - 40 ml

pro Falcon ergab. Nun wurden das Blut-PBS-Gemisch mit je 10 ml LSM vorsichtig unterschichtet. Im Anschluss erfolgte die Dichtegradient-Zentrifugation über 20 min bei Raumtemperatur mit 2000 Umdrehungen pro Minute (rpm) ohne Bremse. Die Interphase aus den PBMC wurde vorsichtig mit der Pipette abgezogen und in neue 50ml-Falconröhrchen übertragen (maximal 15 ml pro Falcon). Die neuen Röhrchen wurden mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und durch Invertieren gemischt. Anschließend wurde für 6 min bei Raumtemperatur mit 1400 rpm zentrifugiert, wobei die Bremse wieder eingeschaltet wurde. Der Überstand wurde abgekippt, die Pellets durch Klopfen gegen das Falcon resuspendiert und wieder auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und gemischt. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation (8 min, Raumtemperatur, 1300 rpm). Der Überstand wurde wieder abgeschüttet, die Pellets manuell resuspendiert, in einem Falcon gesammelt und auf 50 ml mit PBS aufgefüllt. Die Zellen wurden mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Im Anschluss erfolgte das Einfrieren der Zellen (siehe 2.5.2.).

2.5.2. Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zunächst wurde die richtige Anzahl an Cryovials für das Einfrieren vorbereitet (Planung: 6×10^6 Zellen pro Cryovial) und beschriftet (Patienten-Codenummer RTP1-25 bzw. RTP101-107 für die GS / Blutentnahmezeitpunkt A-E / Datum). Die Cryovials wurden in einer Cryobox im Kühlschrank bei 4°C vorgekühlt. Die in 2.5.1. gewonnene PBMC-Suspension wurde erneut für 8 min bei 4°C mit 1300 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde unter der Sterilbank auf Eis gearbeitet: Der Überstand wurde abgekippt, das Zellpellet manuell resuspendiert und die entsprechende Menge Einfrierlösung zugegeben (1 ml pro Cryovial). Mit der Pipette wurde die entstehende Suspension gemischt und zügig in die vorbereiteten Cryovials transferiert. Diese wurden sofort in der Cryobox im -80°C-Gefrierschrank eingefroren und am Folgetag in den Stickstofftank (-196°C) verbracht.

Für das Auftauen wurden die Cryovials zunächst aus dem Stickstofftank in den -80°C-Gefrierschrank verbracht und das Auftau-, Kultur-, und Waschmedium bei 37°C warmgestellt. Vom Gefrierschrank aus wurden maximal zwei

Röhrchen gleichzeitig im Wasserbad (37°C) aufgetaut und der Inhalt sofort in 6ml Auftaumedium in einem 15 ml-Falcon überführt, in den zuvor bereits DNase I in einer Endkonzentration von 3µg/ml zugegeben wurde. Die toxische Wirkung des DMSO auf die PBMC erforderte hier ein zügiges Arbeiten. Nachdem alle benötigten Zellen aufgetaut waren, wurden die Röhrchen für 6min bei Raumtemperatur mit 1300 rpm zentrifugiert, der Überstand abgekippt, die Pellets manuell resuspendiert und in jedes Falcon 6 ml Waschmedium zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit Trypanblau gezählt. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation (6 min, Raumtemperatur, 1300 rpm), der Überstand wurde wieder abgekippt und die Pellets manuell resuspendiert. Für die Färbungen 1 - 3 (siehe 2.6.5.) wurden mit Waschmedium Zellsuspensionen mit einer Konzentration von 20×10^6 Zellen/ml eingestellt und sofort die Färbungen durchgeführt. Für das ICS wurde mit Kulturmedium eine Suspension mit 10×10^6 Zellen/ml eingestellt, auf die Färbepalette verteilt und diese über Nacht in den Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ verbracht. Die Stimulation und Färbung erfolgte am nächsten Tag (siehe 2.6.6.).

2.6. Vorbereitung der Durchflusszytometrie

2.6.1. Prinzip

Die Geschichte der Durchflusszytometrie geht auf Wallace Coulter im Jahr 1947 zurück. Damals wurde das erste Gerät zur Größenbestimmung von Zellen in Suspension durch elektronische Messungen vorgestellt. Im Dezember 1968 wurde das erste Durchflusszytometer von Wolfgang Göhde an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster zum Patent angemeldet [158]. Die erste Maschine zur Zellsortierung und Durchflusszytometrie wurde 1972 von Leonard A. Herzenberg an der Stanford-University präsentiert [159]. In den folgenden Jahren wurde die Technik fortlaufend weiterentwickelt. Die ersten Geräte der Firma BD kamen 1974 auf den Markt.

Im Durchflusszytometer werden die zu detektierenden Zellen zunächst in einen feinen Flüssigkeitsstrahl gebracht, sodass eine Zelle nach der anderen den Detektionsapparat passiert. Durch Laserlicht unterschiedlicher Wellenlängen werden Fluorochrome, die zuvor auf die Zellen aufgebracht wurden und zum

Beispiel an Antikörper gebundenen sind, angeregt. Das von ihnen wiederum emittierte Lichtsignal wird durch die Messeinheit des Durchflusszytometers detektiert. Die Abgrenzung verschiedener Fluorochrome erfolgt durch die eingesetzten optischen Filter (Longpass- und Bandpass-Filter). Longpass-Filter lassen nur Licht mit einer Wellenlänge größer der auf dem Filter angegebenen Wellenlänge durch und reflektieren das übrige Spektrum (z.B. $> 670 \text{ nm}$ entspricht 670LP). Von Bandpass-Filtern wird Licht eines bestimmten Wellenlängenbereiches durchgelassen (z.B. $710 \pm 25 \text{ nm}$, entspricht 710/50). Abbildung 9 zeigt schematisch den Aufbau eines Durchflusszytometers mit zwei verschiedenen Lasern.

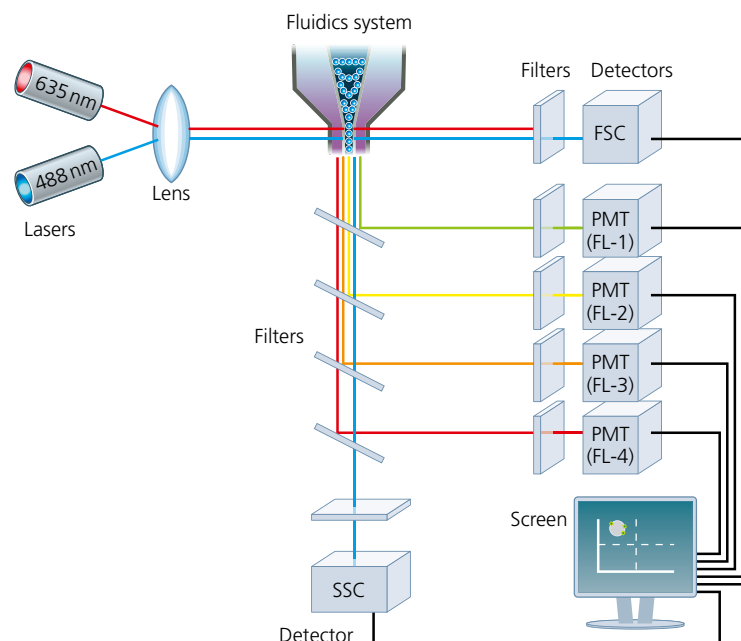


Abbildung 9: Schema der Durchflusszytometrie (Originaltitel: Schematic overview of a typical flow cytometer setup), Quelle: Introduction to Flow Cytometry von Misha Rahman Ph.D. für AbD Serotec, static.abdserotec.com/Lit-pdfs/Brochures1/flowcytometry.pdf, dort am 10.06.2014 heruntergeladen

Jedes Durchflusszytometer bestimmt zunächst die Größe und Granularität der Zellen. Je weiter ein eingebrachter Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm von der zu detektierenden Zelle auseinandergestreut wird, desto größer ist die Zelle (FSC-Wert = forward angle light scatter). Je größer die Streuung des Strahls zur Seite ist, desto mehr Granula befinden sich im Zytoplasma der Zelle und umso mehr Oberflächenunregelmäßigkeiten liegen vor (SSC-Wert = side

angle light scatter) [160]. Dies lässt eine Einteilung in die verschiedenen Zellarten zu. Lymphozyten und Monozyten können bei der Untersuchung von PBMC differenziert werden (vergleiche Abbildung 10).

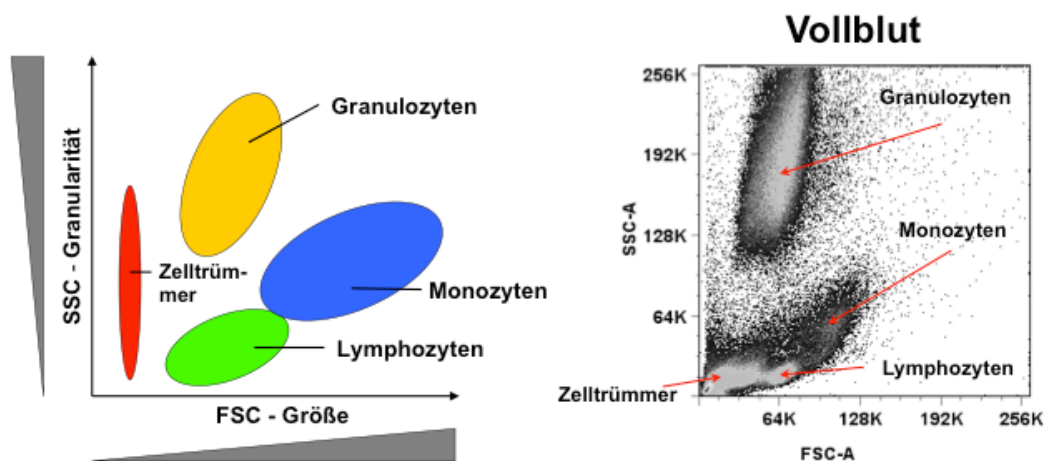


Abbildung 10: Differenzierung von Vollblut durch den Plot SSC vs. FSC in Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und Zelltrümmer. Die Granulozytenpopulation entfällt bei der Verwendung von PBMC. Modifiziert von S. Attig, 2007

Um genauere Informationen über die Zelleigenschaften zu bekommen wurden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern, an die Fluoreszenzfarbstoffe gebunden sind, und mit an Fluorochrome gekoppelten HLA-Peptid-Multimeren gefärbt. Diese binden an spezifische Strukturen der Zelloberflächen oder nach Zellpermeabilisierung an Strukturen innerhalb der Zellen und lassen so eine Charakterisierung zu. Die spezifischen HLA-Multimere binden an den entsprechenden TCR, welcher genau das Peptid erkennt, mit dem das HLA-Multimer beladen ist [161, 162]. Das Auswertungsprinzip basiert auf einer Subgruppenanalyse: Zunächst werden Hauptpopulationen wie beispielsweise CD4- oder CD8-positive Zellen differenziert und in dieser Gruppe dann weitere Eigenschaften wie Proliferation oder Apoptose untersucht.

In den durchgeführten Experimenten wurden bis zu elf Parameter gleichzeitig bestimmt. Dies erforderte einen Korrekturschritt um die spektrale Überlappung der verschiedenen Fluorochrome herauszurechnen, die so genannte Kompensation. Für jedes Fluorochrom wurde eine Kompensationsprobe hergestellt und diese vor der eigentlichen Messung aufgenommen. Die

Berechnung der Kompensationsmatrix erfolgte mit der Durchflusszytometrie-Software (siehe auch 2.6.7.).

2.6.2. HLA-Peptid-Multimere

Für die Herstellung der Multimere wurden die im eigenen Hause produzierten und bei -80°C gelagerten, biotinylierten HLA-Monomere (EBV-BMLF1 259-267 GLCTLVAML (Synthese-Nr. 91123p1-12*), EBV-LMP2 426-434 CLGGLLTMV (Synthese-Nr. 101159), CMV-pp65 495-503 NLVPMVATV (Synthese-Nr. 101015) und Influenza-Matrix 58-66 GILGFVFTL (Synthese-Nr. 91092)) zunächst aufgetaut, die benötigte Menge entnommen und in ein dunkles Reagenzgefäß (Lichtschutz) überführt. Das Reaktionsgefäß wurde im Kühlraum (4°C) auf ein Drehrad gegeben und alle 30 min wurden 10 % der insgesamt erforderlichen Streptavidin-Qdot-Reagenz zugegeben (33,25 μl einer 1 μM Lösung für 50 μg / 25 μl Monomer). Zum Schluss wurden 2,91 μl 1 mM D-Biotin zugegeben um übrig gebliebene, freie Bindungsstellen abzudecken (lichtgeschützte Inkubation für 20 min bei 4°C).

Im Anschluss an die Herstellung wurden die HLA-Peptid-Multimere mit 30,58 μl einer Mischung bestehend aus 20 mM Tris, 1,5 % humanem Serumalbumin, 0,06 % NaAzid, 48 % Glycerol und einem Protease-Inhibitor (3X) gemischt, aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Dieses Herstellungsprotokoll war im Labor bereits etabliert.

2.6.3. Übersicht über die vier Färbungen und die verwendeten Antikörper

1) Lymphozyten- gruppen und Proliferation	2) Apoptose und Nekrose der T- Zellen	3) Differenzierung der T-Zellen	4) Zytokin- produktion der T-Zellen
Live/Dead-Aqua	AnnexinV-FITC	Live/Dead-Aqua	Live/Dead-Aqua
CD3-PaBlue	Propidiumiodid	CD4-APC-Cy7	CD4-APC-Cy7
CD19-BrilliantViolet650	CD4-APC-Cy7	CD8-PE-Cy7	CD8-Qdot605
CD4-APC-Cy7	CD8-PE-Cy7	CD45RA-PaBlue	IL-2-PE-Cy7
CD8-Qdot605	CMV-pp65-Qdot705	CD28-APC	IL-5-APC
CD25-APC	EBV-BMLF1-Qdot585	CCR7-PE	IL-10-PE
CD56-PE-Cy7	EBV-LMP2-Qdot655	CMV-pp65-Qdot705	IL-17-FITC
Foxp3-PE	Inf-Mat-Qdot605	EBV-BMLF1-Qdot685	IFN γ -AlexaFluor700
Ki67-AlexaFluor700	-	EBV-LMP2-Qdot655	TNF α -BrilliantViolet650
-	-	Inf-Mat-Qdot-605	CD107a-PaBlue
-	-	Ki67-AlexaFluor700	-

Abbildung 11: Übersicht über die vier verwendeten Färbepanels mit den entsprechenden Antikörpern (mit angekoppelten Fluorochromen) bzw. Färbesubstanzen. Quelle: Schädle et al., Kurzvortrag „Zellulärer Immunstatus unter primärer Radiotherapie bei lokalisiertem Prostatakarzinom“, DEGRO-Kongress 2014, Düsseldorf.

In der folgenden Tabelle 6 sind für die verschiedenen Färbesubstanzen die Verdünnungen bzw. die verwendeten Konzentration angegeben, in denen sie für die durchgeführten Färbungen (siehe 2.6.5. und 2.6.6.) verwendet wurden.

Tabelle 6: Konzentrationen bzw. Verdünnungen der benutzten Färbesubstanzen und Antikörper in alphabetischer Reihenfolge. Die Spalte „Färbepanel“ gibt an, für welche Färbungen die Substanzen verwendet wurden (siehe auch Abbildung 11). Für die Live/Dead-Aqua-Reagenz wurden je nach Alter der hergestellten Lösung unterschiedliche Mengen verwendet: war die Lösung weniger als eine Woche alt, wurden 0,5 μ l/Test verwendet, bei einem Alter der Lösung zwischen einer und zwei Wochen wurde 1 μ l/Test verwendet (laborinterner Standard). Ältere Lösungen wurden verworfen.

Färbesubstanz	Konzentration / Verdünnung	extra- oder intrazellulär	Färbe- panel	Herstellerinformationen
Annexin V-FITC	0,5 μ l/Test	extra	2	BioLegend, #640906
CCR7-PE	1:1,67	extra	3	BD Biosciences, Klon 150503, #560765
CD107a-Pacific Blue	2 μ l/Test	extra	4	BioLegend, Klon H4A3, #328623
CD3-Pacific Blue	1:100	extra	1	BioLegend, Klon UCHT- 1, #300417
CD4-APC-Cy7	1:200	extra	1-4	BD Biosciences, Klon RPA-T4, #557871
CD8-PE-Cy7	1:500	extra	2,3	BeckmanCoulter, Klon SFCI21Thy2D3, #737661

Färbesubstanz	Konzentration / Verdünnung	extra- oder intrazellulär	Färbe-panel	Herstellerinformationen
CD8-Qdot605	1:100	extra	1,4	LifeTechnologies, Klon 3B5, #Q10481
CD19-BrilliantViolet650	1:50	extra	1	BioLegend, Klon HIB19, #302237
CD25-APC	1:2	extra	1	BD Biosciences, Klon M-A251, #555434
CD28-APC	1:10	extra	3	eBioscience, Klon CD28.2, #17-0289-73
CD45RA-Pacific Blue	1:16,67	extra	3	LifeTechnologies, Klon MEM-56, #MHCD45RA28
CD56-PE-Cy7	1:10	extra	1	BD Biosciences, Klon B159, #557747
CMV-pp65-Qdot705	5 µg/ml	extra	2,3	eigene Herstellung
EBV-BMLF1-Qdot585	10 µg/ml	extra	2,3	eigene Herstellung
EBV-LMP2-Qdot655	5 µg/ml	extra	2,3	eigene Herstellung
Foxp3-PE	1:20	intra	1	BioLegend, Klon 206D, #320108
IFN-γ-Alexa Fluor 700	1:200	intra	4	BD Biosciences, Klon B27, #557995
IL-2-PE-Cy7	1:10	intra	4	BioLegend, Klon MQ1-17H12, #500326
IL-5-APC	1:40	intra	4	BD Biosciences, Klon TRFK5, #554396
IL-10-PE	1:120	intra	4	BD Biosciences, Klon JES3-19F1, #554706
IL-17-FITC	1:200	intra	4	eBioscience, Klon eBio64DEC17, #11-7179-73
Inf-Mat-Qdot605	5 µg/ml	extra	2,3	eigene Herstellung
Ki67-Alexa Fluor 700	1:100	intra	1,3	BD Biosciences, Klon B56, #561277
Live/Dead-Aqua	0,5 - 1 µl/Test	extra	1,2,4	LifeTechnologies, #L34957
Propidiumiodid	5 µl/Test (Ausgangskonz. 5 µg/ml, mit PBS verdünnt)	intra	2	Sigma Aldrich, #P4170
TNF-α-Brilliant Violet 650	1:10	intra	4	BioLegend, Klon MAb11, #502937

Für drei der verwendeten Antikörper wurden Isotyp-Kontrollen verwendet (siehe auch 4.2.3.), da die Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen

schwierig war (siehe 2.8.). Die Ansätze mit den Isotyp-Kontrollen enthielten ebenfalls alle anderen Antikörper und wurden somit (bis auf die durch die Isotyp-Kontrollen ersetzten Antikörper) genau gleich behandelt wie alle anderen Ansätze.

Tabelle 7: Übersicht über die Verdünnung der benutzten Isotyp-Kontrollen in alphabetischer Reihenfolge. Die Spalte „Färbepanel“ gibt an, für welche Färbungen die Isotyp-Kontrollen verwendet wurden.

Färbesubstanz	Verdünnung	extra- oder intrazellulär	Färbepanel	Herstellerinformationen
Isotyp-Kontrolle für CCR7-PE	1:20	extra	3	BD Biosciences, Klon G155-178, #553457
Isotyp-Kontrolle für CD25-APC	1:2	extra	1	BD Biosciences, Klon MOPC-21, #555751
Isotyp-Kontrolle für Ki67-Alexa Fluor 700	1:200	intra	1,3	BD Biosciences, Klon MOPC-21, #557882

2.6.4. Etablierung der Färbeprotokolle

Die Protokolle für die durchgeführten Färbungen (siehe 2.6.5. und 2.6.6.) waren zu einem großen Teil bereits in der Arbeitsgruppe oder in anderen Gruppen des Instituts für Immunologie an der Universität Tübingen etabliert. Die Färbeprotokolle für die Tests 1, 3 und das ICS wurden lediglich in den Vortests leicht modifiziert, um Arbeitsabläufe zu optimieren und bessere Resultate zu erlangen. Für das Färbeprotokoll 2 musste die Apoptose-Färbung mit Annexin V und PI zunächst etabliert werden, was vor der Durchführung der eigentlichen Experimente in mehreren Versuchen erfolgte.

Für alle bisher nicht im Labor verwendeten Antikörper wurden zunächst Titrationsreihen durchgeführt, in denen die optimalen Mengen der benutzten Antikörper für einen Versuch definiert wurden.

2.6.5. Färbungen 1 - 3: Phänotypisierung, Proliferation, Apoptose und Nekrose, Differenzierung und Virus-spezifische T_K-Zellen

Die Färbungen 1 - 3 wurden parallel durchgeführt, da dies für die Gesamtarbeit eine wesentliche Zeitersparnis darstellte und logistisch gut möglich war. Mit Färbung 1 konnten die Lymphozyten in ihre Untergruppen aufgeteilt und deren

Proliferation untersucht werden. In Färbung 2 wurden Virus-spezifische Zellen nachgewiesen, sowie alle enthaltenen Zellen auf Apoptose und Nekrose untersucht. Färbung 3 diente zur Untersuchung der Differenzierungsstadien der Lymphozyten und detektierte darüber hinaus die Proliferation der Virus-spezifischen Zellen.

Die PBMC wurden, wie unter 2.5.2. beschrieben, unter sterilen Bedingungen aufgetaut und je 100µl einer Suspension mit 20×10^6 Zellen/ml in die Wells einer 96-Well-Platte gegeben (runder Boden). Von jedem Patienten und jedem Zeitpunkt wurden wenn möglich drei Wells gefüllt (für die Färbungen 1 - 3). Sollte dies aufgrund einer zu geringen Anzahl an Zellen nicht möglich gewesen sein, wurde zunächst das Färbeprotokoll 2 (Apoptose und Nekrose) gestrichen, bei noch weniger Zellen auch das Färbeprotokoll 3 (Differenzierung).

In die Ansätze für die Färbungen 2 und 3 wurde jeweils 100 µl FACS-Waschpuffer zugegeben, zu den Tests für Protokoll 1 100 µl Waschmedium. Danach wurde die Platte für 5 min bei 4°C und 1500 rpm zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde die Färbung mit den HLA-Peptid-Multimeren vorbereitet: In Multimerlösung (siehe 2.3.2.) wurde ein Mastermix mit einer finalen Konzentration von 10 µg/ml EBV-BMLF1-Qdot585, 5 µg/ml-Influenza-Matrix-Qdot605, 5 µg/ml EBV-LMP2-Qdot655 und 5 µg/ml CMV-pp65-Qdot705 hergestellt (siehe auch 2.6.3.). Dieser wurde zur Elimination von Aggregaten 5 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand ohne das Pellet in ein neues Gefäß transferiert.

Bei der 96-Well-Platte wurde der Überstand mit einer Pipette abgenommen und die Zell-Pellets für Protokoll 1 mit je 50 µl Waschmedium resuspendiert. Die Pellets für die Färbungen 2 und 3 wurden mit je 50 µl Multimer-Mastermix resuspendiert und die Platte anschließend für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde zu allen Wells 150 µl FACS-Waschpuffer zugegeben, es folgte eine erneute Zentrifugation (5 min, 4°C, 1500 rpm). Währenddessen wurden die Mastermixe für die extrazelluläre Färbung in FACS-Waschpuffer hergestellt (siehe Abbildung 11 und Tabelle 6). Der CD8-Qdot605 wurde vorverdünnt und wie die HLA-Peptid-Multimere zunächst zentrifugiert um Aggregate zu eliminieren. Vom Live/Dead-Aqua-

Reagenz wurden 0,5 µl/Test wenn die Herstellung weniger als eine Woche zurück lag oder 1 µl/Test wenn die Lösung älter war (maximal zwei Wochen) verwendet (siehe Tabelle 6). Für CCR7-PE und CD25-APC wurde eine Isotyp-Kontrolle benutzt und analog zu den anderen Ansätzen angefertigt (siehe Tabelle 7).

Nachdem die Überstände der Zentrifugation wieder mit der Pipette abgezogen wurden, wurden die Ansätze in je 50 µl Antikörper-Mastermix resuspendiert und für 20 min bei 4°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein erneuter Wasch-Schritt mit 150 µl FACS-Waschpuffer pro Well und einer Zentrifugation (5 min, 4°C, 1500 rpm). Solange wurde der Fixation-/Permeabilization-Puffer wie unter 2.3.2. beschrieben hergestellt. Außerdem wurde die Färbelösung mit Annexin V-FITC (BioLegend, #640906) 0,5 µl/Test in je 100 µl Annexin V Binding Buffer hergestellt. Die Zellpellets wurden nach Abnahme des Überstandes für Färbung 1 und 3 mit je 100 µl Fixation-/ Permeabilization-Puffer resuspendiert und 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Für Färbung 2 wurden die Pellets in je 100 µl Annexin V-Färbelösung resuspendiert und für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Testansätze für Färbung 2 in FACS-Röhrchen übertragen und es wurde jeweils 400 µl Annexin V Binding Buffer zugegeben. Bis zur Messung am Durchflusszytometer wurden die Röhrchen lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

Zu den Wells der Färbungen 1 und 3 wurde nach der Inkubation je 100 µl Permeabilization-Puffer zugegeben um die Zellen zu waschen. Anschließend wurde für 5 min mit 1700 rpm bei 4°C zentrifugiert und nach dem abpipettieren des Überstandes der Waschschrift mit 200 µl Permeabilization-Puffer wiederholt (Zentrifugation 5 min, 4°C, 1700 rpm). Dann wurden die Pellets erneut in je 100 µl Permeabilization-Puffer resuspendiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation (5 min, 4°C, 1700 rpm). Währenddessen konnten die Mastermixe für die intrazelluläre Färbung in Permeabilization-Puffer hergestellt werden (siehe Abbildung 11 und Tabelle 6). Für Ki67-AlexaFluor700 wurde auch eine Isotyp-Kontrolle benutzt und entsprechend angefertigt (siehe Tabelle 7).

Der Überstand nach der Zentrifugation wurde mit der Pipette abgenommen, danach wurden die Pellets in je 100 µl Mastermix („intrazelluläre“ Antikörper) resuspendiert und 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde erneut mit 100 µl Permeabilization-Puffer gewaschen und zentrifugiert (5 min, 4°C, 1700 rpm), der Überstand abgenommen und die Pellets in je 200 µl Permeabilization-Puffer resuspendiert und zentrifugiert (5 min, 4°C, 1700 rpm). Danach wurde erneut der Überstand abgezogen, die nun fertig gefärbten Zellen in 200 µl FACS-Waschpuffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Auch diese Röhrchen wurden für die Dauer der Geräteeinstellung am Durchflusszytometer bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. Alle gefärbten Tests wurden immer am selben Tag am Durchflusszytometer gemessen. Zuerst wurden die Tests der zweiten Färbung gemessen. 15 sek vor der Messung wurden jedem Röhrchen 5 µl PI-Lösung mit einer Konzentration von 5 µg/ml (Verdünnung mit PBS) zugegeben. Zu den Röhrchen der Färbungen 1 und 3 wurden jeweils noch 100 µl FACS-Waschpuffer zugegeben.

2.6.6. Stimulations- und intrazelluläres Färbeprotokoll (Färbung 4)

Die Zellen wurden wie in 2.5.2. beschrieben unter sterilen Bedingungen abends aufgetaut und von der hergestellten Suspension mit 10×10^6 Zellen/ml (in Kulturmedium) wurden 200 µl in die Wells einer 96-Well-Kulturplatte (runder Boden) gegeben. Die Anzahl an Wells pro Patient und Zeitpunkt hing von der Anzahl vorhandener Zellen und der Virusspezifität aus der bereits ausgewerteten Färbung 2 ab.

Grundsätzlich wurde eine Positivkontrolle (Stimulation mit SEB) und eine Negativkontrolle (Stimulation mit der HIV-Peptidsequenz HIV-RT 476-484, ILKEPVHGV) durchgeführt. Je nach den Ergebnissen aus den Färbeprotokollen 2 und 3 wurden zusätzliche Ansätze angelegt, die mit Sequenzen der Peptide CMV-pp65 (495-503 NLVPMVATV), EBV-BMLF1 (259-267 GLCTLVAML), EBV-LMP2 (426-434 CLGGLLTMV) oder Influenza-Matrix (58-66 GILGFVFTL) stimuliert wurden. Die Peptide wurden von der Gruppe von Prof. Dr. S. Stevanović im Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie der Universität Tübingen hergestellt.

Über Nacht verblieben die Zellen im Inkubator. Am nächsten Morgen hatten sich die Zellen am Boden abgelagert und es konnten je 150 µl vom Überstand abgenommen werden. 50 µl frisches Kulturmedium wurde zugegeben. In die jeweiligen Wells wurden nun die Stimulationslösungen gegeben (jeweils in 50 µl Kulturmedium mit einer Finalkonzentration für alle Stimulantien von 10 µg/ml bei einem finalen Volumen von 200 µl). Anschließend wurde in je 25 µl Kulturmedium der Antikörper CD107a-PacificBlue (BioLegend, Klon H4A3, #328623) mit 2 µl/Test zugegeben, die Ansätze mit der Pipette gemischt, die Platte für 3 min mit 1300 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert und dann für eine Stunde in den Inkubator verbracht. Währenddessen konnte die Lösung zur Blockade der Exozytose hergestellt werden. Diese enthielt pro Test 25 µl Kulturmedium, in das Brefeldin A für eine Finalkonzentration von 10 µg/ml und Golgi-STOP für eine finale Verdünnung von 1:1500 hinzugegeben wurde (Finalvolumen: 200 µl). Nach einer Stunde wurden in jedes Well 25 µl der hergestellten Blockierungslösung zugegeben und erneut mit der Pipette gemischt. Das Volumen betrug jetzt in allen Wells 200 µl. Die Zentrifugation wurde wie zuvor durchgeführt und die Platte für weitere vier Stunden im Inkubator platziert, sodass sich insgesamt eine Stimulationszeit von fünf Stunden ergab. Bis hierher erfolgten alle Schritte unter sterilen Bedingungen.

Nachdem die Zellen vom Boden der Wells mit der Pipette gelöst wurden, wurde für 5 min bei 4°C mit 1500 rpm zentrifugiert um die Ansätze auf Färbetemperatur zu kühlen, der Überstand abgenommen, die Pellets in je 200 µl FACS-Waschpuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 min, 4°C, 1500 rpm). Währenddessen wurde der Mastermix für die extrazelluläre Färbung in FACS-Waschpuffer hergestellt (siehe Abbildung 11 und Tabelle 6, Hinweise zu CD8-Qdot605 und Live/Dead-Aqua s.o. unter 2.6.5.).

Der Überstand wurde mit der Pipette abgezogen, die Zellpellets zur Färbung in je 50 µl Mastermix resuspendiert und für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Ansätze mit je 150 µl FACS-Waschpuffer gewaschen und 5 min bei 4°C mit 1500 rpm zentrifugiert. Nach dem abpipettieren des Überstandes wurden die Pellets in je 100 µl Cytofix/Cytoperm resuspendiert und für die Permeabilisierung 20 min bei 4°C im Dunkeln stehen gelassen. Im

Anschluss wurde je 100 µl Permash-Puffer hinzugegeben und für 5 min bei 4°C mit 1700 rpm zentrifugiert. Währenddessen wurde der Mastermix für die intrazelluläre Färbung mit den in Tabelle 6 gezeigten Konzentrationen in Permash-Puffer hergestellt.

Nach der Abnahme des Überstandes mit der Pipette wurden die Pellets in je 50 µl Mastermix pro Test resuspendiert und für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden zum Waschen je 150 µl Permash-Puffer zugegeben und für 5 min bei 4°C mit 1700 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen, die Pellets für einen zweiten Waschschrift noch einmal in 150 µl Permash-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 min, 4°C, 1700 rpm). Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen, die Pellets in 200 µl FACS-Waschpuffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Für die Dauer der Geräteeinstellungen am Durchflusszytometer wurden die Proben lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt. Direkt vor der Messung wurden zu jedem Röhrchen noch einmal 100 µl FACS-Waschpuffer zugegeben.

2.6.7. Herstellung der Kompensations-Beads

Um die Einstellungen am Durchflusszytometer optimal vornehmen zu können war es nötig für die einzelnen Fluorochrome Kompensations-Beads herzustellen. Diese wurden nach dem im Labor etablierten Protokoll mit den unter 2.3.1. aufgelisteten Substanzen und den in Tabelle 8 und Tabelle 9 gezeigten Materialien hergestellt.

Tabelle 8: Antikörper für die Herstellung der Kompensations-Beads

Fluorochrom	Konjugat	Konzentration	Informationen
AlexaFluor700	Ki67	2 µl/Test	BD Biosciences, Klon B56, #561277
APC	CD4	1:75	BeckmanCoulter, Klon 13B8.2, #IM2468
APC-Cy7	CD4	1:200	BD Biosciences, Klon RPA-T4, #557871
Aqua	Live/Dead	0,5 - 1 µl/Test, je nach Alter (siehe Tabelle 6)	LifeTechnologies, #L34957
BrilliantViolet650	CD19	1:50	BioLegend, Klon HIB19, #302237
FITC	CD4	1:70	Institut für Immunologie, Universität Tübingen, Klon HP2/6

Fluorochrom	Konjugat	Konzentration	Informationen
PacificBlue	CD3	0,5 µl/Test	BioLegend, Klon UCHT-1, #300417
PE	CD4	2 µl/Test	BD Biosciences, Klon RPA-T4, #555347
PE-Cy7	CD8	1:1000	BeckmanCoulter, Klon SFCI21Thy2D3, #737661

Tabelle 9: Reagenzien für die Herstellung der Qdot-Beads

Substanz bzw. Konjugat	benötigte Menge	Informationen
biotinylierter CD8-Antikörper	1 µl/Test	Institut für Immunologie, Universität Tübingen, Klon OKT-8, 0,96mg/ml
Qdot585 Streptavidin-Conjugate	1 µl/Test	LifeTechnologies, #Q10113MP
Qdot605 Streptavidin-Conjugate	1 µl/Test	LifeTechnologies, #Q10103MP
Qdot655 Streptavidin-Conjugate	1 µl/Test	LifeTechnologies, #Q10123MP
Qdot705 Streptavidin-Conjugate	1 µl/Test	LifeTechnologies, #Q10163MP

Für die herkömmlichen Kompensationskontrollen, sowie die Kompensations-Beads für Live/Dead-Aqua wurden die Fläschchen mit den Positiv- und Negativbeads zunächst 20 sek mit dem Vortexer geschüttelt (für die Live/Dead-Aqua-Beads wurden Amin-reaktive Beads verwendet). Im Anschluss wurde für jede Kompensationskontrolle ein Tropfen Positivbeads in ein Well einer 96-Well-Platte gegeben (runder Boden). Danach wurden die Antikörper mit den jeweiligen Konzentrationen aus Tabelle 8 hinzugegeben (mit Annahme eines Gesamtvolumens von 100 µl), mit der Pipette gemischt und 30 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Im Anschluss wurde zu allen Ansätzen 100 µl PBS gegeben und 5 min mit 1200 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgezogen, die gefärbten Beads in 100 µl FACS-Waschpuffer resuspendiert und zu jedem Ansatz wurde ein Tropfen Negativbeads zugegeben. Dann wurden die Kompensationskontrollen in FACS-Röhrchen überführt und es wurden erneut je 100 µl FACS-Waschpuffer hinzugegeben. Anschließend konnten die nun fertigen Beads für die Kompensations-Einstellungen am Durchflusszytometer

benutzt werden. Sie wurden maximal eine Woche lang benutzt und bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

Für die Herstellung der Kompensations-Beads für die Qdot-Fluorochrome wurde das Protokoll entsprechend modifiziert: Die Beadfläschchen wurden auch hier zunächst mit dem Vortexer geschüttelt und je ein Tropfen Positivbeads in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte (runder Boden) gegeben. Im Anschluss wurde je 1 µl des biotinylierten CD8-Antikörpers OKT-8 (siehe Tabelle 9) mit 1 µl/Test hinzugegeben und mit der Pipette gemischt. Es wurde für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, im Anschluss mit 100 µl PBS gewaschen und 5 min mit 1200 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgezogen und die einzelnen Proben wurden in je 100 µl FACS-Waschpuffer resuspendiert. Zu jeder Probe wurde nun 1 µl der entsprechenden Streptavidin-Qdot-Lösung zugegeben und mit der Pipette gemischt. Für diesen Färbeschritt erfolgte die Inkubation für 20 min bei 4°C im Dunkeln. Danach wurden je 100 µl FACS-Waschpuffer zugegeben und 5 min mit 1200 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert, sowie der Überstand abgezogen. Dann wurde mit je 100 µl FACS-Waschpuffer resuspendiert und je ein Tropfen Negativbeads zugegeben. Anschließend wurden die Ansätze in FACS-Röhrchen transferiert und erneut jeweils 100 µl FACS-Waschpuffer zugegeben. Auch die Qdot-Beads wurden maximal eine Woche verwendet und solange lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

Für die Kompensation von PI wurden 1×10^6 PBMC des jeweiligen Spenders in 200 µl Waschmedium für 30 min bei 65°C im Heizblock getötet und ab dann exakt so behandelt wie die zu färbenden Zellen aus Färbeprotokoll 2. Direkt vor der Aufnahme der Kompensation wurden auch hier 5 µl der PI-Lösung mit einer Konzentration von 5 µg/ml zugegeben. Nach der Aufnahme für die Kompensation wurden die restlichen Zellen verworfen.

2.6.8. Konfiguration des Durchflusszytometers

Für die Analyse am Durchflusszytometer wurde zunächst eine Filterkonfiguration entwickelt, mit der alle Messungen durchgeführt werden

konnten. Für die verschiedenen Laser waren die PMTs (bezeichnet mit A bis H) folgendermaßen belegt (Tabelle 10):

Tabelle 10: Konfiguration des Durchflusszytometers

Laser	PMT	Bandfilter	Long-Pass-Filter	detektierbare Fluorochrome
Violett (405 nm)	A	710/50	670LP	Qdot705
	B	660/20	630LP	BrilliantViolet650 Qdot655
	C	605/15	595LP	Qdot605
	D	585/15	570LP	Qdot585
	E	510/50	505LP	Aqua
	F	450/50	-	PacificBlue
	G - H	nicht belegt		
Blau (488 nm)	A	670/30	635LP	-
	B	510/20	505LP	FITC
	C	488/10	-	SSC
Grün (532 nm)	A	780/60	750LP	PE-Cy7
	B	610/20	600LP	PI
	C	582/15	-	PE
	D - H	nicht belegt		
Rot (640 nm)	A	780/60	750LP	APC-Cy7
	B	730/45	690LP	AlexaFluor700
	C	670/30	-	APC

2.7. Durchführung der Durchflusszytometrie

Die Messungen der Färbeprotokolle 1 bis 3 wurde immer gemeinsam durchgeführt, das ICS zu einem späteren Zeitpunkt. Meist wurden die Proben aller Zeitpunkte zweier Patienten gleichzeitig gefärbt und gemessen. Vor Beginn der Arbeit am Durchflusszytometer wurden zunächst die benötigten Filter aus 2.6.8. platziert. Danach erfolgte die Kompensation (für alle gleichzeitig gemessenen Ansätze). Hierzu wurden für jedes Fluorochrom 5000 Bead-Ereignisse aufgenommen und die Gates für das Intensitätsmaximum im Histogramm-Plot möglichst eng gesetzt um eine geringe Spektrumsüberlappung (Ziel: < 30 %) zu erzielen. Die Kompensationsmatrix wurde vom Computer errechnet (Software: BD FACS Diva[®]).

Im Anschluss erfolgte die Messung der Proben (bei mehreren Färbungen zunächst Färbeprotokoll 2, dann Protokoll 1 und zum Schluss Protokoll 3). Zu den Ansätzen für das Färbeprotokoll 2 wurde, wie unter 2.6.5. beschrieben,

15sek vor der Messung immer noch 5 µl einer PI-Lösung mit einer Konzentration von 5 µg/ml zugegeben. Bei Färbeprotokoll 1 war der Zielwert für die Aufnahme 500.000 lebende Zellen, für die Färbeprotokolle 2 und 3 und das ICS 2.000.000 Ereignisse. Für jedes Protokoll wurden auch ungefärbte, aber sonst exakt gleich behandelte Zellen aufgezeichnet.

2.8. Auswertung der Durchflusszytometrie

2.8.1. Ausschluss von Experimenten

Ein Experiment wurde aus der Auswertung ausgeschlossen, wenn bei der primären Akquisition weniger als 100.000 Ereignisse aufgenommen werden konnten oder wenn nach der Betrachtung der Färbung mit der Live/Dead-Aqua-Reagenz weniger als 25 % der aufgenommenen Zellen vital waren.

2.8.2. Färbung 1: Phänotypisierung und Proliferation

Als erstes wurde der zeitliche Verlauf der Akquisition im Histogramm begutachtet und nur der Bereich mit einer recht stabilen Aufnahmezeit ausgewählt. Dann wurden die Doppel- und Triplet-Zellen über einen 2D-Dotplot FSC-H vs. FSC-A ausgeschlossen (alle im Verlauf verwendeten Dotplots waren grundsätzlich zweidimensional). Über den Dotplot Live/Dead-Aqua vs. FSC-A konnten im Anschluss alle lebenden Zellen ausgewählt werden. Aus diesen wiederum wurden in einem Dotplot SSC-A vs. FSC-A die Lymphozyten ausgewählt und die Monozyten ausgeschlossen (siehe 2.6.1.). Lymphozyten sind weniger stark granuliert und insgesamt kleiner als Monozyten und liegen somit auf beiden Skalen bei kleineren Werten. Die Lymphozyten wurden schließlich über einen Dotplot CD19 vs. CD3 in drei Gruppen aufgeteilt: B-Zellen (CD19⁺CD3⁻), T-Zellen (CD3⁺CD19⁻) und NK-Zellen (doppelt negativ). Die weitere Analyse ist in Tabelle 11 gezeigt:

Tabelle 11: Weitere Analyse für Färbung 1

B-Zellen	T-Zellen	NK-Zellen
<p>Die B-Zellen wurden über einen Dotplot Ki67 vs. CD19 lediglich auf ihre Proliferation untersucht.</p>	<p>Bei den T-Zellen wurde zunächst ein Dotplot Ki67 vs. FSC-A angelegt, welcher die Gesamtproliferation der T-Zellen zeigt. Anschließend wurden alle T-Zellen über CD4 vs. CD8 aufgeteilt. Auf CD4-negativen Zellen wurden die Dotplots Ki67 vs. CD8 und CD25 vs. CD8 angelegt. Auf den CD8-negativen Zellen entsprechend Ki67 vs. CD4 und CD25 vs. CD4. Auf den CD4⁺CD8⁻-Zellen wurde ein Dotplot mit Foxp3 vs. CD25 angelegt um regulatorische T-Zellen zu charakterisieren (Foxp3⁺CD25⁺). Diese wiederum wurden mit Ki67 vs. FSC-A auf ihre Proliferation untersucht.</p>	<p>Der auf den NK-Zellen angelegte Dotplot zeigte Ki67 vs. CD56 und ließ Rückschlüsse auf die Funktionalität [18] und Proliferation der NK-Zellen zu.</p>

2.8.3. Färbung 2: Apoptose, Nekrose und Virus-spezifische T_K-Zellen

Auch hier wurde zunächst der zeitliche Aufnahmeverlauf begutachtet und im Anschluss die Einzelzellen identifiziert (siehe 2.8.2.). Daraufhin erfolgte jedoch sofort der Ausschluss der Monozyten und die Aufteilung der Lymphozyten in drei Gruppen: CD4⁺CD8⁻, CD8⁺CD4⁻ und CD4⁻. Die Populationen CD4⁺CD8⁻ und CD4⁻CD8⁺ wurden jeweils mit PI vs. Annexin V auf Apoptose und Nekrose untersucht. Apoptotische Zellen sind Annexin V-positiv, jedoch noch PI-negativ. Alle PI-aufnehmenden Zellen wurden als nekrotisch gewertet.

Mit den CD4⁻-Zellen wurden zwei verschiedene Auswertungen durchgeführt (Tabelle 12):

Tabelle 12: Weiteres Vorgehen für Färbung 2

erste Auswertung	zweite Auswertung
Zum einen wurden sofort die verschiedenen Multimeren gegen CD8 aufgetragen, dann ein Bereich um die Multimer-positiven und CD8-positiven Zellen gelegt und diese wiederum wie oben beschrieben auf Apoptose und Nekrose untersucht (PI vs. Annexin V).	Zum anderen wurde auf die CD4-negativen Zellen bereits der Plot PI vs. Annexin V gelegt und nur die lebenden (also doppelt negativen) Zellen nach Virus-spezifischen Zellen untersucht (Multimer vs. CD8).

2.8.4. Färbung 3: Differenzierung und Proliferation Virus-spezifischer T_K-Zellen

Die Auswertung der für diese Färbung aufgenommenen Zellen verlief bis zur Festlegung auf die Lymphozyten wie bei Färbung 1 (siehe 2.8.2.). Danach wurde ein Dotplot CD4 vs. CD8 angelegt. In diesem ergaben sich die Populationen CD4⁺CD8⁻, CD8⁺CD4⁻ und CD4⁻. Aus den CD4-negativen Zellen wurden dann wieder Virus-spezifische, CD8-positiv Zellen über den Dotplot Multimer vs. CD8 identifiziert. Zuletzt erfolgte die Auswertung für die verschiedenen Differenzierungsstufen. Hierzu wurden auf allen Virus-spezifischen Populationen, sowie auf den CD4⁺CD8⁻- und CD8⁺CD4⁻-Zellen die Dotplots CD28 vs. CD45RA und CCR7 vs. CD45RA angelegt. Zur genaueren Subspezifizierung wurde die CCR7⁻CD45RA⁻-Population noch einmal über den Dotplot CD28 vs. FSC-A aufgetrennt.

2.8.5. ICS (Färbung 4)

Auch bei der intrazellulären Zytokinfärbung verlief die Strategie zur Auswertung zunächst gleich wie bei Färbung 1 (siehe 2.8.2.). Die Lymphozyten wurden hier folgendermaßen aufgeteilt: CD8⁻, CD4⁻ und CD8⁺CD4⁻. Dann erfolgte die weitere Auswertung nach dem Schema in Tabelle 13:

Tabelle 13: Weitere Analyse für das ICS

CD8-negative Zellen	CD4-negative Zellen	CD8 ⁺ CD4 ⁻ -Zellen
Auf den CD8-negativen Zellen wurden folgende Dotplots für die Identifizierung der Zytokinproduktion angelegt: IL-2 vs. CD4, IL-5 vs. CD4, IL-10 vs. CD4, IL-17 vs. CD4, IFN- γ vs. CD4 und TNF- α vs. CD4.	Für die CD4-negativen Zellen wurden die folgenden Dotplots angelegt: IL-2 vs. CD8, IL-10 vs. CD8, IFN- γ vs. CD8, TNF- α vs. CD8, sowie CD107a vs. CD8.	Die Population CD8 ⁺ CD4 ⁻ wurde auf CD107a vs. IFN- γ untersucht. CD107a diente dabei als Sekretions-, bzw. Zytotoxizitätsmarker.

2.9. Analyse und statistische Auswertung

Am Durchflusszytometer gemessene Proben wurden nur analysiert, wenn mindestens 100.000 Ereignisse aufgezeichnet werden konnten. Dies war bei allen durchgeführten Versuchen der Fall.

Die untersuchte Probe eines Patienten oder gesunden Spenders wurde als positiv für ein bestimmtes Viruspeptid angesehen, wenn mindestens 0,02% der CD8-positiven T-Lymphozyten HLA-Peptid-Multimer-positiv waren.

Sollten in der Auswertung der Durchflusszytometrie Zell-Untergruppen weiter analysiert werden (zum Beispiel Virus-spezifische T_K-Zellen), so wurde dies nur durchgeführt, wenn die Untergruppe mindestens 30 Zellen enthielt.

Bei der Auswertung der Zytokinproduktion wurde bei Stimulation mit SEB oder den Peptiden CMV-pp65, EBV-BMLF1, EBV-LMP2 und Influenza-Matrix die Hintergrundproduktion (detektiert über die Stimulation mit dem HIV-RT-Peptid als Negativkontrolle) von den ermittelten Werten subtrahiert.

Die statistische Auswertung erfolgte in Microsoft Office Excel 2011[®] für Mac, Version 14.4.1. Es wurden gepaarte, zweiseitige Student's T-Tests für die Auswertung der Patienten über den Therapieverlauf und ungepaarte, zweiseitige Student's T-Tests für den Vergleich zwischen den unterschiedlichen Therapiegruppen sowie zwischen Patienten und gesunden Spendern durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde vor Beginn der Studie auf $p < 0,05$ festgesetzt (in den Grafiken und Diagrammen mit * markiert). Nach einer

durchgeführten Bonferroni-Korrektur für wiederholte Tests betrug das Signifikanzniveau $p < 0,0125$ (mit ** dokumentiert). Bei den Vergleichen zweier Kohorten wurde die Signifikanz in den Grafiken ebenfalls mit * für $p < 0,05$ und mit ** für $p < 0,0125$ dokumentiert.

Die Diagramme wurden mit GraphPad Prism V6[®] für Mac erstellt. Im Grafikprogramm konnten auch weitere statistische Tests durchgeführt werden.

3. Ergebnisse

3.1. Voruntersuchungen

3.1.1. Etablierung eines kombinierten Live/Dead-Aqua-Protokolls

Um möglichst wenige Zellen bei den sehr aufwändigen Färbungen zu verlieren wurde zunächst versucht, die Färbung mit der Live/Dead-Aqua-Reagenz zusammen mit den extrazellulären Antikörpern in FACS-Waschpuffer durchzuführen. Dies war in dem zuvor im Labor üblichen Färbeprotokoll nicht vorgesehen (es wurde zunächst mit extrazellulären Antikörpern in FACS-Waschpuffer gefärbt, dann gewaschen und anschließend erfolgte die Färbung mit der Live/Dead-Aqua-Reagenz in PBS) und musste somit erst etabliert werden. Dies wurde zusammen mit Kombinationsversuchen von anderen Antikörpern (siehe 3.1.2.) im Rahmen von zwei Experimenten durchgeführt. Im ersten der beiden Experimente wurden die Zellen wie für ein ICS zusätzlich stimuliert (mit PMA + Ionomycin in Medium, SEB in Medium und Medium alleine als Negativkontrolle). Dieses Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt. Im zweiten Experiment erfolgte nur eine extrazelluläre Färbung ohne Stimulation, jedoch für zwei verschiedene gesunde Spender jeweils in Vierfach-Testung. Für alle Replikate wurde der Färbeindex (staining index, SI) bestimmt (siehe folgende Formel) und dessen Mittelwert für die Replikate berechnet.

$$SI = \frac{\text{mediane Fluoreszenz positive Population} - \text{mediane Fluoreszenz negative Population}}{2 \times \text{Standardabweichung negative Population}}$$

Durchweg ergab sich für die Färbung nach dem kombinierten, neuen Protokoll ein besserer Färbeindex (siehe Tabelle 14). Die Anteile an lebenden und toten Zellen unterschieden sich nicht wesentlich. In der Konsequenz wurde das kombinierte Protokoll im weiteren Verlauf benutzt.

Tabelle 14: Färbeindices für die Live/Dead-Aqua-Färbung im Vergleich zwischen dem im Labor etablierten (alten) Protokoll und dem neuen, kombinierten Färbeprotokoll

Experiment	Testart	Protokoll	mittlerer Färbeindex
Experiment 1	PMA + Ionomycin	altes Protokoll	2,32
		kombiniertes Protokoll	5,59
	SEB	altes Protokoll	6,49
		kombiniertes Protokoll	7,20
	Negativkontrolle	altes Protokoll	1,16
		kombiniertes Protokoll	6,61
Experiment 2	Spender 1	altes Protokoll	5,87
		kombiniertes Protokoll	10,12
	Spender 2	altes Protokoll	7,51
		kombiniertes Protokoll	9,96

3.1.2. Auswahl von IL-4 vs. IL-5 als Marker für Th2-Zellen

Als Marker für Th2-Zellen kam sowohl IL-4 als auch IL-5 infrage, weshalb Vortests durchgeführt wurden, um zwischen IL-4 und IL-5 zu entscheiden. Es wurden zwei Experimente mit jeweils sechs Replikaten durchgeführt. Die Stimulation erfolgte mit SEB und PMA + Ionomycin, als Negativkontrolle wurde Zellmedium alleine verwendet. Bei allen Experimenten war die Antwort für IL-4 zwar deutlich stärker, jedoch wichen die Werte in den einzelnen Replikaten erheblich voneinander ab. IL-5-produzierende Zellen waren zwar insgesamt weniger vorhanden, allerdings waren diese über die Replikate hinweg stabil und gut reproduzierbar (siehe Tabelle 15). Aus diesen Gründen wurde IL-5 (an APC gebunden) in das ICS-Färbeprotokoll aufgenommen.

Tabelle 15: Ergebnisse der Vorversuche für die Detektion von IL-4 und IL-5. Angegeben ist jeweils der Prozentsatz der IL-4- bzw. IL-5-produzierenden, lebenden Lymphozyten (Mittelwerte mit Schwankungsbreite).

Experiment	Stimulans	IL-4 (mit Schwankungsbreite)	IL-5 (mit Schwankungsbreite)
Experiment 1	PMA + Ionomycin	1,02 (0,17 - 2,97)	0,06 (0,02 - 0,08)
	SEB	0,38 (0,00 - 0,85)	0,03 (keine Schwankung)
Experiment 2	PMA+ Ionomycin	0,55 (0,00 - 1,76)	0,05 (0,03 - 0,07)
	SEB	0,17 (0,00 - 0,79)	0,02 (0,01 - 0,02)

3.1.3. Kombination verschiedener Qdot-Fluorochrome

Als Fluorochrome für die HLA-Peptid-Multimere wurden Qdot-Farbstoffe verwendet, da sie sich für die präferierte Konfiguration des Durchflusszytometers sehr gut eigneten. Es wurden im Rahmen der Vorversuche zwei Experimente zu den verschiedenen Qdot-Kombinationen durchgeführt:

Experiment 1: Qdot565, Qdot585, Qdot655 und Qdot705 vs. Qdot 605, Qdot625, Qdot655 und Qdot705.

Experiment 2: Qdot565, Qdot585, Qdot625 und Qdot655 vs. Qdot 585, Qdot605, Qdot655 und Qdot705.

Nach Sichtung der gesamten Ergebnisse und dem Vergleich mit bereits im Labor vorliegenden Daten erwies sich die folgende Fluorochrom-HLA-Peptid-Multimer-Kombination als am besten:

- EBV-BMLF1-Qdot585
- Influenza-Matrix-Qdot605
- EBV-LMP2-Qdot655
- CMV-pp65-Qdot705

Die spektrale Überlappung der vier Qdot-Fluorochrome ist in Abbildung 12 gezeigt.

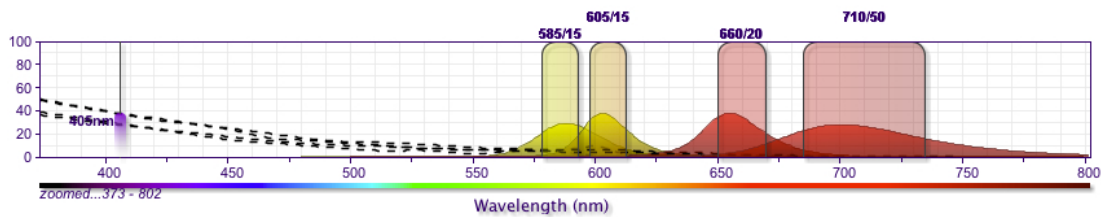


Abbildung 12: Spektrale Überlappung der eingesetzten Qdot-Fluorochrome. Auf der X-Achse ist die Wellenlänge aufgetragen, die Y-Achse zeigt die relative Stärke der Fluoreszenz an. Der Peak bei 405nm entspricht der Wellenlänge des anregenden Laserlichts, die vier Kurven den Emissionsspektren der untersuchten Fluorochrome. Die Zahlen oberhalb der Grafik spezifizieren die eingesetzten Bandpass-Filter (siehe 2.6.1.). Quelle: BD Fluorescence Spectrum Viewer auf www.bdbiosciences.com, dort erstellt am 29.05.2014.

Gleichzeitig zu den Kombinationen wurden auch Tests zur Färbekonzentration (5 µg/ml vs. 10 µg/ml) durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse dieser Tests für die HLA-Multimer-positiven CD4⁺CD8⁺-Zellen wurden alle HLA-Peptid-Multimere mit einer Konzentration von 5µg/ml in den Mastermix gegeben, da sich dabei ein optimales Färbeergebnis erzielen ließ. Einzig das HLA-Multimer EBV-BMLF1-Qdot585 lieferte bei einer Färbekonzentration von 10 µg/ml bessere Färbeintensitäten, sodass dafür diese Konzentration verwendet wurde (Daten nicht gezeigt).

3.1.4. Stimulationsagens für die Positivkontrolle des ICS

Als Positivstimulans standen für das ICS drei verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, die in insgesamt drei Vorversuchen gegeneinander getestet wurden. Die erste Möglichkeit war PMA + Ionomycin, eine weitere SEB und schließlich die Kombination aus den T-Zell-stimulierenden Antikörpern anti-CD3 + anti-CD28 [163-165].

Zunächst wurde mit PMA (50 ng/ml) + Ionomycin (1 µM) und anti-CD3 (5 µg/ml) + anti-CD28 (1 µg/ml) für jeweils 5 h stimuliert. Die anschließende Analyse ergab durch die Stimulation mit der Antikörperkombination fast keine Zytokinproduktion, sodass diese Möglichkeit der Stimulation verworfen wurde. In zwei weiteren Experimenten, die auch der Auswahl von IL-4 vs. IL-5 für das ICS dienten (siehe 3.1.2.) wurde mit PMA + Ionomycin (Konzentrationen s.o.) und SEB (10 µg/ml), ebenfalls für 5 h, stimuliert. Es ergaben sich prozentual gesehen für SEB etwas weniger Zytokin-produzierende Lymphozyten, jedoch wirkte die Kombination von PMA und Ionomycin toxisch auf die zu

untersuchenden Zellen, sodass SEB in einer Konzentration von 10µg/ml bei einer Stimulationsdauer von 5 h standardmäßig als Positivkontrolle für die Zytokinfärbungen eingesetzt wurde (Daten nicht gezeigt).

3.2. Beispielauswertung

3.2.1. Färbung 1

Durch die Auswertung der Färbung 1 konnten folgende Populationen definiert werden (für die Übersicht über die eingesetzten Antikörper siehe 2.6.3.):

- lebende Lymphozyten
- lebende B-Lymphozyten
 - Proliferationsrate (Ki67-positiv)
- lebende NK-Zellen
 - Proliferationsrate
 - Anteil der voll funktionsfähigen NK-Zellen (CD56-positiv)
 - Proliferationsrate
- lebende T-Lymphozyten
 - Anteil der CD4-positiven, CD8-negativen Zellen
 - Aktivierungsgrad (CD25-positiv)
 - Proliferationsrate
 - Anteil der CD8-positiven, CD4-negativen Zellen
 - Aktivierungsgrad
 - Proliferationsrate
 - Anteil der regulatorischen T-Zellen (CD4⁺CD8⁻CD25⁺Foxp3⁺)
 - Proliferationsrate

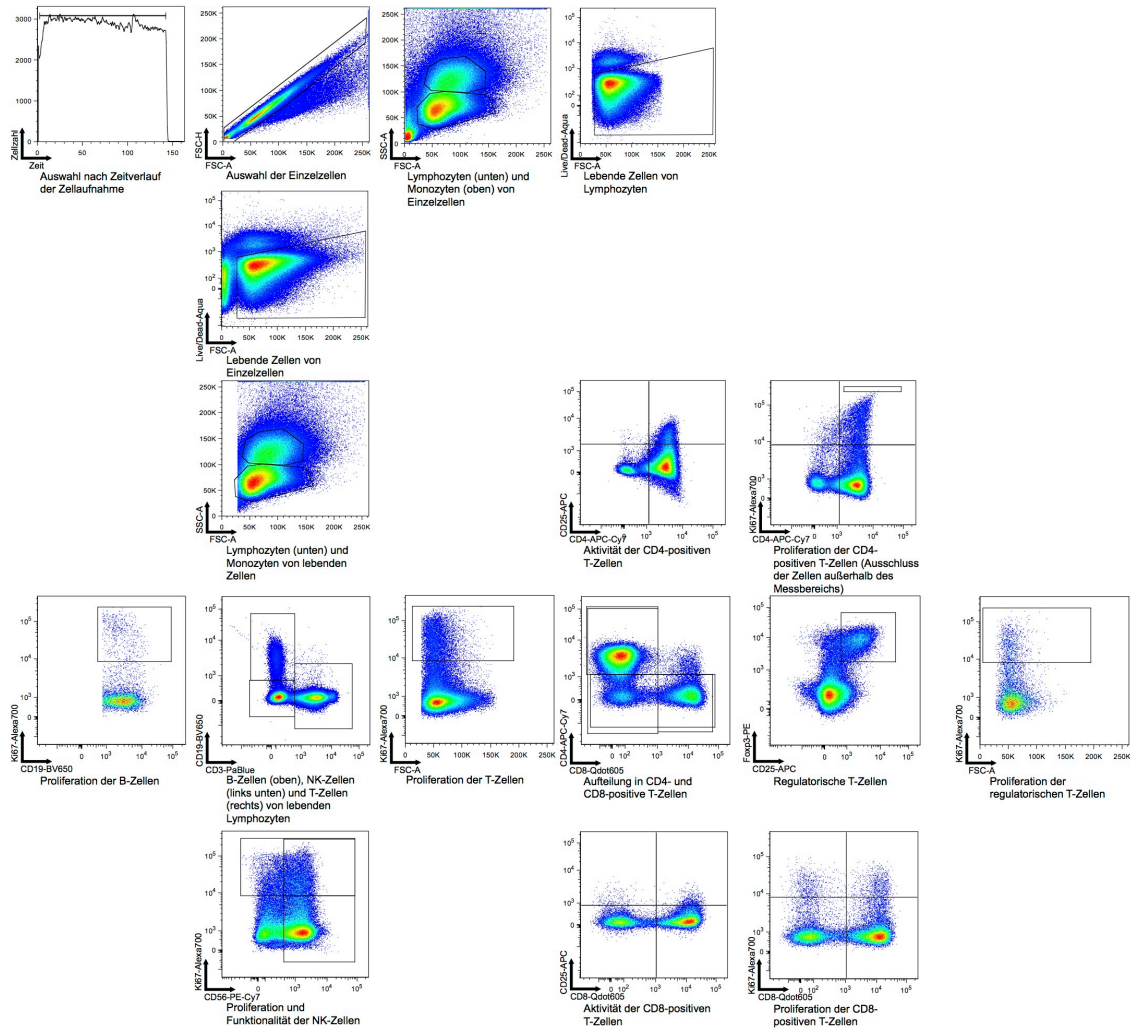


Abbildung 13: Auswertung für Färbung 1 am Beispiel des Patienten RTP9, Zeitpunkt D.

3.2.2. Färbung 2

Die Auswertung der Färbung 2 ermöglichte folgende Erkenntnisse:

- Apoptose- und Nekroserate der CD4-positiven Lympozyten (als apoptotisch wurden alle Zellen gewertet, die für Annexin V positiv, für PI jedoch negativ waren; alle PI-positiven Zellen wurden als nekrotisch gewertet)
- Apoptose- und Nekroserate der CD8-positiven Lympozyten
- Anteile der Viruspeptid-spezifischen Zellen unter den CD8-positiven Lympozyten, sowie deren Apoptose- und Nekroserate

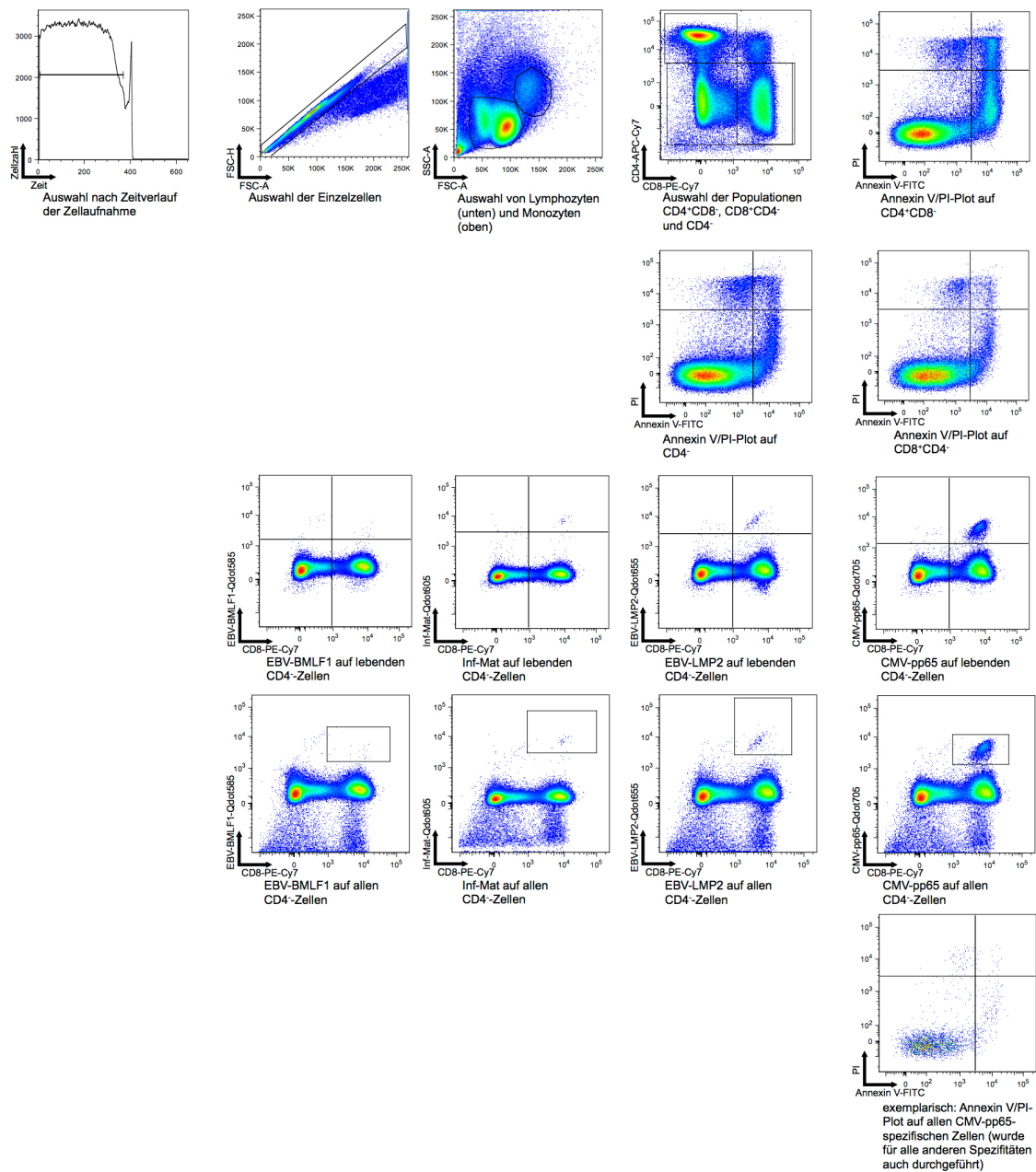


Abbildung 14: Auswertung für Färbung 2 am Beispiel des gesunden Spenders RTP103, Zeitpunkt D. In den Zeile 3 und 4 ist die Auswertung der Viruspeptid-spezifischen Zellen gezeigt. Diese wurde jeweils auf der Population der CD4-negativen Lymphozyten durchgeführt (Zeile 3: alle Zellen; Zeile 4: nur lebende Zellen, diese wurden zuvor als Annexin V- und PI-negativ ausgewählt).

3.2.3. Färbung 3

Mithilfe der dritten Färbung konnten die folgenden Zellpopulationen ermittelt werden:

- Differenzierungsstufen der lebenden CD4⁺CD8⁻, sowie der lebenden CD8⁺CD4⁻-Lymphozyten (via CD28 und CD45RA; die Färberegebnisse des CCR7-PE-Antikörpers waren trotz des Einsatzes einer Isotyp-Kontrolle unbefriedigend, sodass die Ergebnisse nicht verwertet wurden)
- Differenzierungsstufen und Proliferationsrate der lebenden Viruspeptid-spezifischen, CD8-positiven Lymphozyten

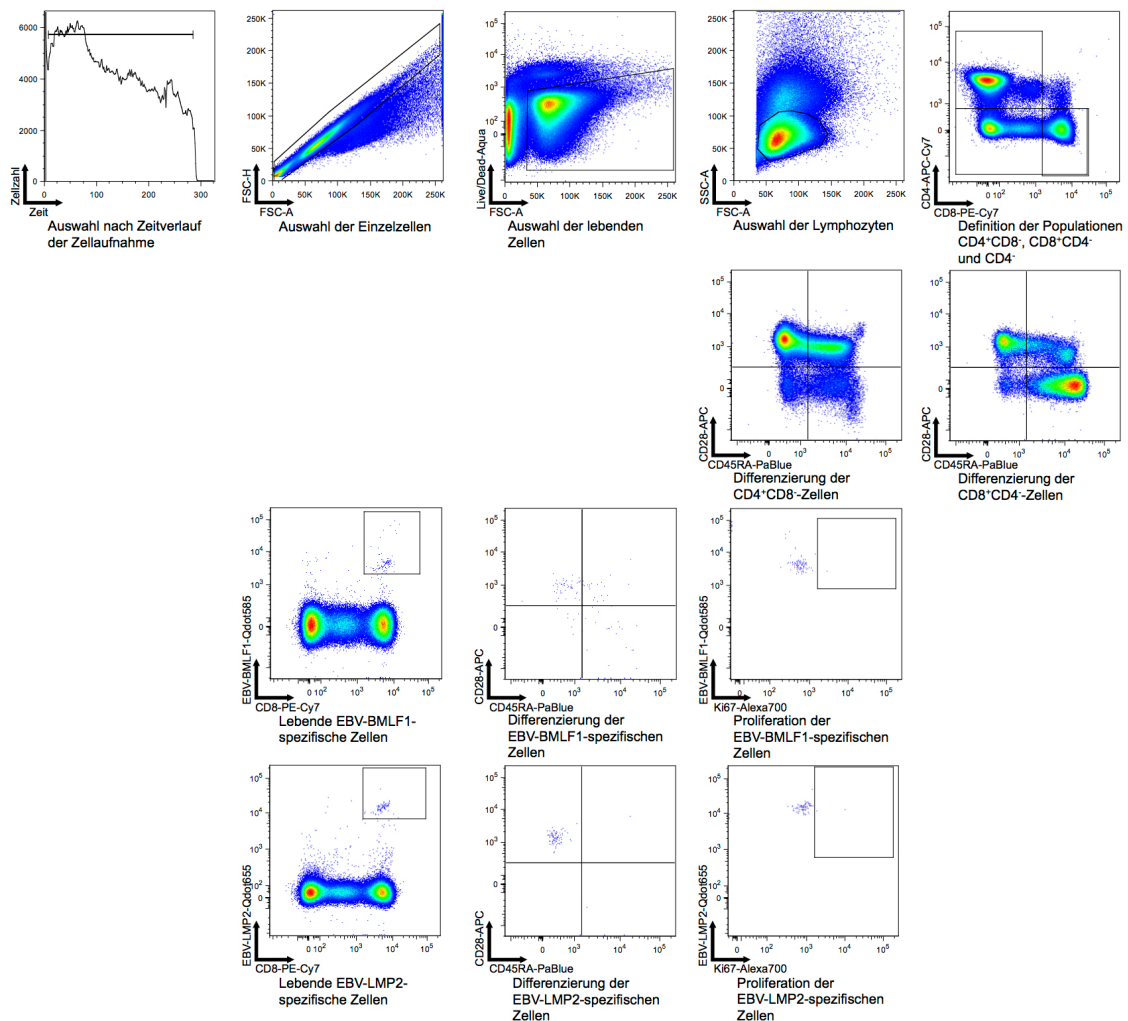


Abbildung 15: Auswertung für Färbung 3 am Beispiel von Patient RTP8, Zeitpunkt A. Die nicht gezeigten Auswertungen für die Virus-Spezifitäten Inf-Mat und CMV-pp65 erfolgten äquivalent.

3.2.4. ICS (Färbung 4)

Die Auswertung der intrazellulären Zytokinfärbung ermöglichte Aussagen zu den folgenden Populationen:

- lebende CD4⁺CD8⁻-Lymphozyten mit IL-2- / IL-5- / IL-10- / IL-17- / TNF- α - / IFN- γ - Produktion

- lebende CD8⁺CD4⁻-Lymphozyten mit IL-2- / IL-10- / TNF- α - / IFN- γ -Produktion
- lebende CD8⁺CD4⁻-Lymphozyten mit IFN- γ -Produktion und -Sekretion (via CD107a detektiert)

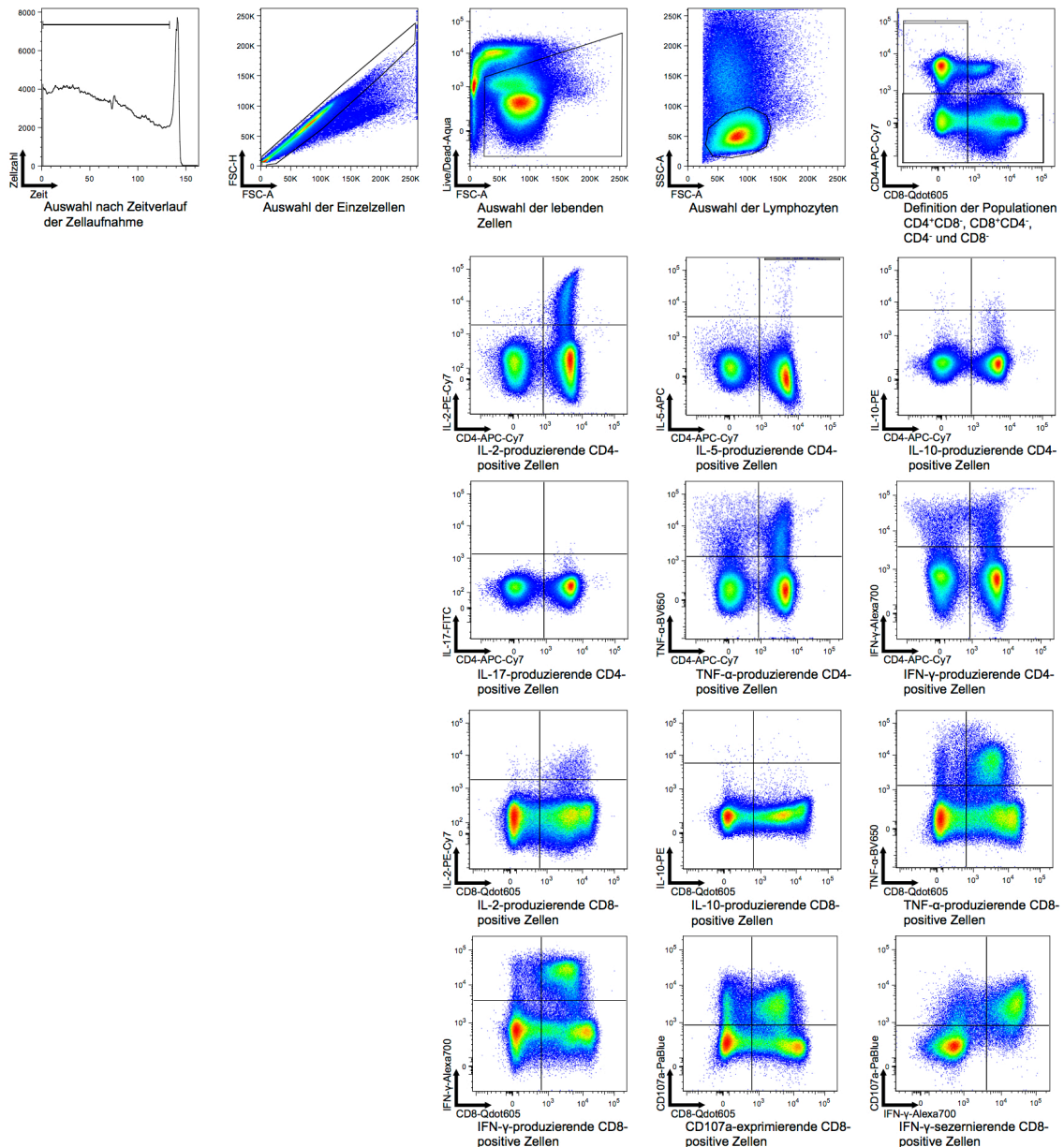


Abbildung 16: Auswertung für das ICS am Beispiel des Patienten RTP11, Zeitpunkt AB nach Stimulation mit SEB. Die Dotplots in Zeile 2 und 3 sind auf den lebenden CD8-negativen Lymphozyten angelegt, analog dazu sind die Dotplots der 4 und 5 auf den lebenden CD4-negativen Lymphozyten angelegt. Die Ausnahme bildet der Dotplot ganz rechts in der untersten Zeile, dieser ist auf den lebenden CD8⁺CD4⁻-Lymphozyten angelegt.

3.3. Durchgeführte Tests

Die folgende Tabelle 16 zeigt, welche Tests für die jeweiligen Patienten (RTP1 bis RTP25) und gesunden Spender (RTP101 bis RTP107) durchgeführt wurden.

Tabelle 16: Übersicht über alle durchgeführten Tests für Patienten und gesunde Spender. Legende: grünes Feld mit Häkchen: alle Tests wurden durchgeführt; gelbes Feld mit Häkchen und Beschriftung: es wurden mindestens 2 Tests durchgeführt, nicht durchgeführte Tests (wegen zu wenig verfügbaren Zellen) oder nicht auswertbare Tests sind im Text beschrieben; rotes Feld mit Kreuz: es wurde kein Test durchgeführt. Informationen zu den Blutentnahmezeitpunkten können der Abbildung 8 unter 2.1.3. entnommen werden.

Pat. / Spender	Färbe-protokoll 1	Färbe-protokoll 2	Färbe-protokoll 3	ICS SEB	ICS HIV	ICS CMV	ICS EBV-BMLF 1	ICS EBV-LMP2	ICS Influenza
RTP1	✓	✓ A-C nicht auswertbar	✓	✓	✓	X	X	X	✓
RTP2	✓	✓ ohne E	✓	✓	✓	✓ ohne A+E	X	X	X
RTP3	✓	✓	✓	✓ ohne D	✓ ohne D	X	✓ ohne C-E	X	✓ ohne D
RTP5	✓	✓ ohne E	✓	✓	✓	✓ ohne E	X	✓ ohne C+E	X
RTP6	✓ ohne E	✓ ohne D+E	✓ ohne E	✓ ohne C+E	✓ ohne C+E	✓ ohne C-E	X	X	X
RTP7	✓ ohne D+E	✓ ohne D+E	✓ ohne D+E	✓ ohne D+E	✓ ohne D+E	X	X	X	X
RTP8	✓	✓ ohne D	✓ ohne D	✓ ohne C+D	✓ ohne C+D	X	✓ ohne C+D	✓ ohne C-E	X
RTP9	✓	✓	✓	X	X	X	X	X	X
RTP11	✓ ohne E	✓ ohne D+E	✓ ohne E	✓ ohne E	✓ ohne E	X	✓ ohne D+E	X	X
RTP12	✓	✓	✓	✓	✓	✓ ohne D	X	X	X
RTP13	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓ ohne E	X	X
RTP14	✓ ohne D	✓ ohne D	✓ ohne D	X	X	X	X	X	X
RTP15	✓	✓ ohne B+E	✓ ohne E	X	X	X	X	X	X
RTP16	✓	✓ ohne C+E	✓ ohne E	X	X	X	X	X	X

Pat. / Spender	Färbe-protokoll 1	Färbe-protokoll 2	Färbe-protokoll 3	ICS SEB	ICS HIV	ICS CMV	ICS EBV-BMLF 1	ICS EBV-LMP2	ICS Influenza
RTP18	✓	✓ ohne D+E	✓	✓ ohne D	✓ ohne D	✓ ohne D+E	✓ ohne D+E	X	X
RTP19	✓	✓ ohne C+E	✓	✓ ohne C	✓ ohne C	✓ ohne C-E	X	X	X
RTP20	✓	✓ ohne E	✓	✓ ohne C+E	✓ ohne C+E	✓ ohne C+E	✓ ohne C+E	X	X
RTP21	✓	✓ ohne E	✓	✓	✓	X	✓ ohne C-E	X	X
RTP23	✓	✓ ohne C-E	✓	✓ E nicht auswertbar	✓ E nicht auswertbar	X	✓ ohne C-E	X	X
RTP24	✓	✓ ohne D	✓	✓ ohne D+E	✓ ohne D+E	X	✓ nur C	X	X
RTP25	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓ ohne C+E	X	X
RTP 101	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓ ohne B	X	X
RTP 103	✓	✓	✓	✓	✓ ohne D	✓	X	X	X
RTP 104	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	X	X
RTP 105	✓	✓	✓	X	X	X	X	X	X
RTP 106	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓ ohne C	X	X
RTP 107	✓	✓	✓	✓	✓ ohne D	X	X	✓ ohne D	X

3.4. Zellzahlverläufe

3.4.1. Leukozyten und Lymphozyten

Der Verlauf der Zellzahlen der Leuko- und Lymphozyten der Patienten während des Untersuchungszeitraumes konnte zum einen prozentual über die Messungen in der Durchflusszytometrie, zum anderen durch die Bestimmung der absoluten Leukozyten- und Lymphozytenzahlen im Differenzialblutbild überwacht werden. Ein Differenzialblutbild wurde bei den Patienten jedoch nur bei gegebenem klinischen Anlass, zum Beispiel dem Verdacht auf eine Leukopenie oder eine andere Blutbildveränderung, durchgeführt. Am Ende der

Studie lagen die Differenzialblutbilder von fünf Patienten (RTP20, 21 und 23 - 25) über den gesamten Bestrahlungszeitraum vor. Die Daten sind in Abbildung 17 gezeigt.

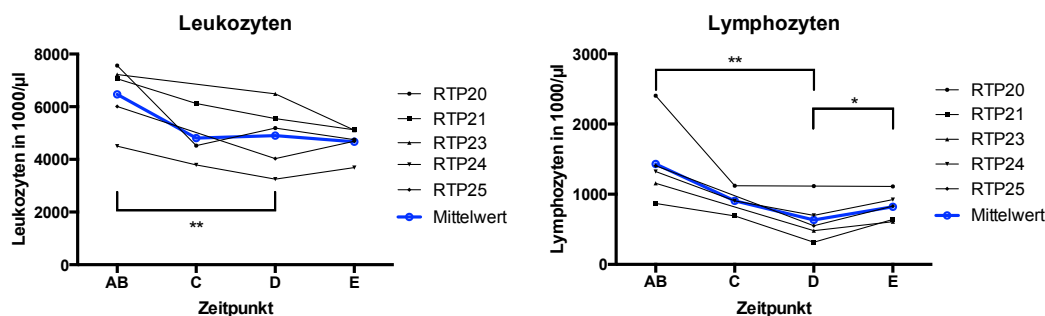


Abbildung 17: Entwicklung der absoluten Leukozyten- (links) und Lymphozytenzahlen (rechts) der Patienten RTP20, 21, 23, 24 und 25 ($n = 5$) über den Verlauf der Radiotherapie.

Es konnte eine signifikante Abnahme der Leukozytenzahlen während der Bestrahlung (bis zum Zeitpunkt D) und auch darüber hinaus (Zeitpunkt E) gezeigt werden. Die absoluten Lymphozytenzahlen nahmen während der Bestrahlung ebenfalls signifikant ab, erholten sich aber in den drei Monaten nach RT-Ende (zwischen Zeitpunkt D und E) in einem ebenfalls signifikanten Ausmaß. Im Vergleich der Zeitpunkte AB und E konnte jedoch trotzdem noch ein signifikanter Unterschied ($p = 0,029$) nachgewiesen werden, sodass nicht von einem kompletten Rückgang auf den Basiswert gesprochen werden kann (nicht in der Grafik gezeigt).

Von drei weiteren Patienten (RTP12, 15 und 19) waren Werte aus vorausgegangenen Blutbildern aus der radioonkologischen Klinik aus den Jahren 2007 und 2008 (entsprechend ca. vier Jahre vor Studienbeginn) bekannt, die als Ausgangswert herangezogen werden konnten. Bei diesen Patienten wurde am Ende der Radiotherapie (Zeitpunkt D) und bei der ersten Nachuntersuchung (Zeitpunkt E) ebenfalls ein Differenzialblutbild erstellt (siehe Abbildung 18).

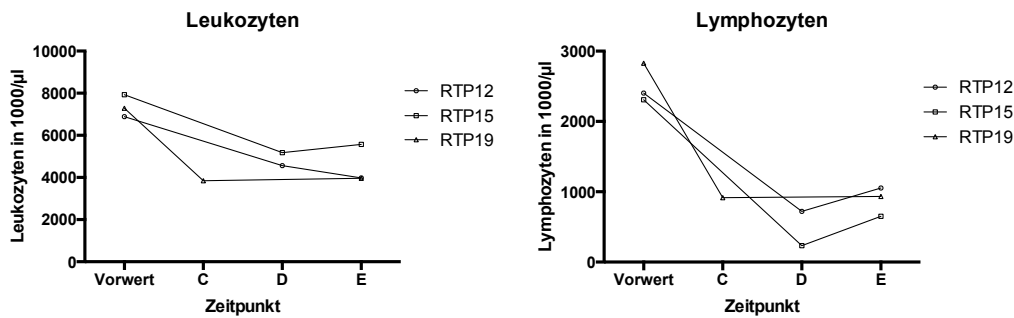


Abbildung 18: Verlauf der absoluten Leukozyten- (links) und Lymphozytenzahlen (rechts) der Patienten RTP12, 15 und 19 ($n = 3$) im Therapieverlauf verglichen mit vorhandenen Werten von einem früheren Zeitpunkt.

Für die drei Patienten waren ähnliche Trends wie für die fünf Patienten aus Abbildung 17 erkennbar, die statistischen Tests lieferten jedoch keine signifikanten Ergebnisse.

In den Analysen der Durchflusszytometrie konnte ebenfalls eine Abnahme des Lymphozytenanteils erkannt werden. Bei den Messungen aus Färbung 1 hatten die Patienten im Mittel 76,55 % Lymphozyten (Anteil an lebenden Zellen) vor Bestrahlungsbeginn und 59,27 % Lymphozyten am Bestrahlungsende (Zeitpunkt D). Der Unterschied war mit $p < 0,001$ signifikant. Auch hier war die Erholung des Lymphozytenanteils zum Zeitpunkt drei Monate nach Therapieende (69,44 %) mit $p = 0,007$ signifikant. Betrachtet man alle Lymphozyten nach Ausschluss von Zelltrümmern und Duplikaten oder Triplikaten, nahm die Lymphozytenzahl im Durchschnitt von ursprünglich 61,50 % auf 43,96 % bei Zeitpunkt D signifikant ab ($p < 0,001$). Ein Anstieg zwischen den Zeitpunkten D und E erfolgte hier nicht. Dies wurde durch die Messungen aus Färbung 2 bestätigt.

3.4.2. T-Zellen

In Färbung 1 wurde zunächst die Zusammensetzung der lebenden Lymphozyten untersucht und diese durch Antikörper gegen CD3 und CD19 in T-Zellen ($CD3^+CD19^-$), B-Zellen ($CD3^-CD19^+$) und NK-Zellen ($CD3^-CD19^-$) differenziert.

Der prozentuale Anteil der T-Zellen an den Lymphozyten nahm während der Bestrahlung ab (siehe Abbildung 19, Zeitpunkt AB: 63,53 %; Zeitpunkt D: 58,55

%; $p = 0,017$, $n = 18$) und es erfolgte keine Erholung nach Bestrahlungsende (Zeitpunkt E). Der Anteil der T-Zellen unter den Lymphozyten von 55,89 % unterschied sich ebenfalls signifikant vom Zeitpunkt AB ($p = 0,006$, $n = 15$). Das Verhältnis der Untergruppen der T-Zellen, also CD4- und CD8-positive T-Zellen, änderte sich durch die Bestrahlung nicht. Der Mittelwert der Quotienten $\frac{CD4^+}{CD8^+}$ betrug vor der RT 2,25, am Ende der RT 2,61 und drei Monate nach Therapieende 2,69.

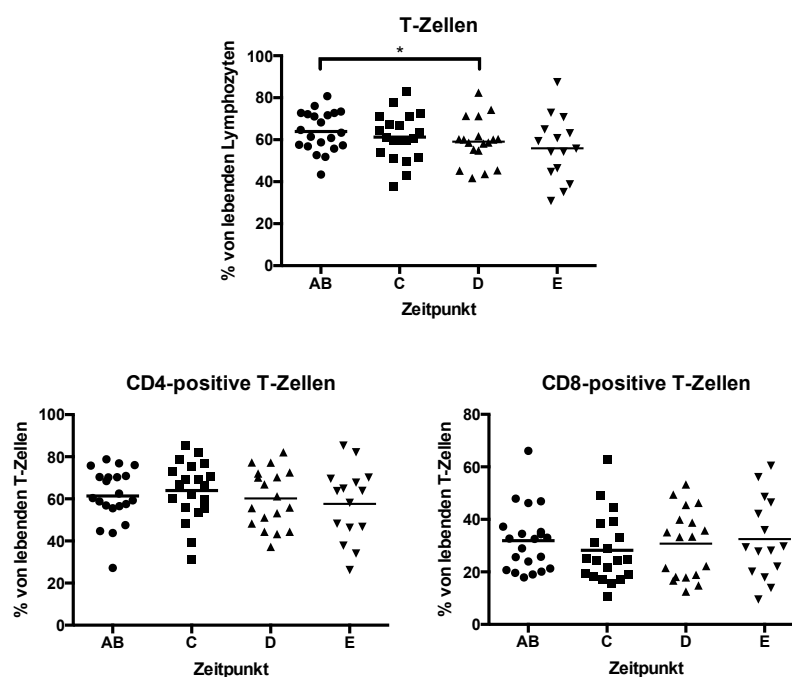


Abbildung 19: Oben: T-Zell-Verlauf während des Bestrahlungszeitraums. Unten: Verläufe der CD4- (links) und CD8-positiven T-Zellen (rechts) während der RT ohne signifikante Veränderungen. Gezeigt sind alle Patienten ($n = 21$) und der Mittelwert.

Für die regulatorischen T-Zellen (T_{reg} , $CD4^+CD8^-Foxp3^+CD25^+$) zeigten sich ebenfalls relevante, durch die Bestrahlung hervorgerufene Unterschiede (siehe Abbildung 20). Ihr prozentualer Anteil an den CD4-positiven T-Zellen stieg signifikant von im Mittel 4,83 % bei Zeitpunkt AB auf 6,24 % bei Zeitpunkt D an ($p = 0,006$, $n = 18$). Es erfolgte im Anschluss an die RT kein Rückgang auf das Ausgangsniveau.

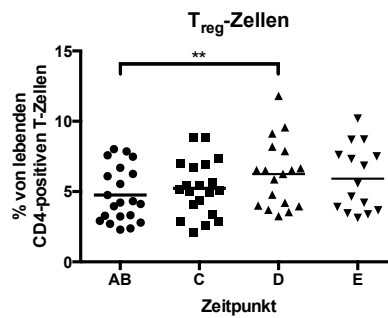


Abbildung 20: Verlauf der regulatorischen T-Zellen während der RT. Gezeigt sind alle Patienten ($n = 21$) und der Mittelwert.

Betrachtet man die Quotienten der absoluten Zahlen von regulatorischen T-Zellen zu CD4-positiven Effektor-T-Zellen und von regulatorischen T-Zellen zu CD8-positiven Effektor-T-Zellen, so ergaben sich die in Abbildung 21 gezeigten Unterschiede.

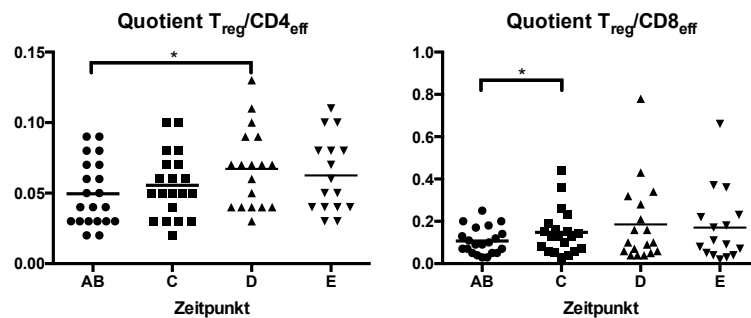


Abbildung 21: Links: Verlauf des Quotienten von regulatorischen T-Zellen ($CD3^+CD4^+CD25^+Foxp3^+$) zu CD4-positiven Effektor-T-Zellen ($CD3^+CD4^+CD25^+Foxp3^+$). Alle Zeitpunkte wurden untereinander verglichen. Zwischen den Zeitpunkten AB (Mittelwert 0,05) und D (Mittelwert 0,07) konnte mit $p = 0,036$ ($n = 18$) ein Unterschied nachgewiesen werden. Rechts: Verlauf des Quotienten von regulatorischen T-Zellen (Phänotyp s.o.) zu CD8-positiven Effektor-T-Zellen ($CD3^+CD8^+$). Auch hier wurden alle Zeitpunkte untereinander verglichen. Ein signifikanter Unterschied konnte hier zwischen den Zeitpunkten AB (Mittelwert 0,10) und C (Mittelwert 0,15) mit $p = 0,033$ ($n = 20$) nachgewiesen werden. Gezeigt sind die Quotienten für alle Patienten ($n = 21$) und deren Mittelwerte.

Mittels des Aktivierungsmarkers CD25 wurden die CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten auf Unterschiede in der Aktivierung vor und nach der RT untersucht. Dabei zeigten sich jedoch keine signifikanten Änderungen ($CD4^+$: 3,74 % vor und 4,87 % nach RT; $CD8^+$: 1,08 % vor und 1,16 % nach RT, Daten nicht gezeigt).

3.4.3. B-Zellen

Für die B-Zellen konnten, wie in Abbildung 22 gezeigt, ähnliche Ergebnisse wie für die Gesamtheit der T-Zellen (siehe 3.4.2.) gewonnen werden. Während der Bestrahlung sank ihr prozentualer Anteil an den lebenden Lymphozyten von im Durchschnitt 4,62 % vor der Bestrahlung (Zeitpunkt AB) auf 2,07 % bei Bestrahlungsende (Zeitpunkt D) ab ($p < 0,001$, $n = 18$). Im Anschluss an die RT erholten sich die B-Zellen in einer ebenfalls signifikanten Weise, sodass sie drei Monate nach Abschluss der Therapie (Zeitpunkt E) wieder durchschnittlich 3,61 % der Lymphozyten ausmachten ($p = 0,007$, $n = 14$).

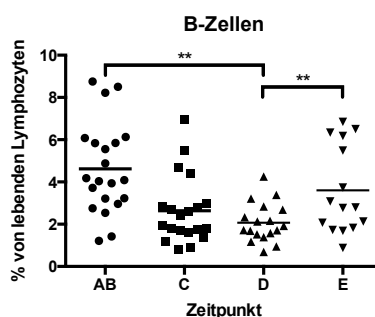


Abbildung 22: B-Zell-Verlauf während der Bestrahlungs-Therapie. Gezeigt sind alle Patienten ($n = 21$) und der Mittelwert.

3.4.4. NK-Zellen

Der Prozentsatz an CD3- und CD19-negativen NK-Zellen unter den lebenden Lymphozyten nahm während der Bestrahlung zu (die entsprechenden Abnahmen an T- und B-Zellen wurden in den Abschnitten 3.4.2. und 3.4.3. gezeigt). Zum Zeitpunkt AB am Beginn der RT waren im Schnitt 31,67 % der lebenden Lymphozyten der Patienten für CD3 und CD19 doppelt negativ. Nach Abschluss der RT waren zum Zeitpunkt D 38,79 % der Lymphozyten NK Zellen (signifikanter Unterschied zu Zeitpunkt AB mit $p = 0,001$, $n = 18$), zum Zeitpunkt E betrug ihr Anteil 40,36 % (ebenfalls signifikanter Unterschied zum Zeitpunkt AB mit $p = 0,004$, $n = 15$). Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 gezeigt.

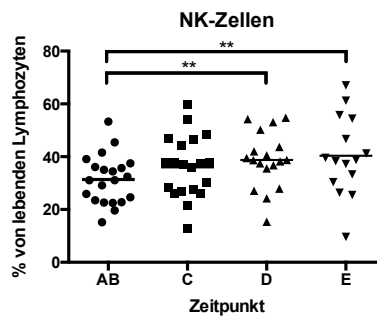


Abbildung 23: Verlauf der NK-Zellen während der Therapie. Die Werte bei den Zeitpunkten D und E unterschieden sich signifikant vom Ausgangswert beim Zeitpunkt AB ($p_D = 0,001$, $n = 18$; $p_E = 0,004$, $n = 15$). Gezeigt sind alle Patienten ($n = 21$), sowie der Mittelwert.

Über das Oberflächenmolekül CD56 können die NK-Zellen in zwei Untergruppen aufgeteilt werden. Voll funktionsfähige NK-Zellen sind CD56-positiv. NK-Zellen die CD56 nicht exprimieren, haben eine deutlich geringere zytotoxische Potenz und sekretieren weniger Zytokine [18]. Zu Beginn der Behandlung waren bei den Patienten durchschnittlich 77,02 % der NK-Zellen CD56-positiv. Die CD56-positive Population nahm zunächst auf 64,94 % leicht ab (bei Zeitpunkt C, $p = 0,016$, $n = 20$). Ab dann stieg der prozentuale Anteil zunächst auf 68,13 % bei Zeitpunkt D (nicht signifikant) und weiter auf 76,81 % bei Zeitpunkt E (kein signifikanter Unterschied mehr zu Zeitpunkt AB). Der Verlauf der CD56⁺-NK-Zellen ist in Abbildung 24 gezeigt.

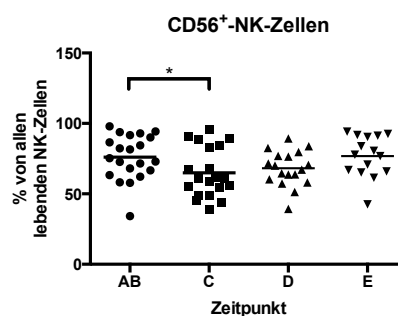


Abbildung 24: Entwicklung des Anteils der voll funktionsfähigen NK-Zellen unter den NK-Zellen während der Bestrahlung. Gezeigt sind alle Patienten ($n = 21$) und der Mittelwert.

Betrachtet man die Populationen CD3⁻CD19⁻CD56⁺ und CD3⁻CD19⁻CD56⁻ unter den lebenden Lymphozyten, so ließen sich dabei folgende Unterschiede über

den Bestrahlungsverlauf feststellen (siehe auch Abbildung 25, in der Beschreibung finden sich auch die prozentualen Anteile):

- CD3⁻CD19⁻CD56⁺-NK-Zellen:
 - insgesamt Zunahme von Zeitpunkt AB zu Zeitpunkt E ($p = 0,007$; $n = 16$)
 - ebenfalls Zunahme von C zu D ($p = 0,031$; $n = 17$), von D zu E ($p = 0,036$; $n = 15$) und von C zu E ($p = 0,012$; $n = 15$; nicht in der Grafik gezeigt)
- CD3⁻CD19⁻CD56⁻-NK-Zellen:
 - signifikante Zunahme von Zeitpunkt AB zu Zeitpunkt C ($p = 0,011$; $n = 20$) und Zeitpunkt D ($p = 0,007$; $n = 18$)
 - ebenfalls insgesamt leichte Zunahme von AB zu E ($p = 0,047$; $n = 16$)

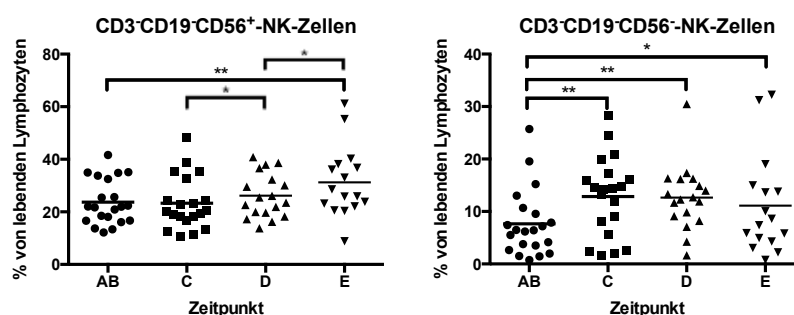


Abbildung 25: Verlauf der dreifach definierten NK-Zellen als Anteil der lebenden Lymphozyten über den Verlauf der RT. Links: CD3⁻CD19⁻CD56⁺-NK-Zellen mit einem signifikanten Anstieg von Zeitpunkt AB (24,19 %) zu Zeitpunkt E (31,25 %, $p = 0,007$, $n = 16$). Rechts: CD3⁻CD19⁻CD56⁻-NK-Zellen mit einem signifikanten Anstieg vom Zeitpunkt AB (7,48 %) zu den Zeitpunkten C (12,86 %, $p = 0,011$, $n = 20$), D (12,64 %, $p = 0,007$, $n = 18$) und E (11,12 %, $p = 0,047$, $n = 16$). Gezeigt sind alle Patienten ($n = 21$) und der Mittelwert.

3.5. Proliferation

Die Proliferation der verschiedenen Zellgruppen wurde über den Proliferationsmarker Ki67 detektiert. Fast alle untersuchten Zellpopulationen zeigten durch die Bestrahlung einen Anstieg des Anteils an proliferierenden Zellen. Davon ausgenommen waren lediglich die CD8-positiven, CMV-pp65-spezifischen Zellen, für die allerdings derselbe Trend erkannt werden konnte,

jedoch kein signifikanter Unterschied nachweisbar war, sowie die CD8-positiven, HLA-Multimer-positiven Zellen für EBV-LMP2 und das Influenza-Matrixprotein. Für die beiden letzteren (EBV-LMP2 und Inf-Mat) wurden zu wenige Tests für eine valide Aussage durchgeführt.

Es ließen sich insgesamt zwei Veränderungen unterscheiden (siehe Tabelle 17, die linke und mittlere Spalte zeigen die Populationen mit signifikanten Veränderungen, in der rechten Spalte sind die Populationen ohne statistisch nachweisbare Veränderungen aufgelistet): Zum einen nahm die Proliferationsrate vom Zeitpunkt AB zum Zeitpunkt D zu und sank bei Zeitpunkt E wieder ab (Gruppe 1), zum anderen blieb die Proliferationsrate auch nach Zeitpunkt D auf einem hohen Level und es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Zeitpunkten D und E (Gruppe 2). Für die CMV-pp65-spezifischen Zellen (Gruppe 3) war der Rückgang von Zeitpunkt D zu E signifikant (8,85 % vs. 1,26 %; $p = 0,006$; $n = 6$), nicht jedoch der Anstieg von Zeitpunkt AB zu D (2,39 % vs. 8,85 %). Die Veränderungen für die einzelnen Populationen sind in Abbildung 26 dargestellt. Die genauen Ergebnisse für die Virus-spezifischen Zellen sind unter 3.8.3. zu finden.

Tabelle 17: Übersicht über die verschiedenen Veränderungen der Proliferationsrate bei unterschiedlichen Zellpopulationen. Für die EBV-LMP2- und Inf-Mat-spezifischen CD8-positiven T-Zellen erfolgte aufgrund zu weniger durchgeführter Tests keine Auswertung bezüglich der Proliferationsrate.

Gruppe 1: Proliferationsanstieg von Zeitpunkt AB zu D, danach Rückgang	Gruppe 2: Proliferationsanstieg von Zeitpunkt AB zu D, danach weiterhin hohe Proliferationsrate	Gruppe 3: kein signifikanter Nachweis eines Proliferationsanstiegs
<ul style="list-style-type: none"> • T-Zellen • CD4⁺-T-Zellen • B-Zellen • NK-Zellen • CD56⁺-NK-Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> • CD8⁺-T-Zellen • regulatorische T-Zellen (T_{reg}) • EBV-BMLF1-spezifische, CD8⁺-T-Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> • CMV-pp65-spezifische, CD8⁺-T-Zellen

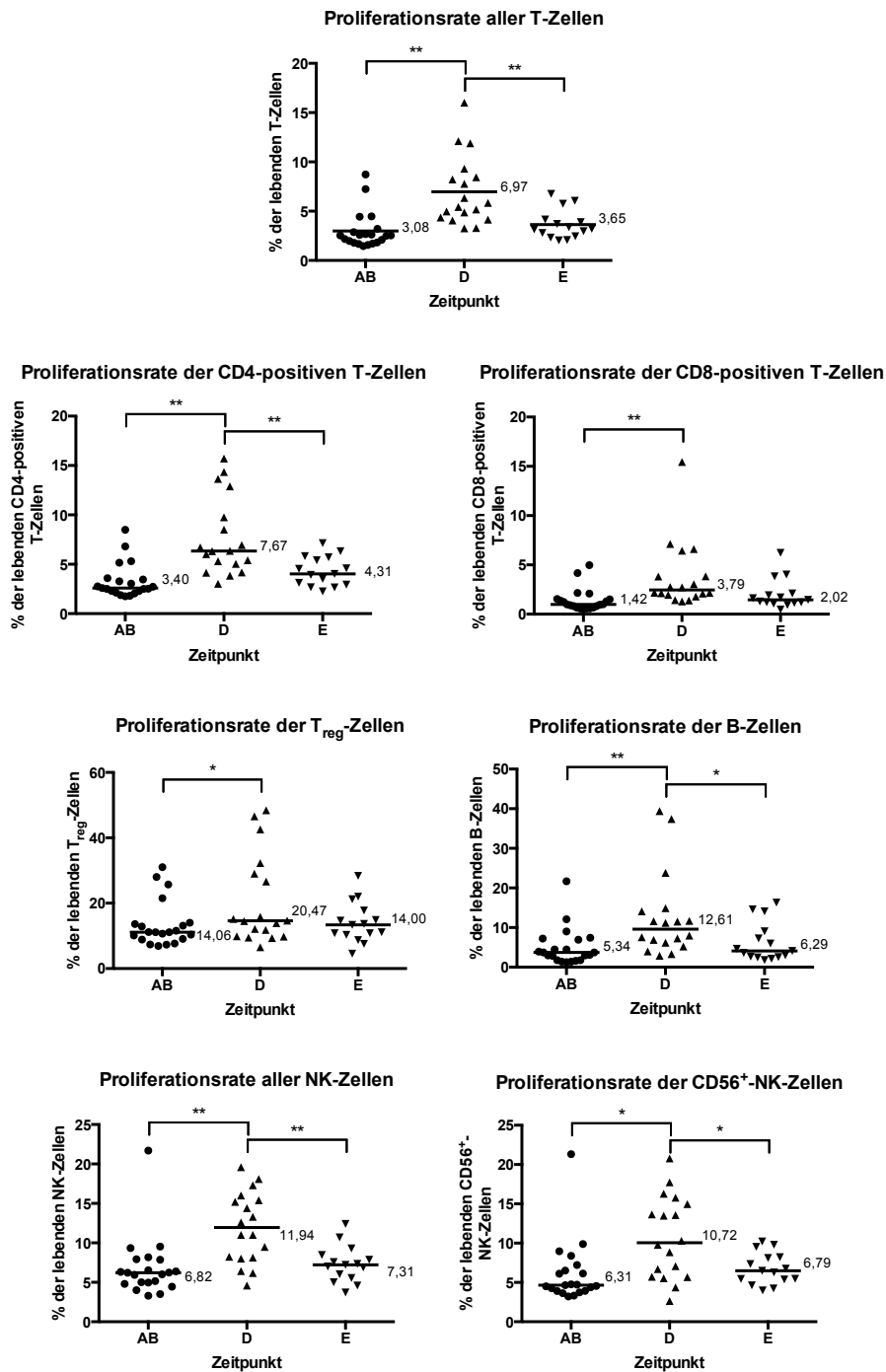


Abbildung 26: Veränderungen in der Proliferationsrate der verschiedenen Zellpopulationen. 1. Zeile: Zunächst Zunahme der Proliferationsrate bei den T-Zellen ($CD3^+CD19^+$; $p < 0,001$; $n = 18$) und Abnahme nach Bestrahlungsende ($p < 0,001$; $n = 14$). 2. Zeile links: Ähnliches Verhalten der $CD4^+$ -T-Zellen ($CD3^+CD19^+CD4^+CD8^-$; Zunahme: $p < 0,001$, $n = 18$; Abnahme: $p = 0,007$, $n = 14$). 2. Zeile rechts: Bei den $CD8^+$ -T-Zellen ($CD3^+CD19^+CD4^+CD8^+$) konnte lediglich eine Zunahme der Proliferationsrate beobachtet werden ($p = 0,011$; $n = 18$). 3. Zeile links: Ähnliches Verhalten der regulatorischen T-Zellen ($CD3^+CD19^+CD4^+CD8^-CD25^+Foxp3^+$; Zunahme: $p = 0,031$, $n = 18$; keine signifikante Abnahme). 3. Zeile rechts: Die B-Zellen ($CD3^-CD19^+$) zeigten zunächst eine Zunahme in ihrer Proliferationsrate ($p = 0,012$, $n = 18$) und eine

Abnahme nach RT-Ende ($p = 0,031$, $n = 14$). 4. Zeile links: Gleiches galt auch für alle NK-Zellen ($CD3^+CD19^-$; Zunahme: $p < 0,001$, $n = 18$; Abnahme: $p = 0,001$, $n = 14$). 4. Zeile rechts: Die $CD56$ -positiven NK-Zellen ($CD3^+CD19^-CD56^+$) verhielten sich ebenso (Zunahme: $p = 0,017$, $n = 18$; Abnahme: $p = 0,042$, $n = 14$). Dargestellt sind jeweils alle Patienten ($n = 21$), die Mittelwerte (in %) sind in der Grafik angegeben.

3.6. Apoptose und Nekrose

Die in Färbung 2 durchgeführten Tests zu apoptotischen und nekrotischen Zellen lieferten für fast alle untersuchten Zellpopulationen keine signifikanten Veränderungen. Dazu zählten:

- CD4-positive Lymphozyten
- CD8-positive Lymphozyten
- CMV-pp65-spezifische, CD8-positive Lymphozyten
- EBV-BMLF1-spezifische, CD8-positive Lymphozyten
- Influenza-Matrixprotein-spezifische, CD8-positive Lymphozyten

Lediglich für EBV-LMP2-spezifische, CD8-positive Lymphozyten, die bei sieben Patienten untersucht wurden, konnten leichte Unterschiede durch die RT in der Zellviabilität erkannt werden: Die lebenden Zellen nahmen von 84,25 % vor RT auf 73,40 % nach Therapieende (Zeitpunkt D) ab ($p = 0,041$; $n = 3$). Gleichzeitig stieg der Prozentsatz an apoptotischen Zellen von 11,84 % auf 15,10 % an ($p = 0,035$; $n = 3$). Der Anteil an nekrotischen Zellen veränderte sich im Mittelwert von 4,05 % auf 11,53 %, wobei der statistische Test kein signifikantes Ergebnis lieferte. Die Ergebnisse sind genauer im Abschnitt 3.8.4. gezeigt.

3.7. Differenzierung der T-Zellen

3.7.1. Erläuterung der unterschiedlichen Zellpopulationen

Die Ergebnisse der Versuche mit dem Differenzierungsmarker CCR7 waren nicht zufriedenstellend, da die Dotplots der Durchflusszytometrieauswertung im Vergleich verschiedener Probanden starke Unterschiede aufwiesen und keine einheitliche Unterscheidung zwischen positiver und negativer Population möglich war. Sie wurden daher in der weiteren Analyse nicht betrachtet. Die Auswertung zur Differenzierung der T-Zellen basiert daher ausschließlich auf den Informationen des Plots CD28 vs. CD45RA.

Für die CD4-positiven Zellen wurden CD45RA⁺CD28⁺-Zellen als naiv gewertet [32], Zellen, die für CD45RA positiv und für CD28 negativ waren, wurden als differenzierte Effektorzellen angesehen [32, 166]. Die zwei weiteren Populationen (CD45RA⁻CD28⁺ und CD45RA⁻CD28⁻) sind für CD4-positive Zellen nicht genau definiert, werden jedoch allgemein als Antigen-erfahrene Zellen angesehen. Die CD8-positiven Zellen konnten durch die beiden verwendeten Marker noch genauer eingeteilt werden:

- CD45RA⁺CD28⁺: naiv [32]
- CD45RA⁺CD28⁻: differenzierte Effektorzellen [32, 36, 166]
- CD45RA⁻CD28⁺: (zentrale) Gedächtniszellen [32, 36]
- CD45RA⁻CD28⁻: Effektor-Gedächtniszellen (effector / memory CD8 T cells) [36]

3.7.2. Differenzierung der CD4-positiven Zellen

Der prozentuale Anteil naiver CD4-positiver Zellen unter den lebenden Lymphozyten nahm während der Bestrahlung deutlich ab. Zu Beginn der RT waren durchschnittlich 21,26 % der CD4-positiven Zellen naiv (CD45RA⁺CD28⁺), am Bestrahlungsende (Zeitpunkt D) nur noch 11,62 % ($p < 0,001$; $n = 17$). Ein erneuter Anstieg bei Zeitpunkt E blieb aus. Die bereits differenzierten Effektorzellen unter den CD4-positiven Zellen (CD45RA⁺CD28⁻) nahmen im Gegensatz von 3,96 % auf 6,75 % signifikant zu ($p = 0,025$; $n = 17$). Auch hier erfolgte keine Änderung zwischen den Zeitpunkten D und E. Beide Veränderungen sind in Abbildung 27 dargestellt.

Die Antigen-erfahrenen CD4-positive T-Zellen mit den Oberflächenantigenen CD45RA⁻CD28⁺ zeigten einen leichten Anstieg von Zeitpunkt AB zu Zeitpunkt D (69,63 % vs. 76,18 %; $p = 0,022$; $n = 17$). Bei den CD45RA⁻CD28⁻-Zellen wurden keine signifikanten Veränderungen durch die RT festgestellt.

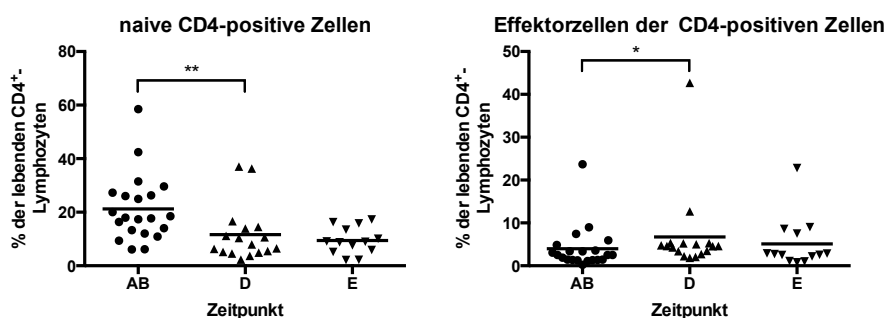


Abbildung 27: Veränderungen in der Differenzierung der CD4-positiven T-Zellen durch die RT: Abnahme des Anteils der naiven Zellen (links) und relative Zunahme der Effektoren (rechts). Gezeigt sind jeweils alle Patienten ($n = 21$) und der Mittelwert.

3.7.3. Differenzierung der CD8-positiven Zellen

Die einzelnen unter 3.7.1. genannten Differenzierungsstufen der CD8-positiven T-Zellen erfuhren durch die Bestrahlung keine signifikante Änderung. In Tabelle 18 sind die Mittelwerte vor der Bestrahlung (Zeitpunkt AB), bei Bestrahlungsende (Zeitpunkt D) und drei Monate nach Therapieende (Zeitpunkt E) angegeben.

Tabelle 18: Anteile der verschiedenen Differenzierungsstufen der CD8-positiven Zellen während der RT. Gezeigt sind die Mittelwerte aller Patienten ($n = 21$) in Prozent.

Differenzierungsstufe	Phänotyp / Charakterisierung	Zeitpunkt AB	Zeitpunkt D	Zeitpunkt E
naive Zellen	CD45RA ⁺ CD28 ⁺	13,44	11,70	11,21
differenzierte Effektoren	CD45RA ⁺ CD28 ⁻	41,47	38,60	42,22
(zentrale) Gedächtniszellen	CD45RA ⁻ CD28 ⁺	32,77	35,59	35,71
Effektor-Gedächtniszellen	CD45RA ⁻ CD28 ⁻	12,35	14,04	10,88

Die Differenzierung der Virus-spezifischen CD8-positiven Lymphozyten ist in Abschnitt 3.8.5. dargestellt.

3.8. Virus-spezifische CD8-positive Zellen

3.8.1. Übersicht über die HLA-Peptid-Multimer-Positivität

Zunächst wird dargestellt, wie viele HLA-Peptid-Multimer-positive Zellen als Anteil der lebenden CD8-positiven Zellen (aus Färbung 3) im jeweiligen Test der Patienten und gesunden Spender (GS) vorhanden waren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 aufgeführt. Ein Patient oder Spender wurde als positiv für die jeweilige Spezifität gewertet, wenn an allen durchgeführten Zeitpunkten mindestens 0,02% der lebenden CD8-positiven Zellen für das jeweilige HLA-Peptid-Multimer positiv waren. Diese Fälle sind in Tabelle 19 grün hinterlegt.

Tabelle 19: Anteil der HLA-Peptid-Multimer-positiven Zellen an den lebenden CD8-positiven Lymphozyten aus Färbung 3 in Prozent. Die Spalte „ICS“ gibt an ob und mit welchen Peptiden, ein ICS durchgeführt wurde. Grundsätzlich wurde mit SEB und HIV stimuliert (Positiv- und Negativkontrolle) und gegebenenfalls zusätzliche Tests mit den entsprechenden Peptiden der HLA-Peptid-Multimere durchgeführt. Bei den gesunden Probanden wurde nur dreimal Blut abgenommen, sodass Zeitpunkt E entfiel. Alle grün hinterlegten Felder wurden als HLA-Multimer-positiv gewertet (s.o.). Wenn Felder mit dem Symbol X markiert sind, wurde kein Test durchgeführt.

RTP	CMV-pp65				EBV-BMLF1				EBV-LMP2				Influenza-Matrix				ICS
	AB	C	D	E	AB	C	D	E	AB	C	D	E	AB	C	D	E	
1	0,02	0,04	0,02	0,02	0,03	0,04	0,06	0,03	0,02	0,04	0,04	0,03	0,03	0,08	0,05	0,02	Inf
2	0,65	0,54	0,72	0,81	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,03	0,02	0,01	0,02	0,03	CMV
3	0,03	0,02	0,02	0,03	0,23	0,12	0,12	0,16	0,03	0,03	0,02	0,02	4,39	2,54	1,55	2,18	BMLF1, Inf
5	6,77	4,88	5,04	9,07	0,05	0,03	0,05	0,03	0,04	0,04	0,03	0,04	0,01	0,01	0,03	0,01	CMV, LMP2
6	0,65	0,72	0,90	X	0,48	0,48	1,27	X	0,03	0,03	0,03	X	0,11	0,15	0,06	X	CMV
7	0,12	0,08	X	X	0,10	0,07	X	X	0,03	0,02	X	X	0,02	0,00	X	X	un-spez.
8	0,01	0,02	X	0,01	0,13	0,06	X	0,07	0,15	0,08	X	0,09	0,01	0,02	X	0,02	BMLF1, LMP2
9	0,01	X	0,01	0,00	0,24	X	0,09	0,11	0,04	X	0,03	0,02	0,03	X	0,07	0,01	X
11	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	BMLF1
12	1,61	1,91	1,60	1,34	0,06	0,05	0,07	0,07	0,01	0,00	0,03	0,02	0,00	0,00	0,01	0,00	CMV
13	0,01	0,01	0,01	0,02	0,07	0,12	0,12	0,10	0,01	0,02	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	BMLF1
14	0,01	0,00	X	0,03	4,00	2,77	X	2,29	0,16	0,21	X	0,13	0,03	0,02	X	0,00	X
15	0,00	0,01	0,05	X	0,01	0,02	0,05	X	0,09	0,07	0,10	X	0,00	0,26	0,25	X	X
16	0,01	0,02	0,01	X	0,13	0,15	0,14	X	0,01	0,02	0,01	X	0,01	0,02	0,01	X	X
18	9,68	6,23	8,02	3,76	0,32	0,27	0,40	0,34	0,10	0,07	0,04	0,07	0,01	0,01	0,01	0,01	CMV, BMLF1
19	1,66	1,02	1,17	1,68	0,07	0,03	0,06	0,05	0,03	0,21	0,14	0,06	0,04	0,10	0,04	0,10	CMV
20	0,70	0,59	0,65	0,91	0,55	0,23	0,10	0,08	0,03	0,02	0,01	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	CMV, BMLF1
21	0,01	0,01	0,00	X	1,28	1,63	1,60	X	0,02	0,02	0,06	X	0,01	0,01	0,00	X	BMLF1
23	0,04	0,22	0,19	X	1,74	1,80	1,61	X	0,01	0,22	0,06	X	0,01	0,11	0,00	X	BMLF1
24	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	BMLF1
25	0,04	0,00	0,04	0,03	0,92	1,31	0,84	0,87	0,04	0,00	0,06	0,06	0,03	0,05	0,04	0,02	BMLF1
101	0,00	0,00	0,01		0,06	0,08	0,07		0,02	0,02	0,02		0,05	0,03	0,04		BMLF1
103	5,43	5,15	5,25		0,03	0,03	0,05		0,16	0,15	0,23		0,09	0,04	0,04		CMV

RTP	CMV-pp65				EBV-BMLF1				EBV-LMP2				Influenza-Matrix				ICS
	AB	C	D	E	AB	C	D	E	AB	C	D	E	AB	C	D	E	
104	0,05	0,05	0,05		0,24	0,25	0,36		0,01	0,01	0,02		0,03	0,01	0,03		BMLF1
105	0,00	0,01	0,00		0,18	0,22	0,08		0,01	0,04	0,02		0,08	0,08	0,04		*
106	4,04	4,23	4,63		1,40	1,41	1,51		0,13	0,08	0,10		0,03	0,02	0,02		CMV, BMLF1
107	0,03	0,03	0,01		0,03	0,02	0,03		0,04	0,04	0,03		0,01	0,03	0,03		LMP2

3.8.2. Zellverlauf der Virus-spezifischen CD8-positiven Zellen

Die prozentualen Anteile der für die einzelnen Viruspeptide spezifischen CD8-positiven Zellen wurden durch die Bestrahlung nicht signifikant beeinflusst. Dies konnte sowohl in Färbeprotokoll 2, als auch in Färbeprotokoll 3 durch die Färbung mit den HLA-Peptid-Multimeren gezeigt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 und Abbildung 28 dargestellt und lassen sich auch bereits in Tabelle 19 unter 3.8.1. erkennen.

Tabelle 20: Darstellung der Verläufe der HLA-Multimer-positiven Zellen. Gezeigt ist jeweils der Durchschnitt der prozentualen Anteile der Viruspeptid-spezifischen Zellen an den CD8-positiven Lymphozyten, bei Färbung 2 sind alle Zellen gezeigt, bei Färbung 3 wurden zunächst die lebenden Zellen ausgewählt.

	Färbung 2				Färbung 3			
	Zeitpunkt AB	Zeitpunkt C	Zeitpunkt D	Zeitpunkt E	Zeitpunkt AB	Zeitpunkt C	Zeitpunkt D	Zeitpunkt E
CMV-pp65	2,21	2,15	1,62	1,23	1,99	1,48	1,83	2,20
EBV-BMLF1	0,47	0,41	0,20	0,40	0,58	0,54	0,44	0,32
EBV-LMP2	0,06	0,05	0,05	0,07	0,06	0,07	0,05	0,05
Inf-Mat	1,36	1,13	0,65	1,71	0,67	0,49	0,26	0,39

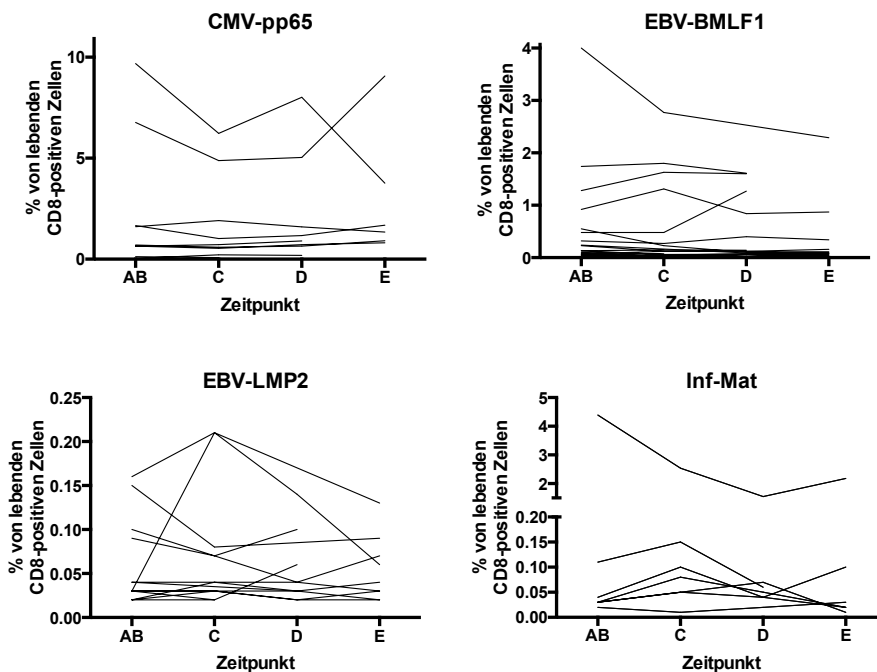


Abbildung 28: Verlauf der HLA-Peptid-Multimer-positiven Zellen als prozentualer Anteil der lebenden CD8-positiven Lymphozyten über die Bestrahlung. Gezeigt sind alle für das jeweilige Multimer positiven Patienten (Daten aus Färbung 3). Für CMV-pp65 (oben links): RTP1 - 3, 5 - 7, 12, 18 - 20 und 23 (n = 11); für EBV-BMLF1 (oben rechts): RTP1 - 3, 5 - 9, 12 - 14, 16, 18 - 21, 23 und 25 (n = 18); für EBV-LMP2 (unten links): RTP1 - 3, 5 - 9, 14, 15, 18, 19 und 21 (n = 13); für Inf-Mat (unten rechts): RTP1 - 3, 6, 9, 19 und 25 (n = 7).

3.8.3. Proliferation der Virus-spezifischen CD8-positiven Zellen

Bei den für EBV-BMLF1-spezifischen, lebenden CD8-positiven Lymphozyten zeigte sich eine Veränderung ähnlich der CD8-positiven Lymphozyten und der T_{reg}-Zellen (siehe 3.5.). Die Proliferationsrate (Anteil der Ki67⁺ Zellen an den HLA-Peptid-Multimer-positiven, CD8-positiven, lebenden Lymphozyten) nahm während des Bestrahlungszeitraums von durchschnittlich 3,69 % bei Zeitpunkt AB auf 9,91 % bei Zeitpunkt D zu (p = 0,004; n = 11). Im Anschluss erfolgte kein signifikanter Rückgang in Richtung des Ausgangsniveaus, auch wenn sich eine entsprechende Tendenz in Abbildung 29 erkennen lässt. Bei Zeitpunkt E waren im Mittel noch 2,91 % der untersuchten Zellen positiv für Ki67.

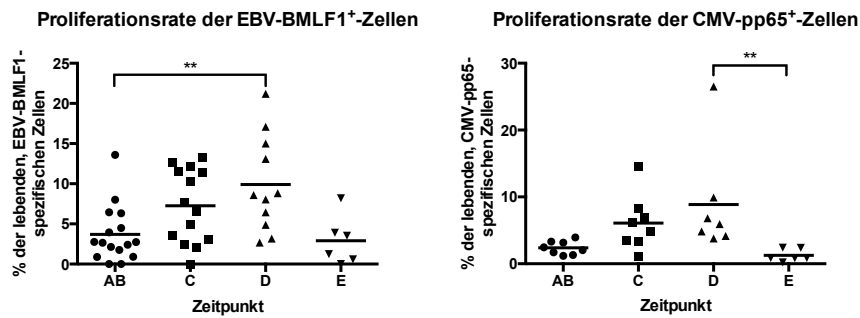


Abbildung 29: Verlauf der Proliferationsrate für EBV-BMLF1-spezifische Zellen (links, $n = 16$) und CMV-pp65-spezifische Zellen (rechts, $n = 8$). Gezeigt sind die jeweils für das HLA-Peptid-Multimer positiven Patienten, sofern mindestens 30 Multimer-positive Zellen vorhanden waren (vgl. 2.9.) und der Mittelwert.

Die CMV-pp65-spezifischen Zellen zeigten keinen signifikanten Anstieg der Proliferationsrate, jedoch einen deutlichen Rückgang nach RT-Ende, vergleichbar mit dem der Populationen aus Gruppe 1 in Tabelle 17 (siehe 3.5.) Der Ausgangswert der Proliferationsrate (Zeitpunkt AB) lag bei 2,39 %, zum Zeitpunkt D befanden sich 8,85 % der Zellen in der Proliferation. Drei Monate später (Zeitpunkt E) war diese Zahl auf 1,26 % zurückgegangen ($p = 0,006$; $n = 6$, siehe Abbildung 29).

Für Zellen spezifisch für EBV-LMP2 oder das Influenza-Matrixprotein konnten keine Veränderungen in der Proliferationsrate erkannt werden (Daten nicht gezeigt). Für die beiden Peptide waren jedoch auch deutlich weniger Patienten auswertbar (EBV-LMP2: $n = 7$; Inf-Mat: $n = 3$), da oftmals die Schwelle von mindestens 30 HLA-Multimer-spezifischen Zellen (siehe 2.9.) nicht erreicht wurde. Eine zuverlässige Aussage war somit nicht möglich. Die Proliferation der Inf-Mat-spezifischen Zellen ist für den Patient RTP3 exemplarisch in Abbildung 30 dargestellt.

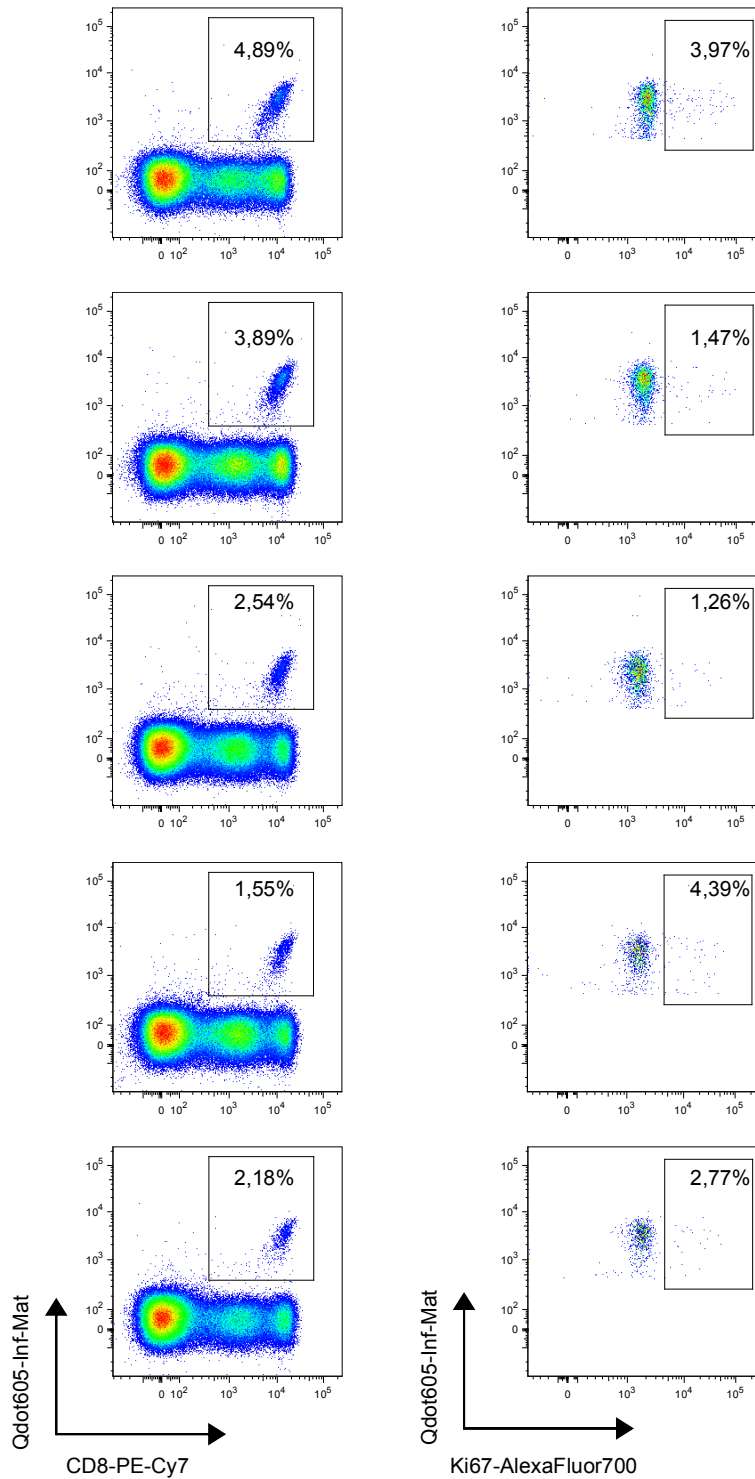


Abbildung 30: FACS-Dotplots für RTP3: Von oben nach unten sind die Zeitpunkte A, B, C, D und E gezeigt. Linke Spalte: Identifizierung der für Influenza-Matrixprotein spezifischen, CD8-positiven Zellen im Bereich der CD4-negativen Zellen (Angaben in % der lebenden CD8-positiven Lymphozyten); Rechte Spalte: Identifizierung der Proliferationsrate der Inf-Mat-spezifischen Zellen (Angaben in % der Inf-Mat-spezifischen, lebenden CD8-positiven Lymphozyten).

3.8.4. Apoptose und Nekrose der Virus-spezifischen CD8-positiven Zellen

Bei den Untersuchungen für Apoptose und Nekrose unter den Virus-spezifischen Zellen konnten lediglich für die EBV-LMP2-spezifischen, CD8-positiven Lymphozyten signifikante Ergebnisse gewonnen werden, die in Abbildung 31 gezeigt sind. Für die übrigen Virus-spezifischen Zellen (CMV-pp65, EBV-BMLF1 und Inf-Mat) wurden keine Veränderungen im Zellüberleben gefunden (Daten nicht gezeigt).

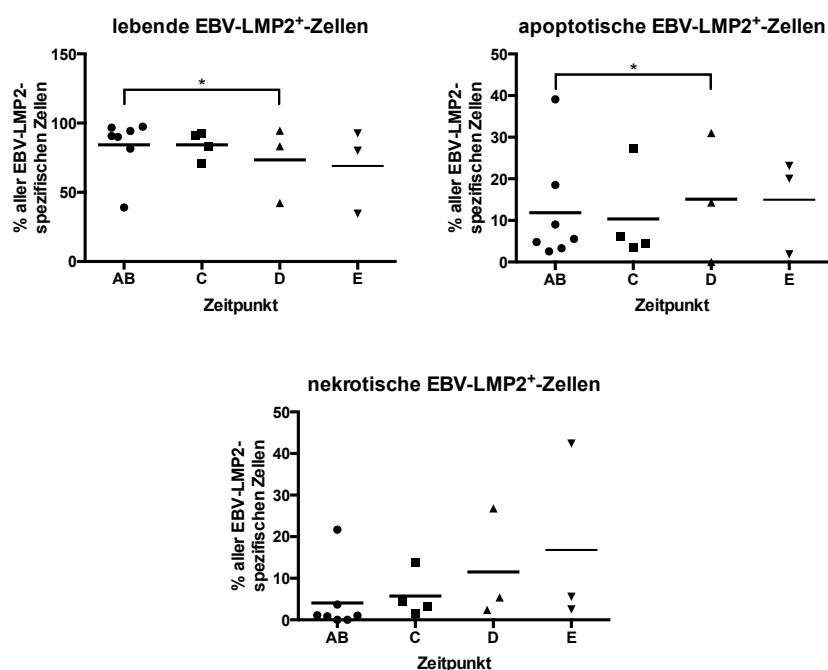


Abbildung 31: Verlauf der Zellviabilität für EBV-LMP2-spezifische CD8-positive Zellen. Der Anteil der lebenden Zellen (oben links) nahm beim Vergleich der Zeitpunkte AB und D von durchschnittlich 84,25 % auf 73,40 % ab ($p = 0,041$; $n = 3$), die apoptotischen Zellen (oben rechts) nahmen im Gegenzug von 11,84 % auf 15,10 % zu ($p = 0,035$; $n = 3$). Bei den nekrotischen Zellen (unten) war kein signifikanter Unterschied erkennbar (AB: 4,05 %; D: 11,53 %). Gezeigt sind jeweils alle für das HLA-Multimer EBV-LMP2 positive Patienten mit mindestens 30 spezifischen Zellen am jeweiligen Zeitpunkt ($n = 7$, vgl. 2.9.) und deren Mittelwert.

In Anbetracht dessen, dass die T-Tests für den Vergleich der Zeitpunkte AB und D nur mit drei Spendern durchgeführt werden konnten, wurden die hier gewonnenen Erkenntnisse in der weiteren Interpretation nicht mehr betrachtet.

3.8.5. Differenzierung der Virus-spezifischen CD8-positiven Zellen

Ebenso wie bei der Gesamtheit der CD8-positiven Zellen stellten sich auch bei den Virus-spezifischen CD8-positiven Zellen keine Veränderungen der verschiedenen Zelldifferenzierungsstufen ein. Interessant war jedoch die von vorn herein unterschiedliche Zusammensetzung der verschiedenen Differenzierungsstufen der CD8-positiven Zellen (siehe 3.7.3.) bei verschiedenen Virus-Spezifitäten, die exemplarisch zum Zeitpunkt AB in Abbildung 32 dargestellt sind. Aus diesen Ergebnissen lassen sich jedoch keine Aussagen über die Auswirkungen der RT beim Prostatakarzinom auf das Immunsystem ableiten, sodass sie hier lediglich zusätzlich gezeigt werden. Darüber hinaus basiert die Analyse auf teilweise sehr geringen Patientenzahlen, sodass für eine valide Aussage weitere Tests durchgeführt werden müssten.

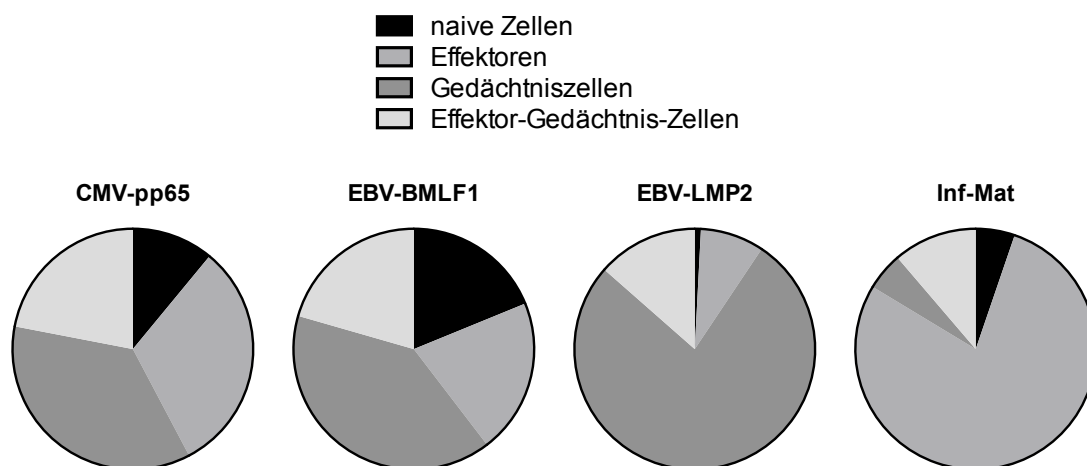


Abbildung 32: Zusammensetzung der Virus-spezifischen CD8-positiven Lymphozyten, gezeigt ist der Mittelwert des Zeitpunkts AB aus Färbung 3 aller Patienten, die für das entsprechende HLA-Peptid-Multimer positiv waren mit mindestens 30 spezifischen Zellen (vgl. 2.9.). CMV-pp65 (n = 8): 10,98 % naive Zellen, 31,28 % differenzierte Effektoren, 35,76 % Gedächtniszellen und 21,97 % Effektor-Gedächtniszellen; EBV-BMLF1 (n = 16): 18,82 % naive Zellen, 20,78 % differenzierte Effektoren, 39,85 % Gedächtniszellen und 20,55 % Effektor-Gedächtniszellen; EBV-LMP2 (n = 6): 0,82 % naive Zellen, 8,56 % differenzierte Effektoren, 77,12 % Gedächtniszellen und 13,53 % Effektor-Gedächtniszellen; Inf-Mat (n = 1): 5,25 % naive Zellen, 78,45 % differenzierte Effektoren, 5,09 % Gedächtniszellen und 11,27 % Effektor-Gedächtniszellen.

3.9. Zellfunktion

3.9.1. Allgemein

In Abschnitt 3.3. ist in Tabelle 16 gezeigt, für welche Patienten und gesunde Spender die intrazellulären Zytokinfärbungen mit welchen Stimulanzen durchgeführt wurden. Als Stimulationsagens für die Positivkontrolle wurde SEB ausgewählt (siehe 3.1.4.), die Negativkontrolle erfolgte mit einem HIV-Peptid. Die Virus-spezifischen Ansätze wurden mit Peptiden entsprechend der HLA-Peptid-Multimere aus den Färbungen 2 und 3 stimuliert.

Um die Basisproduktion an Zytokinen der verschiedenen Zellen herauszurechnen wurde von allen Ergebnissen für die Stimulation mit SEB, CMV-pp65, EBV-BMLF1, EBV-LMP2 und Influenza-Matrixprotein das Ergebnis der Stimulation mit dem HIV-Peptid des gleichen Zeitpunkts des jeweiligen Patienten oder Spenders subtrahiert (siehe folgende Formel).

$$\begin{aligned} & \text{Gesamtprozentzahl zytokinproduzierender Zellen}_{SEB/CMV-pp65/EBV-BMLF1/EBV-LMP2/Inf-Mat} \\ & - \text{Prozentzahl zytokinproduzierender Zellen}_{HIV} \\ & = \text{Prozentzahl zytokinproduzierender Zellen durch die jeweilige Stimulation} \end{aligned}$$

Die Auswertung erfolgte für CD4- und CD8-positiven Zellen leicht unterschiedlich bezüglich der analysierten Zytokine:

Tabelle 21: Übersicht über die Auswertungen bezüglich der Zytokinproduktion für CD4- und CD8-positive, lebende Lymphozyten.

CD4-positive Zellen	CD8-positive Zellen
<ul style="list-style-type: none"> • IL-2 • IL-5 • IL-10 • IL-17 • IFN-γ • TNF-α 	<ul style="list-style-type: none"> • IL-2 • IL-10 • IFN-γ • TNF-α • zusätzlich CD107a als Sekretionsmarker (für IFN-γ)

3.9.2. Stimulation mit SEB

Der prozentuale Anteil der Zytokin-produzierenden CD4-positiven Zellen änderte sich für IL-2, IL-5, IL-10 und TNF- α über den Verlauf der Radiotherapie nicht (verglichen wurden die Zeitpunkte AB vs. D, AB vs. E, sowie D vs. E). Für IL-17 konnte ein Anstieg der Zytokin-produzierenden Zellen von 0,05 % bei Zeitpunkt AB auf 0,10 % bei Zeitpunkt E gezeigt werden ($p = 0,032$; $n = 7$). Bei der Untersuchung von IFN- γ -produzierenden Zellen wurde ebenfalls ein signifikanter Anstieg von 0,96 % bei Zeitpunkt AB auf 1,68 % bei Zeitpunkt E ($p = 0,004$; $n = 7$) beobachtet. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 33 (oben).

Die Anteile der CD8-positiven Lymphozyten für die Produktion verschiedener Zytokine (IL-2, IL-10, IFN- γ und TNF- α) änderten sich durch die Bestrahlung nicht. Mit CD107a als Degranulationsmarker [167] wurde zusätzlich die Zytokinsekretion untersucht. Auch hier konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden.

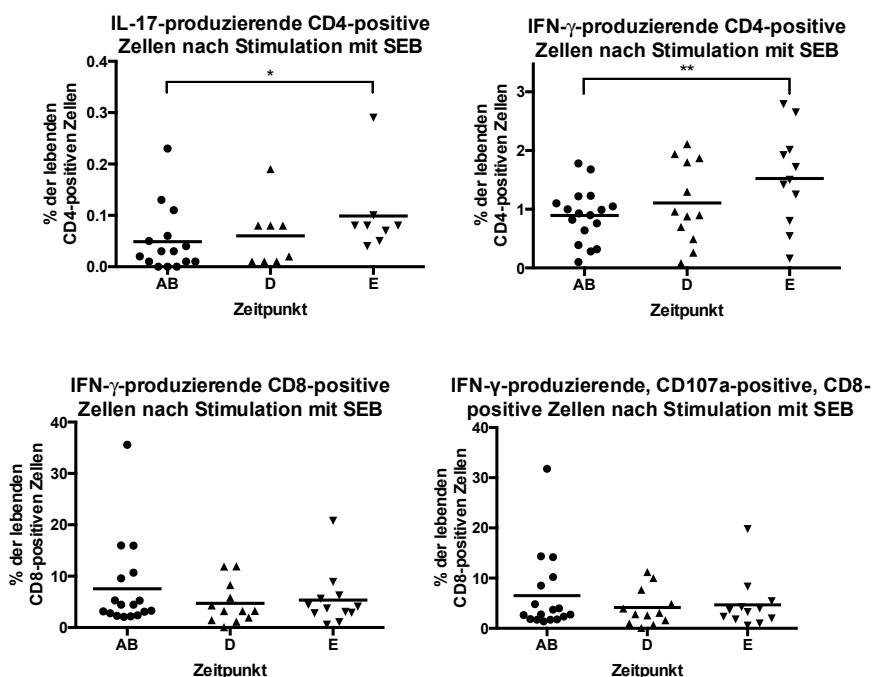


Abbildung 33: Oben links: Anteil der IL-17-produzierenden, CD4-positiven Lymphozyten mit einem Anstieg vom Zeitpunkt AB zum Zeitpunkt E. Oben rechts: Produktion von IFN- γ durch CD4-positive Zellen nach Stimulation mit SEB. Dabei zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg von Zeitpunkt AB zu E. Unten links: Keine Veränderung durch die Bestrahlung bei der Betrachtung der IFN- γ -Produktion durch CD8-positive Zellen. Unten rechts: Die Anzahl der IFN- γ -produzierenden Zellen mit gleichzeitiger Exozytose von zytotoxischen Granula (detektiert über das membranständige CD107a-Antigen; Phänotyp: CD8⁺IFN- γ ⁺CD107a⁺) änderte sich durch die Bestrahlung nicht. Gezeigt sind jeweils alle Patienten ($n = 16$) und der Mittelwert.

3.9.3. Stimulation mit CMV-pp65

Für die Zellen, die nach Stimulation mit dem Peptid CMV-pp65 Zytokine produzierten, ergaben sich durch die RT keinerlei Unterschiede (n = 6). Weder die zytokinproduzierenden CD4-positiven Zellen (IL-2, IL-5, IL-10, IL-17, IFN- γ und TNF- α) noch die entsprechenden CD8-positiven Zellen (IL-2, IL-10, IFN- γ und TNF- α) zeigten Veränderungen beim Vergleich der Zeitpunkte AB vs. D und AB vs. E.

3.9.4. Stimulation mit EBV-BMLF1

Auch nach Stimulation mit dem EBV-BMLF1-Peptid traten - ebenso wie bei CMV-pp65 (siehe 3.9.3.) - keine Veränderungen bei den Zytokinproduzierenden Zellen auf (n = 10).

3.9.5. Stimulation mit EBV-LMP2

Ein ICS mit Stimulation mit dem EBV-LMP2-Peptid wurde nur bei drei Patienten durchgeführt, sodass die Ergebnisse statistisch nicht verwertbar waren. Tendenziell zeigte sich ein leichter Anstieg von IFN- γ - und TNF- α -produzierenden CD4- und CD8-positiven Lymphozyten über den Bestrahlungsverlauf (AB vs. D). Um dies zu bestätigen müssten weitere Tests mit mehr Patienten durchgeführt werden.

3.9.6. Stimulation mit Influenza-Matrixprotein

Eine für das Peptid aus dem Influenza-Matrixprotein spezifische Intrazellulärfärbung nach Stimulation wurde nur bei zwei Patienten durchgeführt und ließ keine statistisch sinnvollen Schüsse über die Anzahl der Zytokinproduzierenden oder -sekretierenden Lymphozyten zu. Auch hier wären weitere Untersuchungen vonnöten um eventuelle Veränderungen zu detektieren.

3.9.7. Stimulation mit HIV (Negativkontrolle)

Betrachtet man die Verläufe der Zytokinproduzierenden Zellen in der mit einem HIV-Peptid stimulierten Negativkontrolle und somit die Basis-Zytokinproduktion, ergaben sich für die CD4- und CD8-positiven Zellen keine Veränderungen bezüglich der Produktion der untersuchten Zytokine (n = 16).

3.9.8. Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem ICS

Die einzige erkennbare Veränderung lag in einer vermehrten Produktion von IL-17 und IFN- γ durch CD4-positive Zellen drei Monate nach Bestrahlungsende (Zeitpunkt E) im Vergleich zum Ausgangswert nach Stimulation mit SEB (siehe 3.9.2. und Abbildung 33). Keine Veränderungen konnten gezeigt werden für die Zytokine IL-2, IL-5, IL-10 und TNF- α bei der Stimulation mit SEB und für alle untersuchten Zytokine nach Stimulation mit den Virus-spezifischen Peptiden. Auch die Zytotoxizitätseigenschaften der CD8-positiven Lymphozyten (detektiert über den Degranulationsmarker CD107a) wurden durch die RT nicht beeinträchtigt.

Bei Betrachtung der Negativkontrolle (Stimulation mit einem HIV-Peptid) wurden über den Bestrahlungsverlauf keine Veränderungen sowohl bei den CD4-, als auch bei den CD8-positiven Zellen festgestellt (siehe 3.9.7.).

3.10. PSA-Verläufe und klinische Daten der Patienten

3.10.1. Übersicht

Tabelle 22: Übersicht über die klinischen Daten der Patienten. Legende: RTP: Patient; ED: Erstdiagnose des Tumors; RT: Informationen zur Bestrahlung; HAT: Dauer der Hormon-ablativen Therapie; PSA-Werte: im Beobachtungszeitraum bestimmte PSA-Werte in ng/ml; BE: Blutentnahmezeitpunkte. In der RT-Spalte ist ebenfalls angegeben, ob die Patienten eine lokale Steroidtherapie am Enddarm aufgrund von Nebenwirkungen der Bestrahlung erhielten.

RTP	ED	Tumordaten	RT	HAT	PSA-Werte	BE
1	01/2011	cT1c cN0 cM0 Gleason: 3+4 = 7b intermediate risk	07.06. - 02.08.2011 Prostata + Samenblasen (78Gy)	03/2011 - 09/2011	01/2011: 5,36 06/2011: 1,20 10/2011: 0,01 01/2012: 0,90 08/2012: 0,88	23.05.2011 (A) 24.05.2011 (B) 29.06.2011 (C) 02.08.2011 (D) 04.11.2011 (E)
2	11/2010	cT2c cN0 cM0 Gleason: 3+3 = 6 intermediate risk	04.05. - 28.06.2011 Prostata + Samenblasen (74Gy)	11/2010 - 07/2011	11/2010: 5,00 02/2011: 0,18 07/2011: 0,18 09/2011: 0,33 03/2012: 0,23 06/2012: 0,17	18.04.2011 (A) 19.04.2011 (B) 01.06.2011 (C) 28.06.2011 (D) 30.09.2011 (E)
3	02/2011	cT3b cN0 cM0 Gleason: 4+4 = 8 high risk	05.07. - 24.08.2011 Prostata + Samenblasen (74Gy) pelviner Lymphabfluss (50,4Gy) Gynäkomastieprophylaxe (12Gy)	ab 04/2011 für 2 - 3 Jahre	02/2011: 8,02 11/2011: 0,23 05/2012: 0,02	16.06.2011 (A) 22.06.2011 (B) 25.07.2011 (C) 22.08.2011 (D) 18.11.2011 (E)
5	01/2011	cT3a cN0 cM0 Gleason: 4+3 = 7b high risk	23.05. - 13.07.2011 Prostata + Samenblasen (70Gy) pelviner Lymphabfluss (50,4Gy) Gynäkomastieprophylaxe (12Gy)	ab 02/2011 für 2 - 3 Jahre	12/2010: 34,50 10/2011: 0,17 08/2012: 0,03	23.05.2011 (AB) 21.06.2011 (C) 13.07.2011 (D) 14.10.2011 (E)
6	03/2011	cT2b cN0 cM0 Gleason: 3+3 = 6 intermediate risk	04.07. - 25.08.2011 Prostata + Samenblasen (78Gy)	keine	03/2011: 10,72 09/2011: 4,89 11/2011: 2,76 03/2012: 1,20 08/2012: 0,81	04.07.2011 (AB) 30.07.2011 (C) 25.08.2011 (D) BE E verweigert (25.11.2011)

RTP	ED	Tumordaten	RT	HAT	PSA-Werte	BE
7	03/2011	cT2c cN0 cM0 Gleason: 3+4 = 7 intermediate risk	14.07. - 06.09.2011 Prostata + Samenblasen (78Gy)	03/2011 - 09/2011	03/2011: 12,10 03/2011: 8,00 04/2011: 8,40 05/2011: 7,50 03/2012: 0,01	27.06.2011 (A) 29.06.2011 (B) 11.08.2011 (C) 09.09.2011 (D) 16.12.2011 (E)
8	05/2011	cT3a/cT4a cN0 cM0 Gleason: 4+4 = 8 high risk	22.08. - 14.10.2011 Prostata + Samenblasen (78Gy) pelviner Lymphabfluss (50,4Gy) Gynäkomiastieprophylaxe (12Gy) zusätzliche Steroidtherapie	ab 06/2011 für 2 - 3 Jahre	03/2011: 10,56 04/2011: 11,06 08/2011: 0,99 12/2011: 0,01 03/2012: < 0,01	09.08.2011 (A) 22.08.2011 (B) 14.09.2011 (C) 13.10.2011 (D) 13.03.2012 (E)
9	04/2011	cT3 cN0 cM0 Gleason: 3+3 = 6 high risk	26.07. - 13.09.2011 Prostata + Samenblasen (70Gy) pelviner Lymphabfluss (50,4Gy) Gynäkomiastieprophylaxe (12Gy) zusätzliche Steroidtherapie	Orchiekto- mie 04/2011	03/2011: 22,00 12/2011: 0,03	26.07.2011 (AB) 18.08.2011 (C) 16.09.2011 (D) 14.12.2011 (E)
11	03/2011	cT1c cN0 cM0 Gleason: 3+4 = 7a / 3+3 = 6 intermediate risk	08.08. - 30.09.2011 Prostata + Samenblasen (78Gy)	04/2011 - 10/2011	03/2011: 7,40 01/2012: 0,04 07/2012: 0,03	08.08.2011 (AB) 09.09.2011 (C) 30.09.2011 (D) 10.01.2012 (E)
12	02/2011	cT3a cN0 cM0 Gleason: 4+4 = 8 high risk biochemisches Rezidiv (Februar 2012)	30.08. - 20.10.2011 Prostata + Samenblasen (74Gy) zusätzliche Steroidtherapie	ab 04/2011 für 2 - 3 Jahre	12/2010: 4,75 01/2011: 7,53 02/2011: 5,68 04/2011: 6,64 05/2011: 2,64 11/2011: 1,49 02/2012: 2,90 05/2012: 4,30 08/2012: 5,00 11/2012: 5,10 02/2013: 5,02	30.08.2011 (AB) 23.09.2011 (C) 27.10.2011 (D) 27.01.2012 (E)
13	03/2011	cT2c cN0 cM0 Gleason: 3+4 = 7a intermediate risk	12.09. - 07.11.2011 Prostata + Samenblasen (78Gy)	06/2011 - 12/2011	02/2007: 3,42 10/2010: 5,08 11/2010: 6,44 01/2011: 7,30 02/2011: 8,90 01/2012: 0,03 10/2012: 0,20	14.09.2011 (AB) 10.10.2011 (C) 07.11.2011 (D) 10.02.2012 (E)
14	08/2011	cT1c/cT2a cN0 cM0 Gleason: 3+3 = 6 low risk	08.11.2011 - 02.01.2012 Prostata + Samenblasen (78 Gy) Z.n. RT eines Nierenzellkarzinoms mit ossären Metastasen bis 50 Gy (1994)	keine	06/2011: 5,92 08/2011: 7,59 08/2011: > 10,00 03/2012: 1,50	08.11.2011 (AB) 06.12.2011 (C) 02.01.2012 (D) 08.05.2012 (E)
15	07/2011	cT2c cN0 cM0 Gleason: 4+4 = 8 high risk	14.11.2011 - 09.01.2012 Prostata + Samenblasen (78Gy) pelviner Lymphabfluss (50,4Gy) Gynäkomiastieprophylaxe (12Gy)	ab 08/2011 für 2 - 3 Jahre	04/2011: 13,30 06/2011: 11,70 02/2012: 0,09 04/2012: 0,06 07/2012: 0,03	14.11.2011 (AB) 07.12.2011 (C) 09.01.2012 (D) 13.04.2012 (E)
16	07/2011	cT2a cN0 cM0 Gleason: 3+4 = 7 intermediate risk	30.11.2011 - 25.01.2012 Prostata + Samenblasen (78Gy)	keine	06/2011: 5,43 10/2011: 4,76 03/2012: 1,91 06/2012: 1,44 10/2012: 1,06	01.12.2011 (AB) 27.12.2011 (C) 25.01.2012 (D) 24.05.2012 (E)
18	05/2011	cT2 cN0 cM0 Gleason: 3+4 = 7a high risk	12.12.2011 - 06.02.2012 Prostata + Samenblasen (78Gy)	05/2011 - 02/2012	05/2011: 25,24 04/2012: 0,05 05/2012: 0,05	12.12.2011 (AB) 10.01.2012 (C) 06.02.2012 (D) 04.05.2012 (E)
19	09/2011	cT2a pN0 cM0 Gleason: 3+4 = 7a intermediate risk	03.01. - 27.02.2012 Prostata + Samenblasen (78Gy)	keine	09/2011: 5,07 12/2011: 6,00 05/2012: 1,20	04.01.2012 (AB) 31.01.2012 (C) 27.02.2012 (D) 22.05.2012 (E)
20	08/2011	cT1c pN0 cM0 Gleason: 3+3 = 6 intermediate risk	11.01. - 05.03.2012 Prostata + Samenblasen (78Gy)	10/2011 - Ende 2012	06/2011: 12,54 07/2011: 9,13 08/2011: 12,60 07/2012: 0,01 03/2013: 0,25	11.01.2012 (AB) 07.02.2012 (C) 05.03.2012 (D) 03.08.2012 (E)

RTP	ED	Tumordaten	RT	HAT	PSA-Werte	BE
21	08/2011	cT2 cN0 cM0 Gleason: 5+4 = 9 high risk	23.01. - 15.03.2012 Prostata + Samenblasen (78Gy) Gynäkomastieprophylaxe (12Gy) zusätzliche Steroidtherapie	ab 10/2011 für 2 - 3 Jahre	10/2010: 4,98 05/2011: 8,56 06/2011: 9,28 11/2011: 0,39 01/2012: 0,21 04/2012: 0,06 06/2012: 0,04	23.01.2012 (AB) 16.02.2012 (C) 15.03.2012 (D) 22.06.2012 (E)
23	06/2011	cT2a cN0 cM0 Gleason: 3+3 = 6 intermediate risk	20.02. - 12.04.2012 Prostata + Samenblasen (74Gy)	12/2011 - 03/2012	06/2010: 9,54 04/2011: 77,90 05/2011: 9,54 07/2012: 0,12	20.02.2012 (AB) 16.03.2012 (C) 12.04.2012 (D) 27.07.2012 (E)
24	10/2011	cT3a cN0 cM0 Gleason: 4+4 = 8 high risk	06.03. - 02.05.2012 Prostata + Samenblasen (78Gy)	12/2011 - 05/2012	09/2011: 5,30 08/2012: 0,04	06.03.2012 (AB) 29.03.2012 (C) 02.05.2012 (D) 03.08.2012 (E)
25	12/2011	cT2c cN0 cM0 Gleason: 4+3 = 7 intermediate risk	14.03. - 10.05.2012 Prostata + Samenblasen (78Gy) zusätzliche Steroidtherapie	02/2012 - 07/2012	09/2011: 3,80 12/2011: 4,80 06/2012: 0,07	14.03.2012 (AB) 11.04.2012 (C) 10.05.2012 (D) 21.08.2012 (E)

3.10.2. Zusammenfassung der PSA-Verläufe

Bei Patienten ohne HAT (RTP 6, 14, 16 und 19; n = 4) stellte sich nach RT-Ende ein PSA-Wert von $1 \pm 0,5$ ng/ml ein. Dies ist als ein alleiniger Effekt der Bestrahlung zu werten, jedoch war der Großteil des Abfalls immer erst nach Abschluss der RT zu verzeichnen, was der klinischen Erfahrung nach normal ist. Erfolgte eine HAT (n = 17) - bei den meisten Patienten mit LHRH-Analoga, bei einem Patienten (RTP 9, siehe Tabelle 22) durch bilaterale Orchiectomie - lagen die PSA-Werte während der Therapie bei 0,01 - 0,39 ng/ml mit Ausnahme zweier Patienten: Bei RTP7 fiel der PSA-Wert erst nach Ende der HAT auf 0,01 ng/ml ab, bei RTP12 wurde relativ schnell ein biochemisches Rezidiv diagnostiziert (erneuter PSA-Anstieg ohne sichtbaren Tumor). Nach Ende der HAT stellte sich der PSA-Wert bei den verbleibenden 15 Patienten zwischen 0,04 und 0,88 ng/ml ein.

3.11. Unterschiede zwischen den verschiedenen Therapiegruppen

3.11.1. Allgemeines Vorgehen

Die klinischen Daten der Patienten, anhand derer die unterschiedlichen Therapien erkannt werden können, sind in Tabelle 22 unter 3.10.1. aufgeführt. Insgesamt wurden bezüglich drei verschiedenen Aspekten Therapiegruppen gebildet und verglichen:

1. unterschiedliche RT, da manche Patienten eine erweiterte Bestrahlung des pelvinen Lymphabflusses zusätzlich zur RT der Prostatalege erhielten (siehe 3.11.2.)
2. Durchführung einer Hormon-ablativen Therapie (HAT), da bei einigen Patienten eine solche nicht durchgeführt wurde (siehe 3.11.3.)
3. Anwendung von lokalen Steroiden am Enddarm, die aufgrund von lokalen Nebenwirkungen der RT bei manchen Patienten notwendig war (siehe 3.11.4.)

Für die statistischen Tests für die Vergleiche wurden ungepaarte, zweiseitige Student's T-Tests verwendet (siehe auch 2.9.). In den Grafiken sind grundsätzlich die Einzel- bzw. Mittelwerte der verschiedenen Gruppen mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) eingetragen. Die Ergebnisse aus dem Vergleich der einzelnen Zeitpunkte aller Patienten miteinander finden sich unter 3.4. bis 3.9. bzw. in den Abbildungen 17 bis 33.

3.11.2. Unterschiedliche Radiotherapie

Die Standard-Bestrahlung von Prostata und Samenblasen erfolgte in der Regel mit 78 Gy (vier Patienten erhielten nur 74 Gy, bei zwei Patienten wurde nur mit 70 Gy bestrahlt). Fünf der 21 in die Studie eingeschlossenen Patienten (RTP3, RTP5, RTP8, RTP9 und RTP15) erhielten zusätzlich zur Standard-RT (s.o.) aufgrund der bei ihnen vorliegenden Hochrisikosituation und des damit verbundenen Risikos für einen Lymphknotenbefall im Beckenbereich eine zusätzliche Bestrahlung der pelvinen Lymphabflusswege mit 50,4 Gy (hier als erweiterte RT bezeichnet). Dabei ließen sich folgende Differenzen zwischen den beiden Radiotherapie-Gruppen beobachten:

Nachdem sich für die Zeitpunkte AB, C und D keine Unterschiede ergaben, hatten die Patienten mit zusätzlicher Becken-RT am Zeitpunkt E prozentual gesehen signifikant mehr CD3⁺CD19⁻-NK-Zellen (52,70 % vs. 34,20 %; $p = 0,017$; $n_{\text{erweitert}} (n_e) = 5$; $n_{\text{Standard}} (n_s) = 10$). Bezüglich der CD25-positiven CD4-positiven Lymphozyten (CD4-positive Effektorzellen und T_{reg}-Zellen) hatten beide Gruppen einen zunächst ähnlichen Ausgangswert von 3,43 % (Standard-RT) bzw. 4,48 % (zusätzliche Beckenbestrahlung). Die Werte unterschieden sich zu den folgenden Zeitpunkten C (3,37 % vs. 5,22 %; $p = 0,040$; $n_s = 15$; n_e

= 5), D (3,85 % vs. 7,53 %; $p = 0,014$; $n_S = 13$; $n_e = 5$) und E (3,29 % vs. 6,01 %; $p = 0,026$; $n_S = 10$; $n_e = 5$) jeweils signifikant voneinander, wobei die Zellen der Patienten mit der erweiterten Bestrahlung durchweg vermehrt den CD25-Marker exprimierten. Bei der alleinigen Betrachtung der regulatorischen T-Zellen (Phänotyp $CD3^+CD19^-CD4^+CD8^-CD25^+Foxp3^+$) konnten am Zeitpunkt D (5,40 % vs. 8,43 %; $p = 0,010$; $n_S = 13$; $n_e = 5$) und am Zeitpunkt E (5,02 % vs. 7,73 %; $p = 0,027$; $n_S = 10$; $n_e = 5$) mehr Zellen bei den Patienten mit zusätzlicher Becken-RT gezeigt werden. In der Differenzierung der CD4-positiven Zellen fanden sich am Zeitpunkt E mit 14,59 % vs. 7,17 % signifikant mehr naive Zellen bei den Patienten mit Bestrahlung des pelvinen Lymphabflusses ($p = 0,007$; $n_e = 4$; $n_S = 9$).

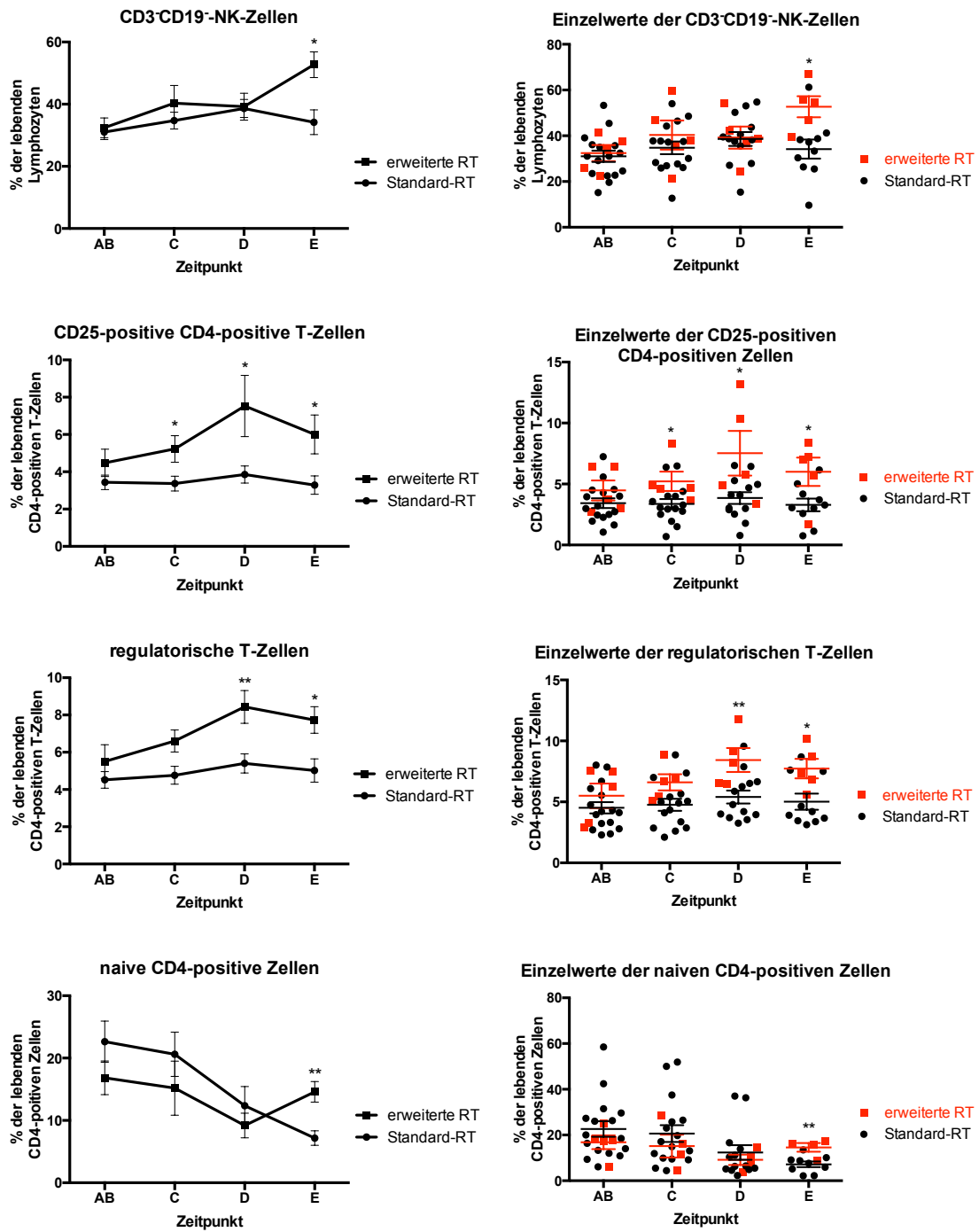


Abbildung 34: Veränderung der Lymphozyten-Subpopulationen im Vergleich der zwei RT-Gruppen (Standard-RT: n = 16; erweiterte RT: n = 5). In der linken Spalte finden sich die Mittelwerte mit den SEM (Standardfehler des Mittelwerts) der jeweiligen Therapiegruppen, in der rechten Spalte sind die Einzelwerte der Patienten mit dem Mittelwert und dem SEM zu sehen. 1. Zeile: Ähnlicher Verlauf der NK-Zellen über die Zeitpunkte AB, C und D mit signifikantem Unterschied bei Zeitpunkt E. 2. Zeile: Verlauf der CD25-positiven CD4-positiven T-Zellen. Zum Zeitpunkt AB war kein signifikanter Unterschied nachweisbar, signifikante Unterschiede fanden sich zu den Zeitpunkten C, D und E. 3. Zeile: Bei den T_{reg} -Zellen war zu den Zeitpunkten D und E ein Unterschied zu erkennen, wobei die Patienten mit zusätzlicher Becken-RT einen höheren Anteil an T_{reg} -Zellen aufwiesen. 4. Zeile: Signifikanter Unterschied bei Zeitpunkt E bei den naiven CD4-positiven Zellen.

Bezüglich der Zellviabilität ergaben sich am Zeitpunkt E ebenfalls Unterschiede zwischen den beiden RT-Gruppen. Interessanterweise hatten die Patienten mit dem erweiterten Bestrahlungsfeld drei Monate nach Therapieende mehr lebende und jeweils weniger apoptotische und nekrotische CD4-positive Zellen als die Patienten mit Standard-RT (siehe Abbildung 35). Bei den vorausgehenden Zeitpunkten zeigten die statistischen Tests keine Unterschiede.

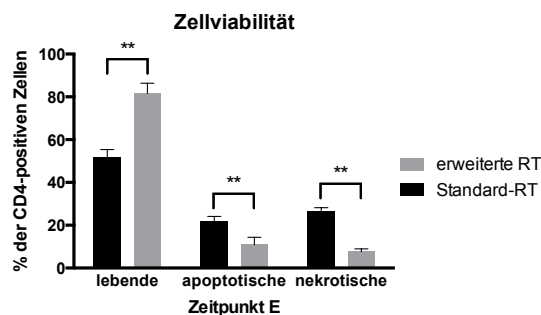


Abbildung 35: Unterschiede in der Zellviabilität der CD4-positiven Lymphozyten bezüglich der zwei verschiedenen RT-Gruppen (Standard-RT: $n = 16$; erweiterte RT: $n = 5$) am Zeitpunkt E. Die Patienten mit Becken-RT hatten mit 81,53% vs. 51,76% mehr lebende ($p = 0,003$; $n_e = 3$; $n_S = 7$), mit 10,86% vs. 21,99% weniger apoptotische ($p = 0,039$; $n_e = 3$; $n_S = 7$) und mit 7,63% vs. 26,38% auch weniger nekrotische ($p < 0,001$; $n_e = 3$; $n_S = 7$) Zellen. Gezeigt sind die jeweiligen Mittelwerte mit SEM der Patientengruppen.

Aus dem ICS konnte nur ein relevanter Unterschied der beiden unterschiedlichen RT-Gruppen abgeleitet werden: Nach der Stimulation mit SEB zeigte sich für die Patienten mit dem erweiterten Bestrahlungsfeld eine erhöhte Rate an IL-2-produzierenden CD4-positiven Zellen am Zeitpunkt E (9,06 % vs. 5,80 %; $p = 0,006$; $n_e = 3$; $n_S = 5$; Daten nicht gezeigt). Des Weiteren lieferten die statistischen Tests verwertbare Unterschiede für die beiden Therapiegruppen beim ICS nach Stimulation mit dem EBV-Peptid BMLF1. Diese fanden sich jedoch beim Zeitpunkt AB und sind somit nicht auf den unterschiedlichen Bestrahlungsmodus zurück zu führen (IL-2-produzierende CD4-positive Zellen waren bei Patienten mit Becken-RT (0,01 % vs. 0,001 %; $p = 0,010$; $n_e = 2$; $n_S = 7$) und TNF- α -produzierende CD8-positive Zellen waren in der Standard-RT-Gruppe (0,18 % vs. 0,02 %; $p = 0,024$; $n_S = 7$; $n_e = 2$) häufiger vertreten).

3.11.3. Hormon-ablative Therapie (HAT)

Nicht alle Patienten wurden mit einer HAT behandelt, sodass auch hier zwei Therapiegruppen gebildet und verglichen werden konnten. Insgesamt erhielten 17 Patienten eine HAT, bei den verbleibenden vier Patienten war diese entweder nicht indiziert (bei einem PCa mit niedrigem Risiko) oder sie wurde von den Patienten abgelehnt. Die HAT wurde bei Tumoren mit mittlerem Risiko in der Regel für sechs Monate, bei Hochrisikotumoren für zwei bis drei Jahre durchgeführt. Einen Überblick über die HAT der Patienten bietet Abbildung 36, sowie die Tabelle 22 unter 3.10.1.

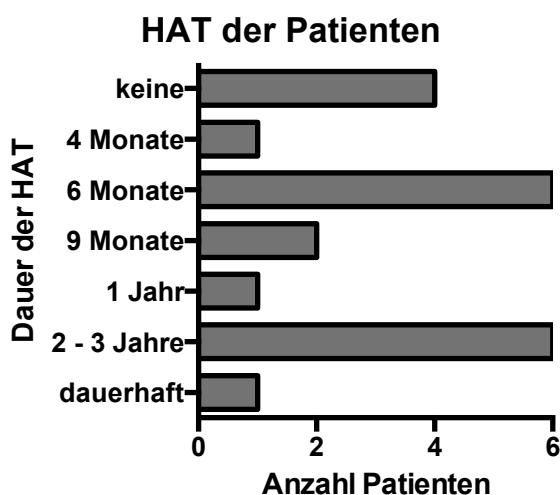


Abbildung 36: Übersicht über die Hormon-ablative Therapie mit der jeweiligen Therapiedauer und den zugeordneten Patientenzahlen. Gezeigt ist eine Übersicht aller Patienten (n = 21).

Verglichen wurden lediglich die Gruppen HAT und keine HAT, da die Dauer der antiandrogenen Therapie zum Beobachtungszeitraum für alle Patienten, die eine solche Therapie bekamen, in etwa gleich lang war. Sie wurde bei 15 der 17 Patienten zwei bis vier Monate vor Beginn der Bestrahlung eingeleitet, bei einem Patienten erfolgte der HAT-Start nur einen Monat vor Bestrahlungsbeginn, ein weiterer Patient erhielt die HAT bereits seit sieben Monaten, als die RT begonnen wurde.

Unterschiede konnten nur für die Zelldifferenzierung bei den CD8-positiven Zellen und bei den EBV-BMLF1-spezifischen CD8-positiven Zellen für die

Differenzierung und die Proliferation festgestellt werden. Während sich für die Populationen der zentralen Gedächtniszellen und der Effektorgedächtniszellen keine Unterschiede ergaben, konnte bei den naiven CD8-positiven Zellen ein erhöhter Anteil zu den Zeitpunkten AB und C bei den Patienten mit HAT gezeigt werden. Dies ist möglicherweise eine Auswirkung der HAT, da die Hormontherapie bereits mehrere Monate vor Bestrahlungsbeginn angesetzt wurde (s.o.) und somit durch sie verursachte Unterschiede auch am Zeitpunkt AB bereits bestehen können. An den Zeitpunkten D und E bestand diesbezüglich kein Unterschied mehr zwischen den beiden Vergleichsgruppen. Von den hochdifferenzierten CD8-Effektorzellen ($CD45RA^+CD28^-$) lagen bei den Patienten unter HAT zu den Zeitpunkten C und E signifikant mehr vor (siehe Abbildung 37).

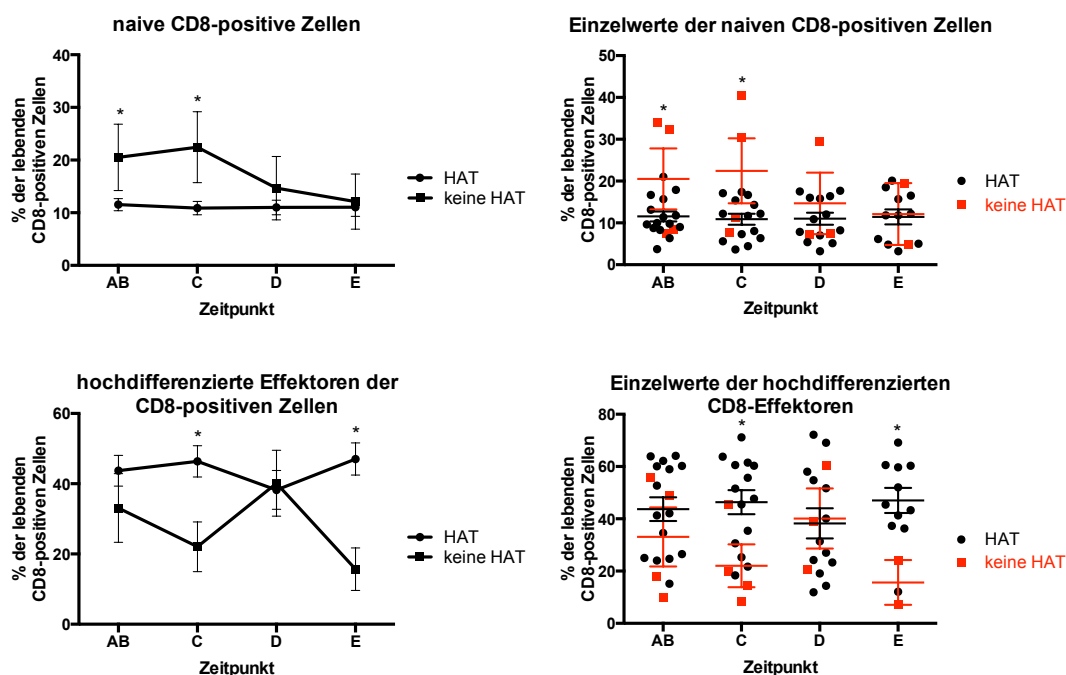


Abbildung 37: Unterschiedliche Differenzierungsstufen der CD8-positiven Zellen in den nach HAT unterschiedenen Therapiegruppen (HAT: $n = 17$; keine HAT: $n = 4$). In der linken Spalte finden sich die Mittelwerte mit den SEM der jeweiligen Therapiegruppen, in der rechten Spalte sind die Einzelwerte der Patienten mit dem Mittelwert und dem SEM zu sehen. Oben: Bei Patienten ohne HAT waren zunächst mehr naive Zellen vorhanden (Zeitpunkt AB: 20,52 % vs. 11,55 % mit $p = 0,046$, $n_{\text{ohne HAT}} (n_o) = 4$, $n_{\text{mit HAT}} (n_{\text{HAT}}) = 15$; Zeitpunkt C: 22,45 % vs. 10,89 % mit $p = 0,022$, $n_o = 4$, $n_{\text{HAT}} = 14$). Bei den Zeitpunkten D und E bestand kein Unterschied mehr. Unten: Bei den hochdifferenzierten Effektoren unterschieden sich die Therapiegruppen zu den Zeitpunkten C (HAT: 46,38 %; keine HAT: 22,05 %; $p = 0,023$; $n_{\text{HAT}} = 14$; $n_o = 4$) und E (HAT: 47,05 %; keine HAT: 15,67 %; $p = 0,024$; $n_{\text{HAT}} = 11$; $n_o = 2$) signifikant voneinander.

Bei der Betrachtung der Differenzierungsstufen der EBV-BMLF1-spezifischen, CD8-positiven Zellen konnten zum Zeitpunkt C ebenfalls mehr naive Zellen bei den Patienten ohne HAT erkannt werden (44,29 % vs. 13,79 %; $p = 0,034$; $n_o = 3$; $n_{HAT} = 11$; Daten nicht gezeigt). Am Zeitpunkt D hatten hier die Patienten ohne Hormontherapie außerdem mehr Effektorgedächtniszellen (48,50 % vs. 19,74 %; $p < 0,001$; $n_o = 2$; $n_{HAT} = 9$; Daten nicht gezeigt). Bezüglich der Proliferationsrate der untersuchten Zellgruppe zeigten die der Patienten ohne HAT einen späteren Anstieg, der in Abbildung 38 dargestellt ist.

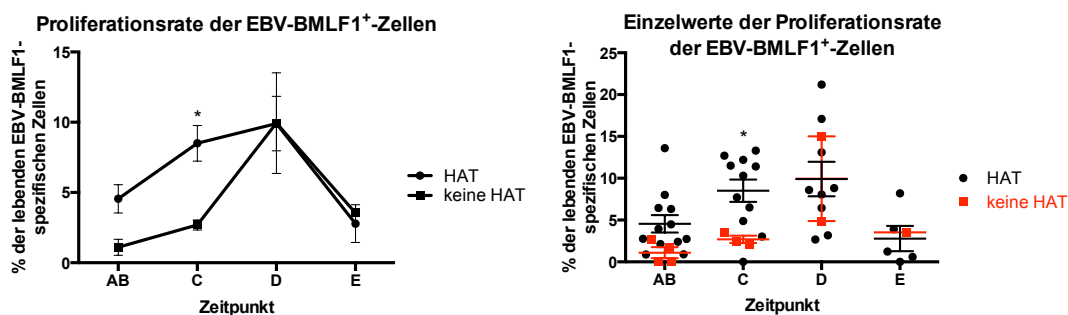


Abbildung 38: Übersicht über die Unterschiede in der Proliferationsrate der EBV-BMLF1-spezifischen CD8-positiven Zellen für die nach HAT unterschiedenen Therapiegruppen (HAT: $n = 12$; keine HAT: $n = 4$). Gezeigt ist jeweils der prozentuale Anteil an proliferierenden Zellen ($Ki67^+$) unter den lebenden HLA-Peptid-Multimer-positiven CD8-positiven Lymphozyten. Links finden sich die Mittelwerte mit den SEM der jeweiligen Therapiegruppen, rechts sind die Einzelwerte der Patienten mit dem Mittelwert und dem SEM zu sehen. Zum Zeitpunkt C lag die Proliferationsrate der Patienten mit Hormontherapie mit 8,50 % vs. 2,69 % ($p = 0,047$; $n_{HAT} = 11$; $n_o = 3$) bereits signifikant über der der Patienten ohne HAT. Am Zeitpunkt AB unterschieden sich die beiden Gruppen nicht, am Zeitpunkt D glichen sich die Werte ebenfalls wieder an. Beim Zeitpunkt E konnte nur ein Patient in der Gruppe ohne HAT getestet werden, sodass hier keine sichere Aussage möglich war.

Aufgrund zu wenig verwertbarer Ergebnisse in der Patientengruppe ohne HAT (ein ICS wurde nur für zwei der vier Patienten durchgeführt und dabei auch nicht für alle Zeitpunkte) konnten aus dem ICS keine verwertbaren Ergebnisse gewonnen werden. Allgemein ist die Interpretation der Ergebnisse aus dem Vergleich der Therapiegruppen bezüglich der HAT schwierig, da grundsätzlich 17 mit vier Patienten verglichen werden. Für exaktere Aussagen müssten mehr Tests mit einer ähnlichen Probandenzahl in den beiden Gruppen durchgeführt werden.

3.11.4. Auswirkungen einer lokalen Steroidtherapie am Enddarm

Bei entzündlichen Nebenwirkungen am Enddarm, die klassischerweise durch eine Bestrahlung der Prostataregion hervorgerufen werden können, wurde bei fünf Patienten die Steroid-haltige Creme Doloproct[®] lokal eingesetzt um die Inflammation einzudämmen. Sie enthält das Steroid Fluocortolonpivalat (0,1 %) und Lidocainhydrochlorid als Lokalanästhetikum (2 %) [168]. Da durch systemisch wirkende Steroide eine Beeinträchtigung des Immunsystems befürchtet werden muss, wurden die Patienten mit Steroidtherapie während der RT (n = 5) gegenüber den übrigen Patienten (n = 16) zu den Zeitpunkten AB, C und D bezüglich ihrer Lymphozytensubgruppen verglichen. Gleichzeitig bestand bei den Patienten, bei denen eine antiinflammatorische Therapie nötig war, auch ein erhöhtes Entzündungsniveau, das als Einflussfaktor auf das Immunsystem diskutiert werden sollte.

Ein Unterschied zeigte sich bei Betrachtung der B-Zellen unter den lebenden Lymphozyten am Zeitpunkt D, sowie bei der Proliferationsrate (definiert als Anteil der Ki67-positiven Zellen an der jeweiligen Population) der CD56-positiven Zellen unter den NK-Zellen (CD3⁺CD19⁻), ebenfalls am Zeitpunkt D (siehe Abbildung 39). Da die Steroidtherapie normalerweise gegen Ende der Bestrahlung durchgeführt wurde, waren auch lediglich am Zeitpunkt D Unterschiede zu erwarten.

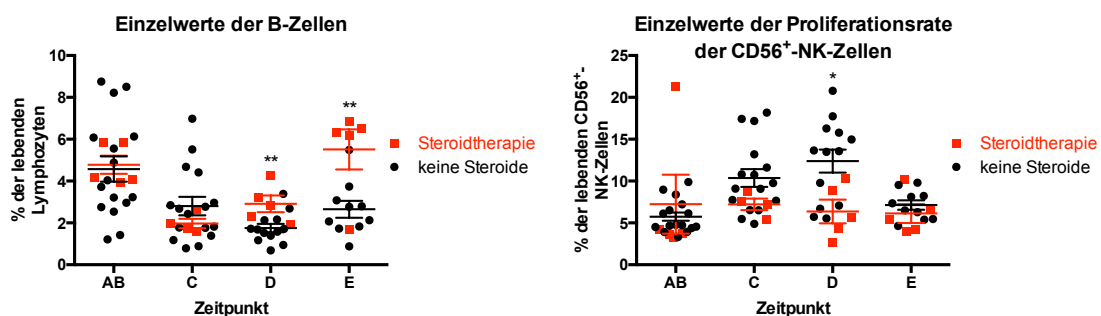


Abbildung 39: Vergleich der Patienten mit lokaler Steroidtherapie am Enddarm (n = 5) mit den übrigen Patienten (n = 16). Dargestellt sind die Einzelwerte der Patienten mit dem Mittelwert und dem SEM. Links: Veränderungen der B-Zellen unter den lebenden Lymphozyten. Bei den Zeitpunkten AB und C war kein Unterschied zwischen den zwei Gruppen feststellbar. Bei den Zeitpunkten D und E hatten die Patienten mit Steroidtherapie signifikant mehr B-Zellen (D: 2,91 % vs. 1,75 %, p = 0,011, n_{Steroide} (n_{Ster}) = 5, n_{keine Steroide} (n_k) = 13; E: 5,51 % vs. 2,65 %, p = 0,006, n_{Ster} = 5, n_k = 10). Da die Steroidtherapie am Zeitpunkt E bereits wieder beendet war wurde der Beobachtung nicht weiter nachgegangen. Rechts: Veränderungen der

Proliferationsrate (Anteil der Ki67-positiven Zellen) der CD56-positiven NK-Zellen. Hier ergab sich lediglich beim Zeitpunkt D ein signifikanter Unterschied, wobei die Patienten ohne Steroidtherapie mit 12,39 % vs. 6,36 % ($p = 0,024$; $n_k = 13$; $n_{Ster} = 5$) mehr proliferierende Zellen in dieser Population aufwiesen.

Ein Patient (RTP12) wurde im Verlauf der Bestrahlungstherapie mit einem Antibiotikum (Cotrimoxazol) behandelt. Bei der orientierenden Durchsicht der Ergebnisse ergaben sich daraus jedoch keine offensichtlichen Implikationen für die untersuchten Zellpopulationen.

3.12. Vergleich mit den gesunden Spendern

3.12.1. Allgemeines Vorgehen

Für den Vergleich der Patienten ($n = 21$) mit den gesunden Spendern (GS, $n = 6$) wurde aus den Ergebnissen der drei Blutentnahmen aller GS zunächst der Mittelwert, quasi als Basiswert, gebildet. Die Ergebnisse der einzelnen Zeitpunkte der Patienten wurden dann mit dem Gesamt-Mittelwert GS in ungepaarten, zweiseitigen Student's T-Tests verglichen.

In den Grafiken sind durchweg die Mittelwerte der Patienten mit einem schwarzen Kreis, die Mittelwerte der GS (an den einzelnen Zeitpunkten) mit einem schwarzen Quadrat und der Gesamt-Mittelwert der GS mit einer gepunkteten Linie (über dem Zeitraum AB bis D) eingezeichnet. Die Symbole * bzw. ** stehen wie bisher für einen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen, dabei ist jeweils der Unterschiede zwischen den Patienten am jeweiligen Zeitpunkt und dem Gesamt-Mittelwert der gesunden Probanden gemeint.

Die Veränderungen in den Ergebnissen der GS über den Beobachtungszeitraum wurden als natürliche Schwankungen angesehen.

Die Altersstruktur der beiden verglichenen Gruppen ist in der folgenden Tabelle 23 dargestellt.

Tabelle 23: Übersicht über die Altersstruktur der Patienten und der gesunden Probanden bei Sudieneinschluss.

	Patienten	gesunde Probanden
Anzahl (n)	21	6
mittleres Alter	74,05 Jahre	54,83 Jahre
medianes Alter	75 Jahre	52,5 Jahre
Altersspanne	58 bis 82 Jahre	49 bis 63 Jahre

3.12.2. Zellzahlverläufe

Der Anteil der Lymphozyten der Patienten unter den lebenden PBMC nahm über den Bestrahlungszeitraum hinweg kontinuierlich ab (siehe 3.4.1.). Am Zeitpunkt D ließ sich ein signifikanter Unterschied zu den Lymphozytenzahlen der gesunden Spender erkennen (59,27 % vs. 74,04 %; $p = 0,007$; $n_{\text{Patienten}} (n_P) = 18$; $n_{\text{GS}} = 6$; siehe auch Abbildung 40). Bei der Lymphozytenpopulation unter den Einzelzellen unterschieden sich die Zahlen für Patienten und gesunde Probanden zusätzlich in den Zeitpunkten C und E (Daten aus Färbung 1). Diese Ergebnisse konnten durch Färbung 2 reproduziert werden und sind in Abbildung 40 gezeigt.

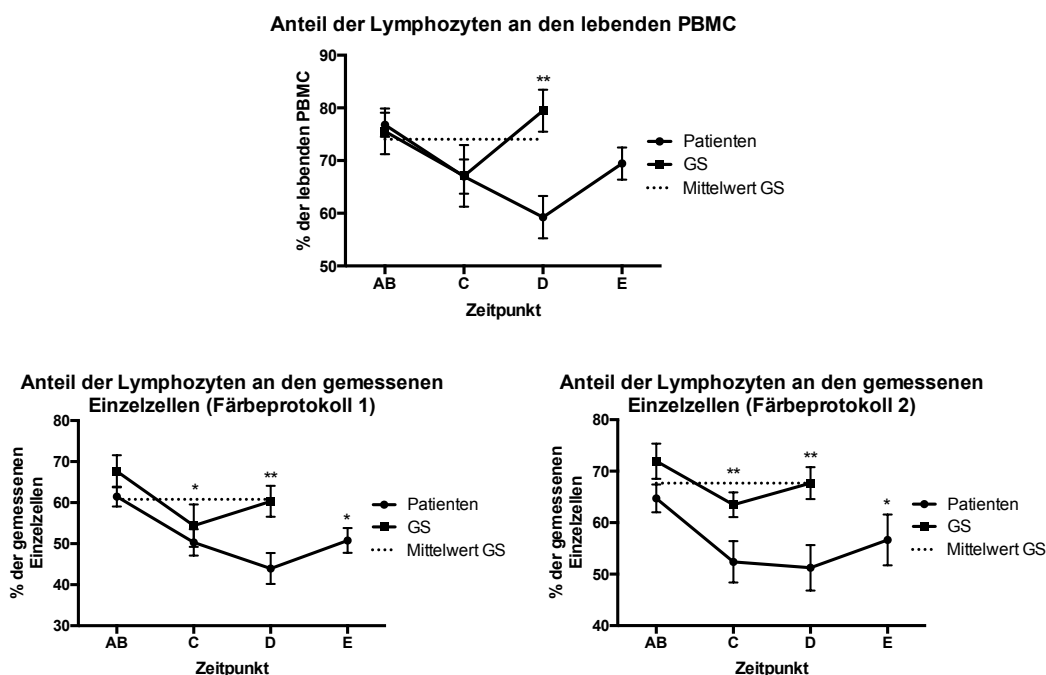


Abbildung 40: Verlauf des Lymphozytenanteils der Patienten im Vergleich mit den gesunden Spendern (GS). Oben: Daten aus Färbung 1 für die Lymphozytenpopulation unter den lebenden

PBMC. Bei Zeitpunkt D bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen (siehe Text). Unten links: Daten aus Färbung 1 für die Lymphozytenpopulation unter den gemessenen Einzelzellen. Hier waren die Unterschiede zu den Zeitpunkten C (50,31 % vs. 60,79 %; $p = 0,023$; $n_P = 20$; $n_{GS} = 6$), D (43,96 % vs. 60,79 %; $p = 0,001$; $n_P = 18$; $n_{GS} = 6$) und E (50,79 % vs. 60,79 %; $p = 0,025$; $n_P = 15$; $n_{GS} = 6$) signifikant. Unten rechts: Diese Ergebnisse konnten in Färbung 2 ebenfalls gezeigt werden (C: 52,39 % vs. 67,70 % ($p = 0,002$, $n_P = 17$; $n_{GS} = 6$); D: 51,25 % vs. 67,70 % ($p = 0,001$, $n_P = 13$, $n_{GS} = 6$); E: 56,65 % vs. 67,70 % ($p = 0,025$, $n_P = 10$, $n_{GS} = 6$)). Gezeigt sind jeweils der Mittelwert mit SEM der Patienten ($n = 21$) und der GS ($n = 6$), sowie der Gesamt-Mittelwert aller gesunden Probanden, mit dem die statistische Auswertung erfolgte (gepunktete Linie).

Bei den T-Zellen (Anteil an den Lymphozyten) stellte sich lediglich zum Zeitpunkt E ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und GS dar. Im Verlauf nahm ihr Anteil bei den Patienten ab (siehe 3.4.2.). Am Zeitpunkt E waren 55,89 % der Lymphozyten der Patienten T-Zellen (Mittelwert der GS: 65,42 %; $p = 0,030$; $n_P = 15$; $n_{GS} = 6$; Daten nicht gezeigt). Unterschiede in der Zusammensetzung der T-Zellen bezüglich T_H - und T_K -Zellen konnten zwischen Patienten und GS nicht festgestellt werden. Bei der Aktivierung (Expression von CD25) der CD4-positiven T-Zellen fiel am Zeitpunkt D ein Unterschied auf: Hier zeigten die Zellen der bestrahlten Patienten eine signifikant höhere Expression (4,87 % vs. 3,14 %; $p = 0,029$; $n_P = 18$; $n_{GS} = 6$; siehe auch Abbildung 41). Bezüglich der regulatorischen T-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Probanden erkannt werden.

Für die B-Zellen konnte eine interessante Beobachtung gemacht werden: Hier unterschied sich der Anteil unter den lebenden Lymphozyten der Patienten bereits vor der Bestrahlung signifikant von dem der GS. Auch während und nach der Bestrahlung blieben die B-Zell-Zahlen der Patienten signifikant niedriger als die der gesunden Probanden.

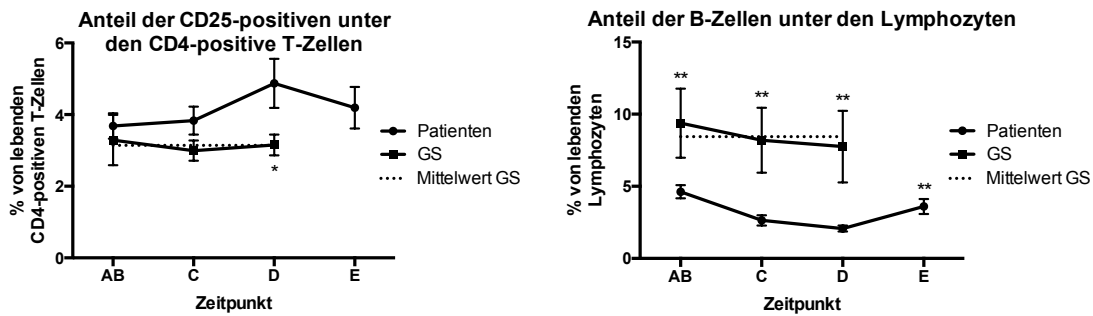


Abbildung 41: Links: Vergleich der Anteile aktivierter CD4-positiver T-Zellen von Patienten und GS. Am Zeitpunkt D trat ein signifikanter Unterschied auf (siehe Text). Rechts: Vergleich der B-Zell-Anteile unter den Lymphozyten von Patienten und GS. Signifikante Unterschiede wurden zu allen Zeitpunkten festgestellt. Zeitpunkt AB: 4,62 % vs. 8,44 % ($p = 0,010$; $n_P = 21$; $n_{GS} = 6$); Zeitpunkt C: 2,64 % vs. 8,44 % ($p < 0,001$; $n_P = 20$; $n_{GS} = 6$); Zeitpunkt D: 2,07 % vs. 8,44 % ($p < 0,001$; $n_P = 18$; $n_{GS} = 6$); Zeitpunkt E: 3,61 % vs. 8,44 % ($p = 0,006$; $n_P = 15$; $n_{GS} = 6$). Gezeigt sind jeweils der Mittelwert mit SEM der Patienten ($n = 21$) und der GS ($n = 6$), sowie der Gesamt-Mittelwert aller gesunden Probanden, mit dem die statistische Auswertung erfolgte (gepunktete Linie).

Auch beim Anteil der NK-Zellen unter den lebenden Lymphozyten konnte ein Unterschied zwischen den Patienten und gesunden Probanden festgestellt werden. Dieser prägte sich allerdings erst nach Beginn der Bestrahlung aus, blieb aber über sie hinaus bis zum Zeitpunkt E bestehen (siehe Abbildung 42). Ein Unterschied bezüglich der Expression von CD56 unter den NK-Zellen konnte zwischen Patienten und gesunden Probanden nicht festgestellt werden.

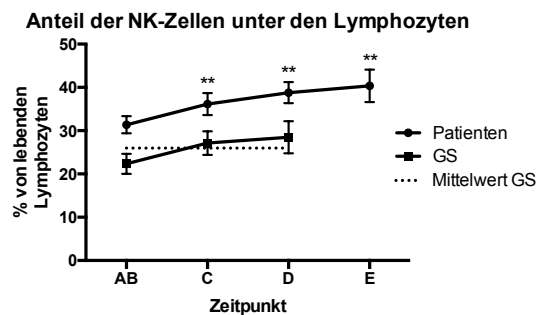


Abbildung 42: Vergleich der NK-Zell-Anteile unter den Lymphozyten von Patienten und GS. Signifikante Unterschiede konnten zu den Zeitpunkten C (36,14 % vs. 25,98 %; $p = 0,004$; $n_P = 20$; $n_{GS} = 6$), D (38,79 % vs. 25,98 %; $p < 0,001$; $n_P = 18$; $n_{GS} = 6$) und E (40,36 % vs. 25,98 %; $p = 0,001$; $n_P = 15$; $n_{GS} = 6$) festgestellt werden. Gezeigt sind jeweils der Mittelwert mit SEM der Patienten ($n = 21$) und der GS ($n = 6$), sowie der Gesamt-Mittelwert aller gesunden Probanden, mit dem die statistische Auswertung erfolgte (gepunktete Linie).

3.12.3. Proliferation

Die Proliferationsrate nahm bei den Patienten in allen untersuchten Zellpopulationen zu (siehe 3.5.). Folgende Unterschiede ergaben sich aus dem Vergleich mit den GS (siehe auch Abbildung 43).

Bei den T-Zellen konnte während der Bestrahlung (Zeitpunkte C und D) eine höhere Proliferationsrate im Vergleich zu den GS erkannt werden. Dies galt auch für die CD4- und CD8-positiven T-Zellen. Die Proliferationsraten der regulatorischen T-Zellen von Probanden und Patienten unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant.

Die B-Zellen der Patienten zeigten ab dem Zeitpunkt C eine erhöhte Proliferationsrate im Vergleich zu den GS. Auch am Zeitpunkt E bestand hier noch ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Für die NK-Zellen konnte ein interessantes Ergebnis gefunden werden: Im Gegensatz zu den ursprünglichen Erwartungen, eine durch die Bestrahlung höhere Proliferationsrate zu erhalten, war der Unterschied zu den Zeitpunkten C und D zwischen Patienten und gesunden Probanden nicht signifikant. Ein statistisch verwertbarer Unterschied bestand jedoch zu den Zeitpunkten AB und E. Es ist davon auszugehen, dass die Proliferationsrate der NK-Zellen bei den Patienten durch das Prostatakarzinom erniedrigt ist und durch die RT auf ein normales Niveau angehoben wird. Für die voll funktionsfähigen NK-Zellen (CD56-positiv) waren die Ergebnisse ähnlich.

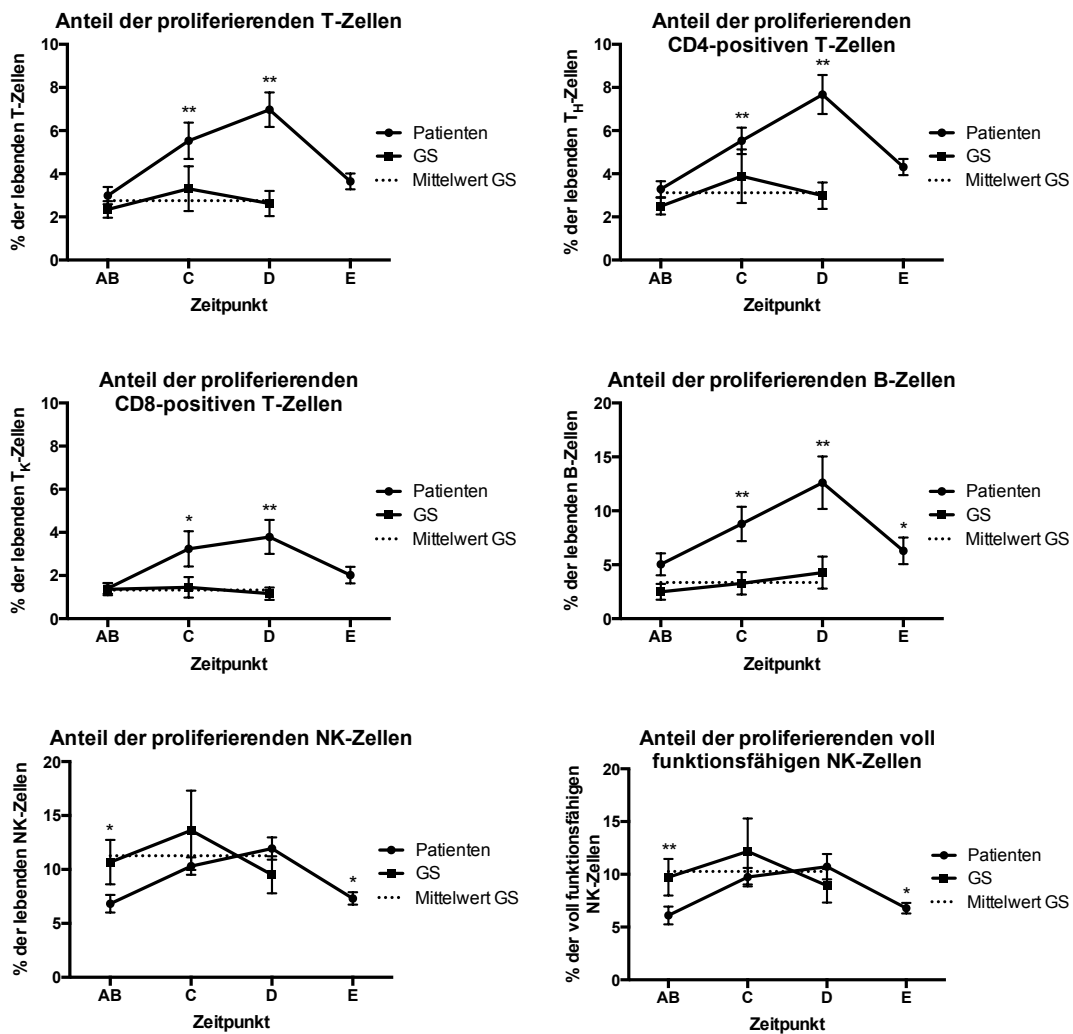


Abbildung 43: Unterschiede in den Proliferationsraten zwischen Patienten und GS als Anteile der jeweiligen Überpopulation. Oben links - T-Zellen: signifikante Unterschiede bei Zeitpunkt C (5,53 % vs. 2,76 %; $p = 0,009$; $n_P = 20$; $n_{GS} = 6$) und D (6,97 % vs. 2,76 %; $p < 0,001$; $n_P = 18$; $n_{GS} = 6$). Oben rechts - CD4-positive T-Zellen: signifikante Unterschiede bei Zeitpunkt C (5,53 % vs. 3,12 %; $p = 0,006$; $n_P = 20$; $n_{GS} = 6$) und D (7,67 % vs. 3,12 %; $p < 0,001$; $n_P = 18$; $n_{GS} = 6$). Mitte links - CD8-positive T-Zellen: signifikante Unterschiede bei Zeitpunkt C (3,24 % vs. 1,33 %; $p = 0,042$; $n_P = 20$; $n_{GS} = 6$) und D (3,79 % vs. 1,33 %; $p = 0,006$; $n_P = 18$; $n_{GS} = 6$). Mitte rechts - B-Zellen: signifikante Unterschiede bei Zeitpunkt C (8,79 % vs. 3,35 %; $p = 0,006$; $n_P = 20$; $n_{GS} = 6$), D (12,61 % vs. 3,35 %; $p = 0,001$; $n_P = 18$; $n_{GS} = 6$) und E (6,29 % vs. 3,35 %; $p = 0,042$; $n_P = 15$; $n_{GS} = 6$). Unten links - NK-Zellen (CD3⁺CD19⁻): signifikante Unterschiede bei Zeitpunkt AB (6,83 % vs. 11,27 %; $p = 0,015$; $n_P = 21$; $n_{GS} = 6$) und E (7,31 % vs. 11,27 %; $p = 0,025$; $n_P = 15$; $n_{GS} = 6$). Unten rechts - voll funktionsfähige NK-Zellen (CD3⁺CD19⁻CD56⁺): signifikante Unterschiede bei Zeitpunkt AB (6,03 % vs. 10,27 %; $p = 0,011$; $n_P = 21$; $n_{GS} = 6$) und E (6,71 % vs. 10,27 %; $p = 0,041$; $n_P = 15$; $n_{GS} = 6$). Gezeigt sind jeweils der Mittelwert mit SEM der Patienten ($n = 21$) und der GS ($n = 6$), sowie der Gesamt-Mittelwert aller gesunden Probanden, mit dem die statistische Auswertung erfolgte (gepunktete Linie).

3.12.4. Zell-Viabilität

Bezüglich der in Färbung 2 untersuchten Viabilität der Zellen zeigte sich lediglich ein sehr kleiner Unterschied zwischen Patienten und gesunden Probanden: Bei der Untersuchung der CD8-positiven Zellen fiel auf, dass vor Bestrahlungsbeginn signifikant mehr apoptotische Zellen bei den Patienten vorhanden waren als bei den GS (17,26 % vs. 10,07 %; $p = 0,034$; $n_P = 17$; $n_{GS} = 6$; Daten nicht gezeigt). Für die lebenden und nekrotischen CD8-positiven Zellen war kein Unterschied feststellbar, ebenso für alle Populationen der CD4-positiven Zellen.

3.12.5. Zelldifferenzierung

Ähnlich wie bei der Zell-Viabilität (siehe 3.12.4.) gab es auch bei der Differenzierung der Lymphozyten nur wenige Unterschiede zwischen Patienten und GS. Bei der Betrachtung der CD4-positiven Zellen waren jeweils Unterschiede am Zeitpunkt E für naive Zellen (siehe Abbildung 44) und Zellen mit den Merkmalen $CD45RA^-$ und $CD28^+$ (eine Population der antigenerfahrenen Zellen, Daten nicht gezeigt). Bezüglich der CD45RA- und CD28-negativen CD8-positiven Zellen (Effektor-Gedächtniszellen, siehe 3.7.1.) konnte am Zeitpunkt D beim Vergleich mit den gesunden Probanden ein Unterschied festgestellt werden, der ebenfalls in Abbildung 44 dargestellt ist.

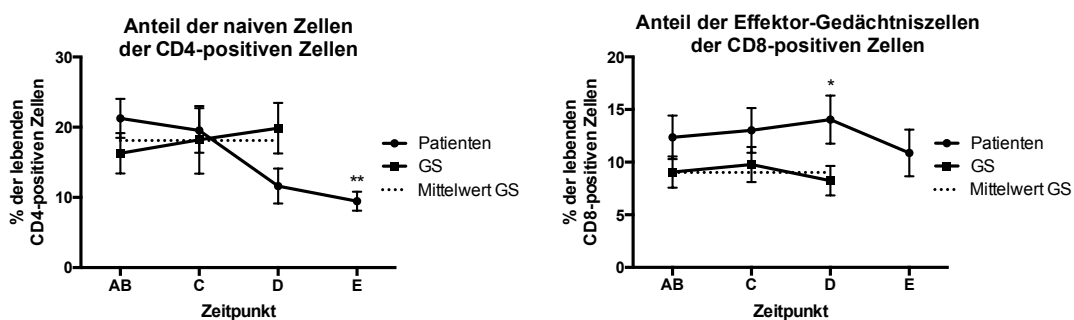


Abbildung 44: Links: Verlauf der naiven CD4-positiven Zellen im Vergleich zwischen Patienten und gesunden Probanden. Erst am Zeitpunkt E hatten die Patienten mit 9,46 % vs. 18,12 % ($p = 0,007$; $n_P = 13$; $n_{GS} = 6$) signifikant weniger naive Zellen als die Kontrollgruppe. Rechts: Verlauf der Effektor-Gedächtniszellen der CD8-positiven Zellen im Vergleich zwischen Patienten und GS. Lediglich am Zeitpunkt D zeigte sich ein signifikanter Unterschied (Patienten: 14,04 %; GS: 9,03 %; $p = 0,046$; $n_P = 16$; $n_{GS} = 6$). Gezeigt sind jeweils der Mittelwert mit SEM der Patienten ($n = 21$) und der GS ($n = 6$), sowie der Gesamt-Mittelwert aller gesunden Probanden, mit dem die statistische Auswertung erfolgte (gepunktete Linie).

3.12.6. Virus-spezifische CD8-positive Zellen

Die Zellzahlverläufe der Virus-spezifischen Zellen der Patienten wurden nicht mit den GS verglichen, da sie als individuell angesehen wurden und somit ein Vergleich nicht sinnvoll wäre. Die hier präsentierten Unterschiede beziehen sich somit lediglich auf Proliferation, Viabilität und Differenzierung.

Bei Betrachtung der Proliferationsrate konnte bei den CMV-pp65-spezifischen CD8-positiven Zellen ein Unterschied zwischen Patienten und GS festgestellt werden. Am Ausgangszeitpunkt lag kein Unterschied vor, zum Zeitpunkt C war die Proliferationsrate bei den Patienten signifikant höher, am Zeitpunkt D war erneut kein Unterschied nachweisbar und beim Zeitpunkt E lag die Rate an proliferierenden Zellen der Patienten interessanterweise signifikant unter der der gesunden Probanden (siehe Abbildung 45 links). Bezüglich der Viabilität konnten keine Unterschiede bei den CMV-spezifischen Zellen erkannt werden (Daten nicht gezeigt). In Bezug auf die Differenzierung der für CMV spezifischen CD8-positiven Zellen fiel ein zu den Zeitpunkten AB, C und D erhöhter Anteil an CD45RA- und CD28-positiven Zellen (naiv) im Vergleich zu den gesunden Probanden auf, der zum Zeitpunkt E nicht mehr bestand (siehe Abbildung 45 rechts). Für die anderen Differenzierungsstadien konnten keine Unterschiede beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

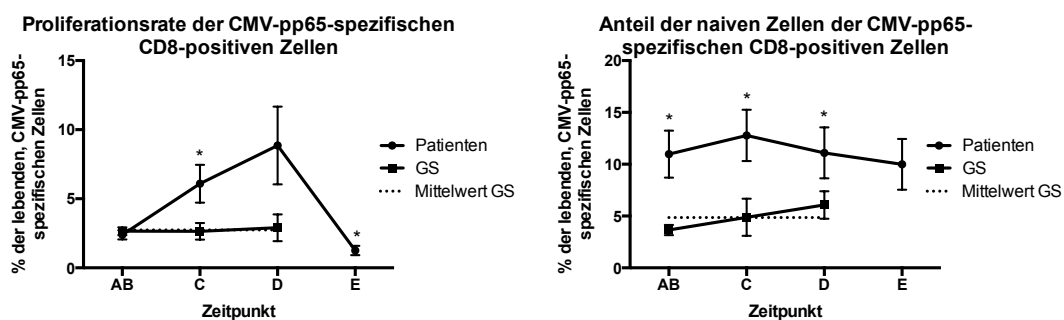


Abbildung 45: Vergleich der CMV-pp65-spezifischen CD8-positiven Zellen von Patienten und GS bezüglich Proliferationsrate (links) und naiven Zellen (rechts). Die Zellen der Patienten zeigten am Zeitpunkt C eine höhere (6,09 % vs. 2,74 %; $p = 0,046$; $n_P = 8$; $n_{GS} = 3$) und zum Zeitpunkt E eine niedrigere (1,26 % vs. 2,75 %; $p = 0,030$; $n_P = 6$; $n_{GS} = 3$) Proliferationsrate (Anteil der Ki67-positiven Zellen) als die der GS. Bei den Zeitpunkten AB und D bestand kein Unterschied. Die naiven Zellen hatten bei den Patienten zu den Zeitpunkten AB (10,98 % vs. 4,87 %; $p = 0,032$; $n_P = 8$; $n_{GS} = 3$), C (12,78 % vs. 4,87 %; $p = 0,013$; $n_P = 8$; $n_{GS} = 3$) und D (11,10 % vs. 4,87 %; $p = 0,034$; $n_P = 7$; $n_{GS} = 3$) einen größeren Anteil als bei den GS. Bei Zeitpunkt E war kein signifikanter Unterschied mehr nachweisbar. Gezeigt sind jeweils der

Mittelwert mit SEM der Patienten (n = 8) und der GS (n = 3), sowie der Gesamt-Mittelwert aller gesunden Probanden, mit dem die statistische Auswertung erfolgte (gepunktete Linie).

Für die für EBV-BMLF1-spezifischen CD8-positiven Zellen der Patienten fand sich initial bemerkenswerterweise eine niedrigere Rate an nekrotischen Zellen als bei den gesunden Spendern (1,29 % vs. 2,78 %; p = 0,019; n_P = 14; n_{GS} = 3; Daten nicht gezeigt). In Bezug auf die Differenzierung konnten hier die folgenden deutlichen Unterschiede sichtbar gemacht werden (Abbildung 46): Während sich bei den naiven Zellen (CD45RA⁺CD28⁺) kein Unterschied beobachten ließ, hatten die Patienten mehr hochdifferenzierte Effektoren (CD45RA⁺CD28⁻; Ausnahme: Zeitpunkt D, hier kein signifikanter Unterschied) und Effektor-Gedächtniszellen (CD45RA⁻CD28⁻; Ausnahme: Zeitpunkt E, hier kein signifikanter Unterschied), jedoch deutlich weniger zentrale Gedächtniszellen (CD45RA⁻CD28⁺; Ausnahme: Zeitpunkt E, hier kein signifikanter Unterschied). Bei der Proliferationsrate konnten keine Unterschiede für EBV-BMLF1-spezifische CD8-positive Zellen gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

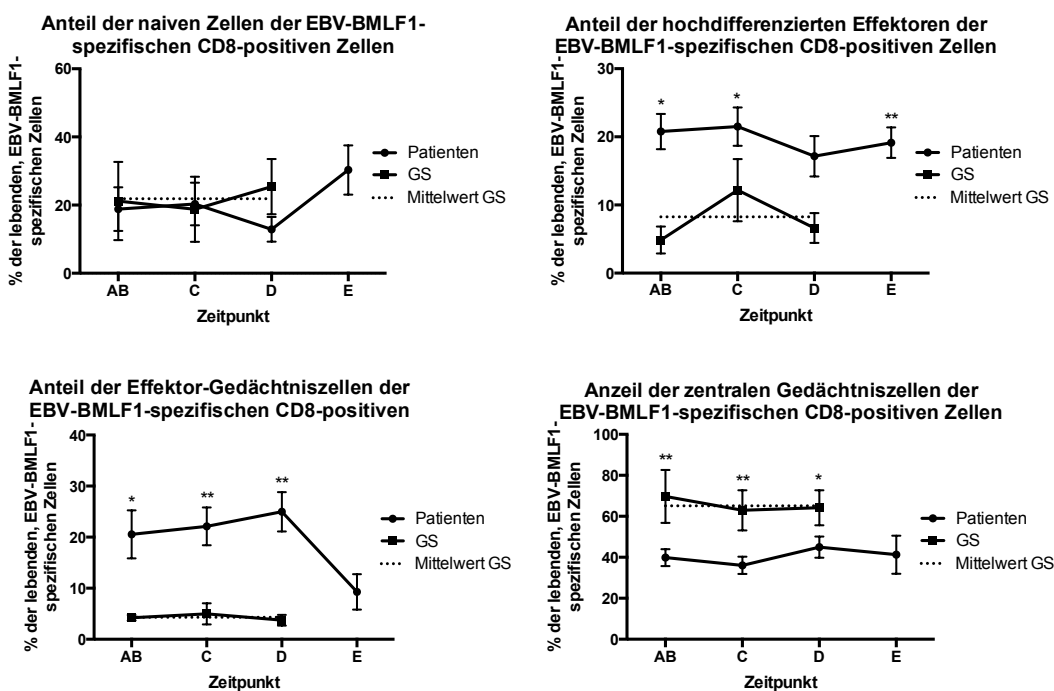


Abbildung 46: Vergleich der EBV-BMLF1-spezifischen CD8-positiven Zellen von Patienten und GS bezüglich der Zelldifferenzierung. Oben links: Bei den naiven Zellen konnte kein

signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Oben rechts: Bei den Patienten konnte zu den Zeitpunkten AB (20,78 % vs. 8,27 %; $p = 0,030$; $n_P = 16$; $n_{GS} = 4$), C (21,51 % vs. 8,27 %; $p = 0,017$; $n_P = 14$; $n_{GS} = 4$) und E (19,15 % vs. 8,27 %; $p = 0,008$; $n_P = 6$; $n_{GS} = 4$) ein signifikant größerer Anteil an hochdifferenzierten Effektorzellen nachgewiesen werden. Beim Zeitpunkt D bestand mit 17,15 % vs. 8,27 % ein ebenfalls deutlicher, jedoch nicht signifikanter Unterschied ($p = 0,057$; $n_P = 11$; $n_{GS} = 4$). Unten links: Die Patienten wiesen zu den Zeitpunkten AB (20,55 % vs. 4,33 %; $p = 0,023$; $n_P = 16$; $n_{GS} = 4$), C (22,12 % vs. 4,33 %; $p = 0,001$; $n_P = 14$; $n_{GS} = 4$) und D (24,97 % vs. 4,33 %; $p < 0,001$; $n_P = 11$; $n_{GS} = 4$) einen signifikant höheren Anteil an Effektor-Gedächtniszellen als die GS auf. Beim Zeitpunkt E bestand kein Unterschied mehr. Unten rechts: Der Anteil an zentralen Gedächtniszellen war bei den Patienten an den Zeitpunkten AB bis D geringer als bei den GS (AB: 39,85 % vs. 65,10 % mit $p = 0,007$, $n_P = 16$, $n_{GS} = 4$; C: 36,06 % vs. 65,10 % mit $p = 0,002$, $n_P = 14$, $n_{GS} = 4$; D: 44,96 % vs. 65,10 % mit $p = 0,030$, $n_P = 11$, $n_{GS} = 4$). Am Zeitpunkt E bestand mit 41,28 % vs. 65,10 % immer noch ein deutlicher, jedoch nicht mehr signifikanter Unterschied ($p = 0,050$, $n_P = 6$, $n_{GS} = 4$). Gezeigt sind jeweils der Mittelwert mit SEM der Patienten ($n = 16$) und der GS ($n = 4$), sowie der Gesamt-Mittelwert aller gesunden Probanden, mit dem die statistische Auswertung erfolgte (gepunktete Linie).

Aufgrund der geringen Anzahl an durchgeführten Versuchen für EBV-LMP2- und Influenza-Matrix-spezifische CD8-positive Zellen und der sehr breiten Streuung der wenigen Ergebnisse wurden diese nicht näher betrachtet.

3.12.7. Zytokinproduktion

Beim Vergleich der Zytokinproduktion der Patientenzellen mit den Zellen der GS nach Stimulation mit SEB fielen einige Unterschiede, sowohl für die CD4- als auch für die CD8-positiven Zellen auf, die der folgenden Tabelle 24 zu entnehmen sind.

Tabelle 24: Vergleich der Lymphozyten von Patienten und GS bezüglich der Zytokinproduktion nach Stimulation mit SEB.

Veränderungen bei den CD4-positiven Zellen	Veränderungen bei den CD8-positiven Zellen
<ul style="list-style-type: none"> • signifikant weniger IL-10-produzierende Zellen am Zeitpunkt AB bei den Patienten • signifikant weniger IFN-γ-produzierende Zellen bei den Patienten an den Zeitpunkten AB, C und D 	<ul style="list-style-type: none"> • signifikant weniger IL-10-produzierende Zellen zu den Zeitpunkten AB und D bei den Patienten • Expression von CD107a bei den Patienten zu den Zeitpunkten AB und E signifikant erhöht

Der Anteil an IL-10-produzierenden CD4-positiven Zellen betrug zum Zeitpunkt AB bei den Patienten 0,04 %, der Mittelwert der gesunden Probanden lag bei

0,13 % ($p = 0,006$; ; $n_P = 16$; $n_{GS} = 5$; Daten nicht gezeigt). Die Veränderungen für die IFN- γ -Produktion sind in Abbildung 47 dargestellt.

Bei den CD8-positiven Zellen der Patienten lag der Anteil an CD107a-positiven Zellen zum Zeitpunkt AB mit 11,81 % vs. 5,49 % ($p = 0,033$; $n_P = 15$; $n_{GS} = 5$) und zum Zeitpunkt E mit 9,95 % vs. 5,49 % ($p = 0,003$; $n_P = 8$; $n_{GS} = 5$) signifikant über dem der GS. An den Zeitpunkten C und D unterschieden sich die verglichenen Gruppen nicht signifikant (siehe Abbildung 47). Bezüglich der IL-10-Produktion durch CD8-positive Zellen konnte eine verminderte Anzahl bei den Patienten zu den Zeitpunkten AB (0,01 % vs. 0,09 %; $p < 0,001$; $n_P = 15$; $n_{GS} = 5$), D (ebenfalls 0,01 % vs. 0,09 %; $p = 0,009$; $n_P = 8$; $n_{GS} = 5$) und E (0,03 % vs. 0,09 %; $p = 0,036$; $n_P = 8$; $n_{GS} = 5$) gezeigt werden (siehe ebenfalls Abbildung 47).

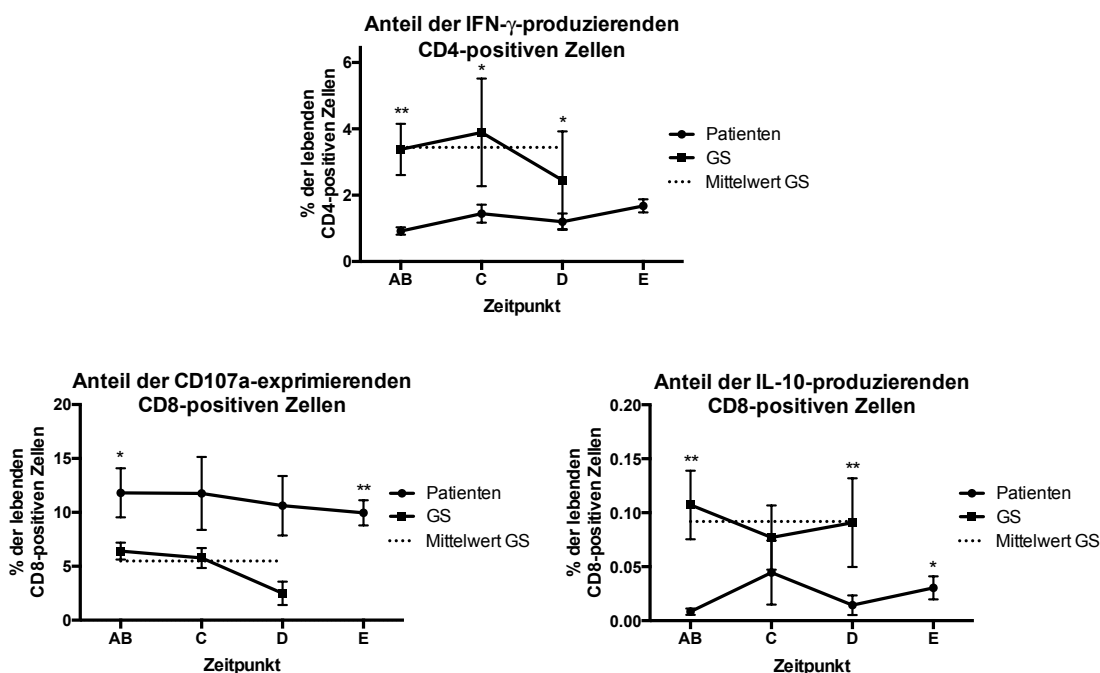


Abbildung 47: Oben: Vergleich der IFN- γ -produzierenden CD4-positiven Zellen von Patienten und GS nach Stimulation mit SEB. Die Rate war bei den Patienten zu allen Zeitpunkten bis auf Zeitpunkt E (hier kein Unterschied) geringer als bei den GS (AB: 0,92 % vs. 3,44 % mit $p = 0,002$, $n_P = 16$, $n_{GS} = 5$; C: 1,44 % vs. 3,44 % mit $p = 0,050$, $n_P = 10$, $n_{GS} = 5$; D: 1,20 % vs. 3,44 % mit $p = 0,037$, $n_P = 9$, $n_{GS} = 5$). Unten links: Vergleich der CD107a-exprimierenden CD8-positiven Zellen von Patienten und gesunden Probanden nach Stimulation mit SEB. Ein signifikanter Unterschied mit erhöhter Expression bei den Patientenzellen konnte zu den Zeitpunkten AB und E (Werte siehe Text) nachgewiesen werden. An den Zeitpunkten C und D waren die Unterschiede zwar sichtbar, mit $p_C = 0,075$ und $p_D = 0,057$ jedoch nicht signifikant. Unten rechts: Vergleich der IL-10-produzierenden CD8-positiven Zellen von Patienten und GS nach Stimulation mit SEB. Zu den Zeitpunkten AB, D und E war der Anteil bei den Patienten

signifikant niedriger als bei den gesunden Probanden (Werte siehe Text). Gezeigt sind jeweils der Mittelwert mit SEM der Patienten (n = 17) und der GS (n = 5) , sowie der Gesamt-Mittelwert aller gesunden Probanden, mit dem die statistische Auswertung erfolgte (gepunktete Linie).

Bei der Betrachtung der Zytokinproduktion nach Stimulation mit dem CMV-Peptid pp65 konnte eine erhöhte Anzahl an IL-2-produzierenden CD4-positiven Zellen der Patienten am Zeitpunkt D (0,0359 % vs. 0,0006 %; $p = 0,009$; $n_P = 2$; $n_{GS} = 2$), eine ebenfalls erhöhte Anzahl an IL-5-produzierenden CD4-positiven Lymphozyten der Patienten an den Zeitpunkten C (0,03 % vs. 0,00 %; $p = 0,032$; $n_P = 3$; $n_{GS} = 2$) und D (0,02 % vs. 0,00 %; $p = 0,017$; $n_P = 2$; $n_{GS} = 2$), sowie eine geringere Anzahl an IL-17-produzierenden CD4-positiven Zellen der Patienten zum Zeitpunkt AB (0,0009 % vs. 0,0123 %; $p = 0,014$; $n_P = 6$; $n_{GS} = 2$) vermutet werden. Die Färbung 4 (ICS) wurde jedoch lediglich für zwei gesunde Probanden und für sechs Patienten mit der CMV-Spezifität durchgeführt, sodass dieses Ergebnis nur eingeschränkt verwertbar ist. Die Ergebnisse sind grafisch nicht dargestellt.

Beim Vergleich der ICS mit Stimulation durch das EBV-BMLF1-Peptid von Patienten und GS konnte gezeigt werden, dass für IL-10 und IL-17 von den CD4-positiven Patientenzellen am Zeitpunkt AB im Vergleich zu den GS weniger vorhanden waren (IL-10: 0,003 % vs. 0,026 % mit $p = 0,004$, $n_P = 9$, $n_{GS} = 3$; IL-17: 0,001 % vs. 0,008 %; $p = 0,049$, $n_P = 9$, $n_{GS} = 3$).

Für die CD8-positiven Zellen zeigte sich ein Unterschied bei der Produktion von IL-10 zu den Zeitpunkten AB, C und D, der in Abbildung 48 gezeigt ist. Am Zeitpunkt E waren zu wenige Ergebnisse bei den Patienten für einen statistischen Test verfügbar.

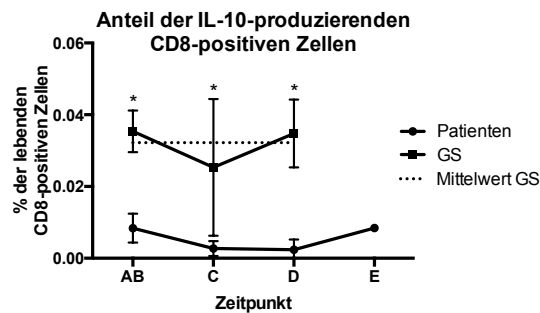


Abbildung 48: Vergleich der IL-10-produzierenden CD8-positiven Zellen von Patienten und GS nach Stimulation mit EBV-BMLF1. Zu den Zeitpunkten AB (0,008 % vs. 0,032 %; $p = 0,013$; $n_P = 9$; $n_{GS} = 3$), C (0,003 % vs. 0,032 %; $p = 0,022$; $n_P = 4$; $n_{GS} = 3$) und D (0,002 % vs. 0,032 %; $p = 0,043$; $n_P = 3$; $n_{GS} = 3$) war der Anteil bei den Patienten signifikant niedriger als bei den gesunden Probanden. Gezeigt sind jeweils der Mittelwert mit SEM der Patienten ($n = 10$) und der GS ($n = 3$), sowie der Gesamt-Mittelwert aller gesunden Probanden, mit dem die statistische Auswertung erfolgte (gepunktete Linie).

Für die Intrazellulärfärbungen nach Stimulation mit der EBV-LMP2-Peptidsequenz und einem Peptid aus dem Influenza-Matrixprotein wurden zu wenige Versuche durchgeführt, sodass statistisch verwertbare Aussagen dazu nicht möglich waren.

Beim Vergleich der basalen Zytokinproduktion nach Stimulation mit einem HIV-Peptid zwischen Patienten und GS waren zahlreiche Unterschiede zu detektieren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 25, Abbildung 49 und Abbildung 50 zusammengefasst.

Tabelle 25: Vergleich der Lymphozyten von Patienten und GS bezüglich der Zytokinproduktion nach Stimulation mit HIV (Negativkontrolle).

Veränderungen bei den CD4-positiven Zellen	Veränderungen bei den CD8-positiven Zellen
<ul style="list-style-type: none"> • signifikant mehr IL-5-produzierende Zellen der Patienten zu allen Zeitpunkten • signifikant weniger IL-10-produzierende Zellen der Patienten zu allen Zeitpunkten • signifikant weniger IL-17-produzierende Zellen der Patienten an den Zeitpunkten AB und C • signifikant mehr IFN-γ-produzierende Zellen der Patienten zu allen Zeitpunkten • signifikant mehr TNF-α-produzierende Zellen der Patienten zu allen Zeitpunkten außer bei Zeitpunkt C 	<ul style="list-style-type: none"> • signifikant weniger IL-2-produzierende Zellen der Patienten am Zeitpunkten AB • signifikant weniger IL-10-produzierende Zellen der Patienten zu allen Zeitpunkten • signifikant mehr TNF-α-produzierende Zellen der Patienten zu allen Zeitpunkten • Expression von CD107a bei den Patienten an den Zeitpunkten D und E signifikant erhöht

Keine Unterschiede waren lediglich bei der IL-2-Produktion durch die CD4-positiven Zellen und bei der IFN- γ -Produktion durch die CD8-positiven Zellen zu erkennen. Alle Ergebnisse sind in Abbildung 49 und in Abbildung 50 dargestellt.

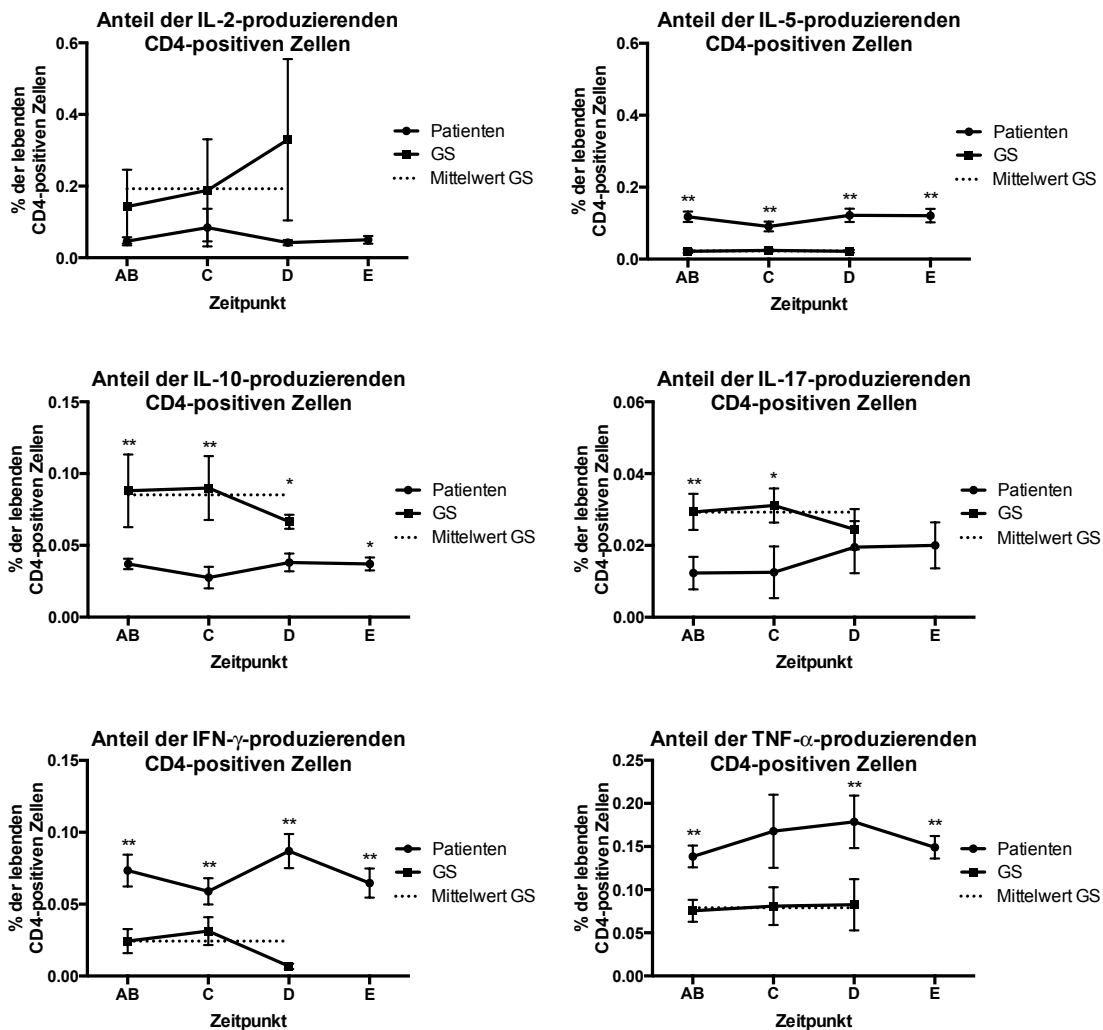


Abbildung 49: Vergleich der Anzahl basal Zytokin-produzierender CD4-positiver Zellen von Patienten und gesunden Probanden (nach Stimulation mit einem HIV-Peptid als Negativkontrolle für das ICS). Oben links: Bezüglich der IL-2-Produktion war zwischen den beiden untersuchten Kohorten kein Unterschied feststellbar. Oben rechts: Zu allen Zeitpunkten produzierten bei den Patienten mehr Zellen IL-5 als bei den GS (AB: 0,12 % vs. 0,02 % mit $p < 0,001$, $n_P = 15$, $n_{GS} = 5$; C: 0,09 % vs. 0,02 % mit $p < 0,001$, $n_P = 10$, $n_{GS} = 5$; D: 0,12 % vs. 0,02 % mit $p < 0,001$, $n_P = 8$, $n_{GS} = 5$; E: 0,12 % vs. 0,02 % mit $p < 0,001$, $n_P = 8$, $n_{GS} = 5$). Mitte links: Zu allen Zeitpunkten produzierten bei den Patienten weniger Zellen IL-10 als bei den GS (AB: 0,04 % vs. 0,09 % mit $p = 0,002$, $n_P = 15$, $n_{GS} = 5$; C: 0,03 % vs. 0,09 % mit $p = 0,004$, $n_P = 10$, $n_{GS} = 5$; D: 0,04 % vs. 0,09 % mit $p = 0,025$, $n_P = 8$, $n_{GS} = 5$; E: 0,04 % vs. 0,09 % mit $p = 0,020$, $n_P = 8$, $n_{GS} = 5$). Mitte rechts: An den Zeitpunkten AB und C produzierten bei den Patienten weniger Zellen IL-17 als bei den GS (AB: 0,01 % vs. 0,03 % mit $p = 0,009$, $n_P = 15$, $n_{GS} = 5$; C: 0,01 % vs. 0,03 % mit $p = 0,043$, $n_P = 10$, $n_{GS} = 5$). Unten links: Zu allen Zeitpunkten produzierten bei den Patienten mehr Zellen IFN- γ als bei den GS (AB: 0,07 % vs. 0,02 % mit $p = 0,002$, $n_P = 15$, $n_{GS} = 5$; C: 0,06 % vs. 0,02 % mit $p = 0,005$, $n_P = 10$, $n_{GS} = 5$; D: 0,09 % vs. 0,02 % mit $p < 0,001$, $n_P = 8$, $n_{GS} = 5$; E: 0,06 % vs. 0,02 % mit $p = 0,002$, $n_P = 8$, $n_{GS} = 5$). Unten rechts: An den Zeitpunkten AB, D und E produzierten bei den Patienten mehr Zellen TNF- α als bei den GS (AB: 0,14 % vs. 0,08 % mit $p = 0,003$, $n_P = 15$, $n_{GS} = 5$; D: 0,18 % vs. 0,08 % mit $p = 0,004$, $n_P = 8$, $n_{GS} = 5$; E: 0,15 % vs. 0,08 % mit $p = 0,002$, $n_P = 8$, $n_{GS} = 5$). Bei Zeitpunkt C lag ein Unterschied von 0,17 % vs. 0,08 % vor, der mit $p = 0,051$ ($n_P = 10$, $n_{GS} = 5$) jedoch nicht signifikant war. Gezeigt sind jeweils der Mittelwert mit SEM der Patienten ($n = 16$) und der GS ($n = 5$), sowie der Gesamt-Mittelwert aller gesunden Probanden, mit dem die statistische Auswertung erfolgte (gepunktete Linie).

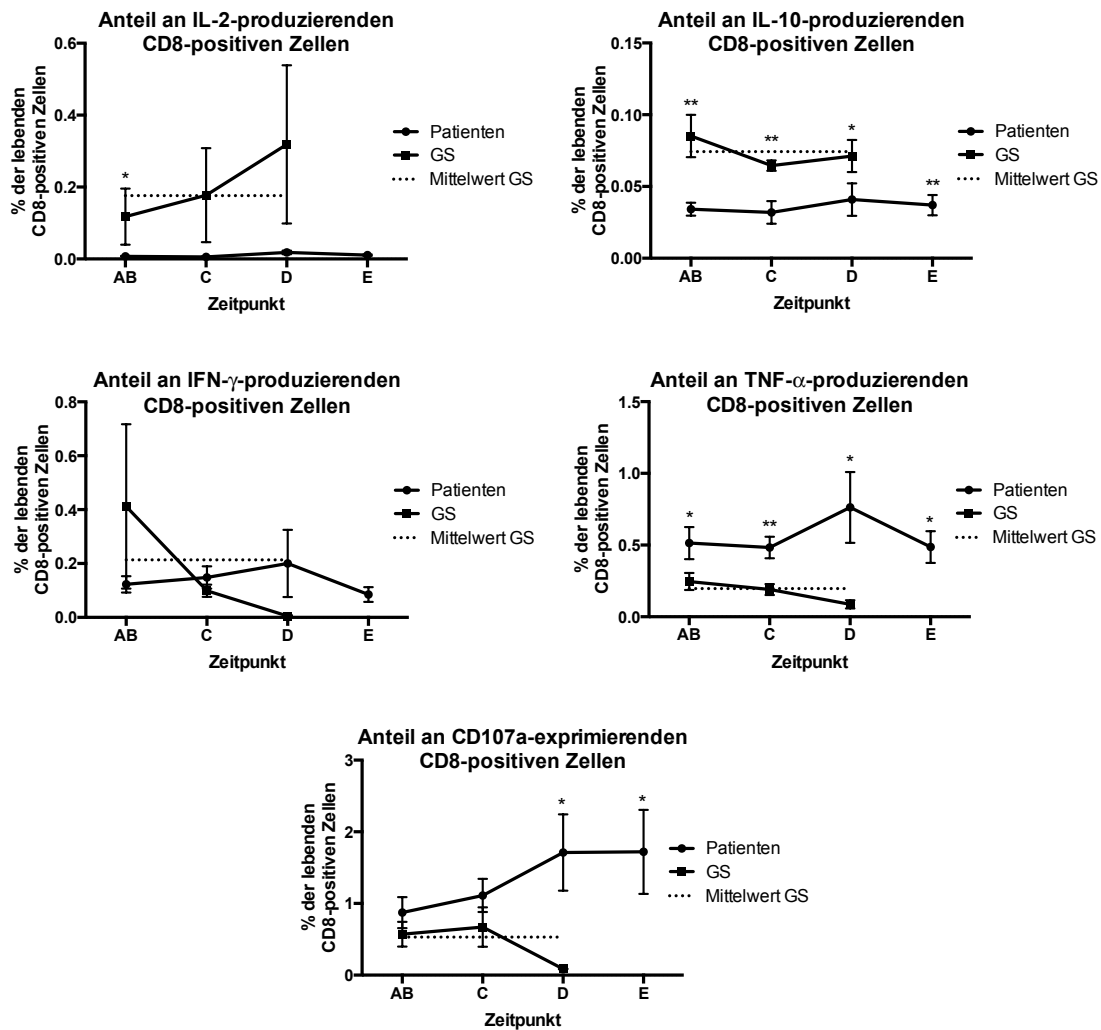


Abbildung 50: Vergleich der Anzahl basal Zytokin-produzierender CD8-positiver Zellen von Patienten und gesunden Probanden (nach Stimulation mit einem HIV-Peptid als Negativkontrolle für das ICS). Oben links: Lediglich am Zeitpunkt AB produzierten bei den Patienten signifikant weniger Zellen IL-2 als bei den GS (0,01 % vs. 0,18 % mit $p = 0,025$, $n_P = 15$, $n_{GS} = 5$). Oben rechts: Zu allen Zeitpunkten produzierten bei den Patienten weniger Zellen IL-10 als bei den GS (AB: 0,03 % vs. 0,07 % mit $p < 0,001$, $n_P = 15$, $n_{GS} = 5$; C: 0,03 % vs. 0,07 % mit $p = 0,001$, $n_P = 10$, $n_{GS} = 5$; D: 0,04 % vs. 0,07 % mit $p = 0,023$, $n_P = 8$, $n_{GS} = 5$; E: 0,04 % vs. 0,07 % mit $p = 0,003$, $n_P = 8$, $n_{GS} = 5$). Mitte links: Bezüglich der Produktion von IFN- γ konnte kein Unterschied zwischen Patienten und gesunden Probanden gezeigt werden. Mitte rechts: Zu allen Zeitpunkten produzierten bei den Patienten mehr Zellen TNF- α als bei den GS (AB: 0,51 % vs. 0,20 % mit $p = 0,025$, $n_P = 15$, $n_{GS} = 5$; C: 0,48 % vs. 0,20 % mit $p = 0,002$, $n_P = 10$, $n_{GS} = 5$; D: 0,76 % vs. 0,20 % mit $p = 0,019$, $n_P = 8$, $n_{GS} = 5$; E: 0,49 % vs. 0,20 % mit $p = 0,013$, $n_P = 8$, $n_{GS} = 5$). Unten: An den Zeitpunkten D und E exprimierten signifikant mehr Patientenzellen den CD107a-Marker als Zellen der GS (D: 1,71 % vs. 0,53 % mit $p = 0,029$, $n_P = 8$, $n_{GS} = 5$; E: 1,72 % vs. 0,53 % mit $p = 0,041$, $n_P = 8$, $n_{GS} = 5$). Bei den anderen Zeitpunkten konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Gezeigt sind jeweils der Mittelwert mit SEM der Patienten ($n = 16$) und der GS ($n = 5$), sowie der Gesamt-Mittelwert aller gesunden Probanden, mit dem die statistische Auswertung erfolgte (gepunktete Linie).

3.13. Zusammenfassung der Ergebnisse

3.13.1. Ergebnisse der Voruntersuchungen

Die Ergebnisse der Vortests ermöglichten eine gleichzeitige Färbung der Live/Dead-Aqua-Reagenz zusammen mit den extrazellulären Antikörpern und sprachen für IL-5 und gegen IL-4 als Marker für die T_H2-Zellen. Außerdem wurde die folgende Kombination der HLA-Peptid-Multimer-Qdot-Fluorochrome als für das Experiment als am besten geeignet eingeschätzt: EBV-BMLF1-Qdot585, Influenza-Matrix-Qdot605, EBV-LMP2-Qdot655 und CMV-pp65-Qdot705. Als Stimulationsagens für die Positivkontrolle des ICS wurde SEB ausgewählt. Eine exakte Darstellung der Ergebnisse der Voruntersuchungen findet sich unter 3.1.

3.13.2. Ergebnisse der Hauptversuche für die Patienten

Tabelle 26: Zusammenfassung der Ergebnisse für die Patienten aus den Hauptversuchen. Die jeweils verglichenen Zeitpunkte, sowie die verglichenen Probandenzahlen sind ebenfalls angegeben.

	Ergebnisübersicht	detaillierte Ergebnisse
Patientenzellen im Verlauf der RT	<ul style="list-style-type: none"> • Abnahme der Leukozytenzahlen über den Untersuchungszeitraum (Zeitpunkt AB vs. Zeitpunkt D; n = 5) • Abnahme der Lymphozyten von Zeitpunkt AB zu Zeitpunkt D, danach Erholung (Zeitpunkt E; n = 5) • Abnahme der T-Zellen von Zeitpunkt AB zu Zeitpunkt D (n = 18) <ul style="list-style-type: none"> ○ keine Änderung des CD4/CD8-Verhältnisses ○ Zunahme der regulatorischen T-Zellen von Zeitpunkt AB zu Zeitpunkt D (n = 18) • Abnahme der B-Zellen von Zeitpunkt AB zu Zeitpunkt D (n = 15), danach Erholung (Zeitpunkt E; n = 14) • entsprechende Zunahme der NK-Zellen (kontinuierlicher Anstieg über den Beobachtungszeitraum; $n_{AB \text{ vs. } D} = 18$; $n_{D \text{ vs. } E} = 15$) • Anstieg der Proliferationsrate bei fast allen untersuchten Populationen (von Zeitpunkt AB zu Zeitpunkt D; n = 18) • keine relevanten Veränderungen in der Apoptose- und Nekroserate • Differenzierung: <ul style="list-style-type: none"> ○ Abnahme des Anteils der naiven CD4-positiven Lymphozyten während der RT (Zeitpunkt AB vs. Zeitpunkt D; n = 17) ○ entsprechende Zunahme der differenzierten CD4-positiven Effektorzellen (Zeitpunkt AB vs. Zeitpunkt D; n = 17) • bei den Virus-spezifischen CD8-positiven Zellen lediglich Zunahme der Proliferationsrate bei den Zellen spezifisch für das EBV-BMLF1-Peptid von Zeitpunkt AB zu Zeitpunkt D (n = 11) • ICS: <ul style="list-style-type: none"> ○ mehr IL-17-produzierende CD4-positive Lymphozyten am Zeitpunkt E im Vergleich mit Zeitpunkt AB nach Stimulation mit SEB (n = 7) ○ ebenfalls mehr IFN-γ-produzierende CD4-positive Lymphozyten am Zeitpunkt E (verglichen mit Zeitpunkt AB) nach SEB-Stimulation (n = 7) ○ keine Veränderungen bei den übrigen Zytokinen und bei den CD8-positiven Lymphozyten, ebenso bei allen Tests mit den übrigen Stimulanzen (CMV-pp65, EBV-BMLF1, EBV-LMP2, Inf-Mat, HIV-RT) 	3.4. bis 3.9.

PSA-Verläufe	<ul style="list-style-type: none"> • PSA-Werte der Patienten ohne HAT (n = 4) nach RT bei $1 \pm 0,5$ ng/ml; Abfall als alleiniger Effekt der Bestrahlung zu werten • bei den Patienten mit HAT (n = 17) PSA-Werte zwischen 0,04 und 0,88 ng/ml nach der RT 	3.10.
Therapiegruppenvergleich: RT	<ul style="list-style-type: none"> • Patienten mit erweiterter RT hatten am Zeitpunkt E mehr NK-Zellen als Patienten mit der Standard-RT ($n_e = 5$; $n_s = 10$) • bei erweiterter RT an den Zeitpunkten C ($n_e = 5$; $n_s = 15$), D ($n_e = 5$; $n_s = 13$) und E ($n_e = 5$; $n_s = 10$) mehr aktivierte CD4-positive Lymphozyten • erhöhter Anteil an T_{reg}-Zellen an den Zeitpunkten D ($n_e = 5$; $n_s = 13$) und E ($n_e = 5$; $n_s = 10$) bei den Patienten mit zusätzlicher Becken-Bestrahlung • mehr naive $CD4^+$-Lymphozyten am Zeitpunkt E bei den Patienten mit erweitertem RT-Feld ($n_e = 4$; $n_s = 9$) • am Zeitpunkt E bei den Patienten mit erweiterter RT mehr lebende und weniger apoptotische und nekrotische Zellen ($n_e = 3$; $n_s = 7$) • vermehrt IL-2-produzierende CD4-positive Zellen nach SEB-Stimulation am Zeitpunkt E bei erweiterter Bestrahlung ($n_e = 3$; $n_s = 5$) 	3.11.2.
Therapiegruppenvergleich: HAT	<ul style="list-style-type: none"> • Differenzierung: <ul style="list-style-type: none"> ○ CD8-positive Lymphozyten: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Patienten ohne HAT hatten an den Zeitpunkten AB ($n_o = 4$; $n_{HAT} = 15$) und C ($n_o = 4$; $n_{HAT} = 14$) mehr naive Zellen ▪ Patienten ohne HAT hatten an den Zeitpunkten C ($n_o = 4$; $n_{HAT} = 14$) und E ($n_o = 2$; $n_{HAT} = 11$) weniger differenzierte Effektoren ○ EBV-BMLF1-spezifische CD8-positive Zellen: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Patienten ohne HAT hatten am Zeitpunkt C mehr naive Zellen ($n_o = 3$; $n_{HAT} = 11$) ▪ Patienten ohne HAT hatten am Zeitpunkt D mehr Effektor-Gedächtniszellen ($n_o = 2$; $n_{HAT} = 9$) • keine weiteren Erkenntnisse aus den übrigen Vergleichen 	3.11.3.
Therapiegruppenvergleich: Steroide	<ul style="list-style-type: none"> • erhöhter Anteil an B-Lymphozyten bei den Patienten mit Steroidtherapie am Zeitpunkt D ($n_{Ster} = 5$; $n_k = 13$) • erniedrigte Proliferationsrate bei den NK-Zellen der Patienten mit Steroidtherapie, ebenfalls am Zeitpunkt D ($n_{Ster} = 5$; $n_k = 13$) 	3.11.4.

3.13.3. Ergebnisse aus den Vergleichen von Patienten und gesunden Spendern

Spendern

Tabelle 27: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Vergleichen der Patienten mit den gesunden Probanden. Die Zeitpunkte, an denen die Unterschiede nachgewiesen werden konnten sind jeweils angegeben. Die Zahlen der verglichenen Probanden können den detaillierten Ergebnissen (3.12.1. bis 3.12.7.) entnommen werden.

	Ergebnisübersicht	detaillierte Ergebnisse
Altersstruktur	<ul style="list-style-type: none"> • mittleres Alter der Patienten: 74,05 Jahre (Median: 75 Jahre; Altersspanne 58 bis 82 Jahre) • mittleres Alter der GS: 54,83 Jahre (Median 52,5 Jahre; Altersspanne 49 bis 63 Jahre) 	3.12.1.
Zellzahlverläufe	<ul style="list-style-type: none"> • signifikant weniger Lymphozyten bei den Patienten als bei den GS zu den Zeitpunkten C, D und E • am Zeitpunkt E weniger T-Lymphozyten bei den Patienten • vermehrt aktivierte CD4⁺-Zellen bei den Patienten am Zeitpunkt D • bereits vor RT-Beginn (Zeitpunkt AB) signifikant weniger B-Lymphozyten bei den Patienten, im weiteren Beobachtungsverlauf durchweg niedrigere Werte als bei den GS • erhöhter Anteil an NK-Zellen bei den Patienten an den Zeitpunkten C, D und E 	3.12.2.
Proliferationsrate, Viabilität und Differenzierung	<ul style="list-style-type: none"> • Proliferation: <ul style="list-style-type: none"> ○ erhöhte Proliferationsraten bei den Zellen der Patienten im Bestrahlungsverlauf (Zeitpunkte C und D) in den Populationen der gesamten T-Zellen, der CD4- und CD8-positiven Lymphozyten, sowie der B-Zellen ○ erniedrigte Proliferationsraten bei den NK-Zellen der Patienten an den Zeitpunkten AB und E, an den Zeitpunkten C und D glich sich die Rate an die der GS an • Viabilität: <ul style="list-style-type: none"> ○ vermehrt apoptotische Zellen bei den Patienten vor RT-Beginn (Zeitpunkt AB) • Differenzierung: <ul style="list-style-type: none"> ○ geringerer Anteil an naiven CD4⁺-Lymphozyten am Zeitpunkt E ○ vermehrt Effektorgedächtniszellen unter den CD8⁺-Zellen der Patienten am Zeitpunkt D im Vergleich zu den GS 	3.12.3. bis 3.12.5.

Virus-spezifische CD8⁺-Zellen	<ul style="list-style-type: none"> • CMV-pp65-spezifische CD8-positive Zellen: <ul style="list-style-type: none"> ○ bei den Patienten am Zeitpunkt C erhöhte und am Zeitpunkt E erniedrigte Proliferationsrate im Vergleich mit den GS ○ mehr naive CD8-positive Zellen als bei den gesunden Probanden an den Zeitpunkten AB, C und D • EBV-BMLF1-spezifische CD8-positive Zellen: <ul style="list-style-type: none"> ○ weniger nekrotische Zellen bei den Patienten am Zeitpunkt AB ○ mehr hochdifferenzierte CD8⁺-Effektoren in der Patientenkohorte an den Zeitpunkten AB, C und E ○ ebenfalls mehr CD8-positive Effektor-Gedächtniszellen bei den Patienten an den Zeitpunkten AB, C und D ○ geringerer Anteil an CD8-positiven zentralen Gedächtniszellen bei den Patienten an den Zeitpunkten AB, C und D 	3.12.6.
ICS: SEB-Stimulation	<ul style="list-style-type: none"> • weniger IL-10-produzierende CD4-positive Zellen bei den Patienten am Zeitpunkt AB • weniger IFN-γ-produzierende CD4-positive Zellen bei den Patienten an den Zeitpunkten AB, C und D • weniger IL-10-produzierende CD8-positive Zellen bei den Patienten an den Zeitpunkten AB und D • erhöhte Expression von CD107a durch die CD8-positiven Zellen der Patienten an den Zeitpunkten AB und E 	
ICS: Virus-spezifische Stimulation	<ul style="list-style-type: none"> • Stimulation mit dem CMV-Peptid pp65: <ul style="list-style-type: none"> ○ erhöhte Anzahl an IL-2-produzierenden CD4⁺-Lymphozyten bei den Patienten am Zeitpunkt D ○ erhöhte Anzahl an IL-5-produzierenden CD4⁺-Lymphozyten bei den Patienten an den Zeitpunkten C und D ○ verminderte Zahl an IL-17-produzierenden CD4⁺-Zellen bei den Patienten am Zeitpunkt AB • Stimulation mit dem EBV-Peptid BMLF1: <ul style="list-style-type: none"> ○ weniger IL-10- und IL-17-produzierende CD4-positive Lymphozyten bei den Patienten am Zeitpunkt AB im Vergleich mit den GS ○ ebenfalls geringerer Anteil an IL-10-produzierenden CD8-positiven Zellen bei den Patienten an den Zeitpunkten AB, C und D 	3.12.7.

ICS: HIV-Stimulation (Negativkontrolle)	<ul style="list-style-type: none"> • mehr IL-5- und IFN-γ-produzierende CD4-positive Zellen bei den Patienten an allen Zeitpunkten • mehr TNF-α-produzierende CD4-positive Zellen bei den Patienten an den Zeitpunkten AB, D und E • weniger IL-10-produzierende CD4-positive Zellen bei den Patienten an allen Zeitpunkten • weniger IL-17-produzierende CD4-positive Zellen an den Zeitpunkten AB und C • weniger IL-2-produzierende CD8-positive Zellen bei den Patienten am Zeitpunkt AB • weniger IL-10-produzierende CD8-positive Zellen bei den Patienten an allen Zeitpunkten • mehr TNF-α-produzierende CD8-positive Zellen bei den Patienten an allen Zeitpunkten • erhöhte Expression von CD107a durch die CD8-positiven Zellen der Patienten an den Zeitpunkten D und E 	
--	---	--

4. Diskussion

4.1. Fragestellung

Mit dieser Arbeit soll die Auswirkung einer kurativen Radiotherapie bei lokalisiertem Prostatakarzinom auf das humane Immunsystem untersucht werden. Dazu wurde 21 Patienten zu vier Zeitpunkten während und nach RT Blut abgenommen um PBMC zu isolieren und zu charakterisieren. Aus den Experimenten sollen Rückschlüsse auf die T-, B- und NK-Zellen, sowie auf ausgewählte Immunzell-Subpopulationen gezogen werden. Ebenfalls wurde die Zytokinproduktion der CD4- und CD8-positiven Lymphozyten und somit die Zellfunktion untersucht. Mehrere Therapiegruppen wurden untereinander verglichen (Bestrahlung von Prostata + ggf. Samenblasenbasis (n = 16) vs. zusätzliche Bestrahlung des pelvinen Lymphabflusses (n = 5), HAT (n = 17) vs. keine HAT (n = 4)), darüber hinaus wurden die Resultate der Versuche mit den Patientenzellen mit den Ergebnissen von sechs gesunden Probanden aus einem ähnlichen Altersspektrum verglichen. Zusätzlich wurden die möglichen Auswirkungen des Einsatzes Steroid-haltiger Lokaltherapeutika, der bei manchen Patienten notwendig war, auf das Immunsystem evaluiert. Ebenfalls untersucht wurden die PSA-Verläufe der Patienten.

4.2. Methoden

4.2.1. PBMC-Isolierung und -Kryokonservierung

Die Isolierung der PBMC wurde größtenteils von Mitarbeitern der radioonkologischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt. Nach einer Studie von Bull et al. aus dem Jahr 2007 zeigen sich Unterschiede bezüglich des Zellüberlebens und der IFN- γ -Produktion im ELISpot bezüglich der Zeitdauer zwischen Blutentnahme und PBMC-Isolierung. Diese Zeit sollte optimalerweise acht Stunden nicht überschreiten, was bei den durchgeführten Zellisolierungen meist eingehalten wurde [169]. Die Zellen wurden im Anschluss an die Isolierung bei -80°C eingefroren und danach bis zur Durchführung des entsprechenden Experiments in der Gasphase eines Stickstofftanks bei ca. -196°C gelagert. Dadurch konnten alle Proben eines Patienten gleichzeitig untersucht werden. Werden die entsprechenden Zellen ohne Temperaturschwankungen und bei Temperaturen unter -130°C gelagert, so sind nach einer Studie von Germann et al. (2013) keine Eigenschaftsänderungen oder Funktionseinbußen zu erwarten [170]. Aufgrund mehrerer Studien (Britten et al., 2008; Janetzki et al., 2008) wurden die aufgetauten Zellen vor der Stimulation zum ICS über eine Nacht im Inkubator bei 37°C in Kulturmedium ruhen gelassen, da dadurch im ELISpot bessere Ergebnisse bezüglich der IFN- γ -Produktion erzielt werden konnten. Da im ICS ebenfalls IFN- γ und auch andere Zytokine produziert und detektiert werden sollten, erschien dieses Verfahren sinnvoll [171, 172].

4.2.2. Versuchsdurchführung

Beim Auftauen der benötigten Anzahl an eingefrorenen Zellröhrchen traten öfters Abweichungen nach unten in der Zellzahl verglichen mit den ursprünglich eingefrorenen Zellen in der radioonkologischen Klinik auf. Aufgrund der Organisation der Arbeit war es nicht möglich, die Blutproben direkt im immunologischen Institut, wo die Versuche später durchgeführt wurden, aufzubereiten und einzufrieren. Durch den Transport auf Trockeneis blieben die PBMC zwar gefroren, jedoch entstanden zwangsläufig Temperaturschwankungen, die sich nachgewiesenerweise negativ auf die

Zellviabilität auswirken [170]. Wünschenswert wäre es gewesen, die Zellen direkt am Ort der späteren Versuchsdurchführung im Stickstofftank einzulagern. Eventuell hätte ein Transport in mit Flüssigstickstoff gekühlten Behältern bessere Resultate erzielen können. Durch die geringen Zellzahlen - bei den Patienten nahm über den Bestrahlungszeitraum hinweg die Zahl der Leukozyten sowieso ab (siehe 3.4.1.) - konnten die Experimente nicht in mehreren Replikaten durchgeführt werden. Für eine erneute Studie sollte wenn möglich pro Patient und Zeitpunkt mehr Blut abgenommen werden, bestenfalls 100 ml (in der vorliegenden Arbeit wurde mit 50 ml pro Patient und Zeitpunkt gearbeitet), um eine Mehrfachtestung zu ermöglichen.

Die Auswahl der Färbeantikörper erfolgte nach einer Serie von Vorversuchen, die zum einen der Auswahl der Marker, zum anderen der Antikörpertitration und der Etablierung der Färbeprotokolle dienten. Nach intensiver Quellensuche zu NK-Zellen, T_{reg}-Zellen, Aktivierung, Differenzierung und Gedächtniszellen, Apoptose, Proliferation und Zytokinproduktion [7, 18, 26, 32, 33, 36, 173-179], sowie der Berücksichtigung der im Labor etablierten Färbeprotokolle, wurden die vier benutzten Antikörperpanels zusammengestellt (siehe Tabelle 28). Die Vorversuche mit PD-1 als Erschöpfungsmarker [180, 181] erbrachten keine zufriedenstellenden Ergebnisse, sodass der Untersuchung der Zellerschöpfung keine weitere Aufmerksamkeit geschenkt wurde.

Tabelle 28: Übersicht über die benutzten Antikörperpanels für die vier Färbeprotokolle. Von links nach rechts: Färbungen 1 - 3 und ICS (Färbung 4).

1) Zellgruppen und Proliferation	2) Apoptose und Nekrose	3) Zelldifferenzierung	4) Zytokinproduktion
Live/Dead-Aqua	AnnexinV-FITC	Live/Dead-Aqua	Live/Dead-Aqua
CD3-PaBlue	Propidiumiodid	CD4-APC-Cy7	CD4-APC-Cy7
CD19-BrilliantViolet650	CD4-APC-Cy7	CD8-PE-Cy7	CD8-Qdot605
CD4-APC-Cy7	CD8-PE-Cy7	CD45RA-PaBlue	IL-2-PE-Cy7
CD8-Qdot605	CMV-pp65-Qdot705	CD28-APC	IL-5-APC
CD25-APC	EBV-BMLF1-Qdot585	CCR7-PE	IL-10-PE
CD56-PE-Cy7	EBV-LMP2-Qdot655	CMV-pp65-Qdot705	IL-17-FITC
Foxp3-PE	Inf-Mat-Qdot605	EBV-BMLF1-Qdot685	IFN γ -AlexaFluor700
Ki67-AlexaFluor700	-	EBV-LMP2-Qdot655	TNF α -BrilliantViolet650
-	-	Inf-Mat-Qdot-605	CD107a-PaBlue
-	-	Ki67-AlexaFluor700	-

Die Testzeitpunkte (Zeitpunkte der jeweiligen Blutentnahme bei den Patienten) wurden folgendermaßen festgelegt: Zeitpunkt AB: Planungs-CT der RT bzw. Beginn der RT (nur bei vier Patienten wurden beide Blutentnahmen durchgeführt und der Mittelwert gebildet, bei allen anderen Patienten (n = 17) erfolgte nur eine Blutentnahme); Zeitpunkt C: RT-Halbzeit (ca. 39 Gy); Zeitpunkt D: letzter RT-Tag; Zeitpunkt E: drei Monate nach RT-Ende.

4.2.3. Benutzung von Isotyp-Kontrollen

In einer Studie aus dem Jahr 1998 von Keeney et al. [182] findet sich eine interessante Diskussion über den sinnvollen Einsatz von Isotyp-Kontrollen bei der Durchflusszytometrie. Auch während der Etablierung der Färbe-Panels für die durchflusszytometrischen Analysen dieser Arbeit wurde die Verwendung von Isotyp-Kontrollen erwogen und partiell umgesetzt (für die Marker CCR7, CD25 und Ki67). Prinzipiell wird von Keeney et al. diskutiert, dass die Benutzung von Isotyp-Kontrollen bei der Untersuchung von Lymphozyten nicht notwendig ist, bzw. sogar Unklarheiten in den Ergebnissen schaffen kann. Lediglich bei unklaren Grenzen zwischen der positiven und negativen Population scheinen Isotyp-Kontrollen sinnvoll. Daher wurde bei den o.g. drei Markern eine Isotyp-Kontrolle verwendet. Alternativ bietet sich auch eine

Blockade mit beispielsweise Maus-Serum an, um die noch freien Fc-Rezeptoren zu besetzen. Dies wurde in Vorversuchen getestet, es konnten jedoch keine besseren Ergebnisse erzielt werden. Zusätzlich zu den Isotyp-Kontrollen kann eine Probe mit ungefärbten Zellen zum Ausschluss der Zell-Autofluoreszenz mitgemessen werden [182]. Dies wurde in allen Versuchen durchgeführt.

4.2.4. Probleme durch die spektrale Überlappung bei der Durchflusszytometrie

Durch die Verwendung vieler verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe in den Experimenten ergab sich das Problem der spektralen Überlappung. Nach laborinternen Vorgaben sollte diese zwischen zwei Fluorochromen nicht mehr als 40 % betragen, was durch Austesten in Vorversuchen bei den Qdot-Fluorochromen (siehe 3.1.3.), durch gezielte Auswahl der übrigen Fluorochrome und durch Etablierung einer optimalen Filterkonfiguration des Durchflusszytometers (siehe 2.6.8.) erreicht wurde. Das Problem der spektralen Überlappung ist bereits seit Etablierung der Mehrfarben-Durchflusszytometrie bekannt. Schon im Jahr 1977 wurde von Loken et al. die Problematik in einer Publikation diskutiert [183]. Von Bagwell et al. wurde das Thema 1993 wieder aufgegriffen und auf mehrere Fluorochrome ausgeweitet [184]. Roederer publizierte im Jahr 2001 eine Studie zur Kompensation der spektralen Überlappung mittels Computer-gestützter Verfahren, die auch von der in der Arbeit verwendeten Software BD FACS Diva angewendet wurde [185]. In seltenen Fällen wurde bei den in der Arbeit durchgeführten Versuchen die von der Software erstellte Kompensationsmatrix noch manuell angepasst.

Bezüglich der Qdot-Fluorochrome bietet die Arbeit von Abrams et al. aus dem Jahr 2007 eine gute Übersicht mit weiteren Informationen zu dieser Fluorochrom-Art [186].

4.2.5. Auswertung

Die Auswertung der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen erfolgte mittels der Software FlowJo for Mac[®] V9.2 von Becton Dickinson. Die Auswahl der verschiedenen Zellpopulationen erfolgte nach der im Labor

üblichen Strategie. Beispielhaft ist dies für alle durchgeführten Versuche in 3.2.1. bis 3.2.4. gezeigt. Nach Auswahl der Einzelzellen im Plot FSC-H vs. FSC-A können im Plot SSC-A vs. FSC-A Monozyten und Lymphozyten gegeneinander abgegrenzt werden. Ursprünglich sollten auch die Monozyten in dieser Arbeit genauer betrachtet werden, jedoch ließ sich ihre Population in keiner der vier Färbungen eindeutig eingrenzen, weshalb von einer weiteren Auswertung Abstand genommen wurde.

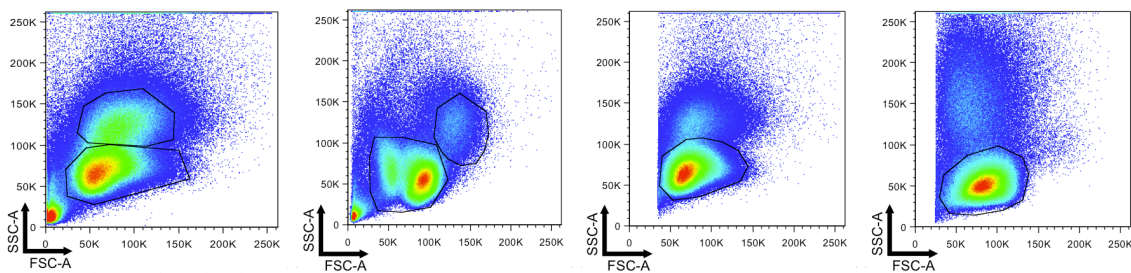


Abbildung 51: Differenzierung zwischen Lymphozyten und Monozyten bei der Auswertung der durchflusszytometrischen Daten. Im Plot SSC-A vs. FSC-A finden sich die Lymphozyten unten links, die Position der Monozytenpopulation variierte je nach Färbung (von links nach rechts: Färbung 1 - 3 und ICS, exemplarisch ist jeweils ein Patient bzw. GS gezeigt), unter anderem aufgrund der angepassten Spannungen für die FSC- und SSC-Messungen am Durchflusszytometer. Innerhalb der einzelnen Färbungen zeigte die Position von Proband zu Proband eine grobe Fluktuation, trotz hierbei jeweils gleich eingestellter Spannungen für die FSC- und SSC-Messungen. Daher wurde von einer weiteren Betrachtung der Monozyten abgesehen.

Die Abgrenzung zwischen positiver und negativer Population bei den einzelnen Markern wurde mittels ungefärbter, jedoch mitbehandelter Zellen, bzw. bei den Markern CCR7, CD25 und Ki67 mithilfe von Isotyp-Kontrollen durchgeführt (siehe auch 4.2.3.). Die folgende statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Office Excel 2011[®] für Mac, Version 14.4.1. (siehe auch 2.8.).

4.3. Ergebnisse

4.3.1. Verlauf der Leukozyten und Lymphozyten der Patienten

Wie in Abschnitt 3.4.1. gezeigt nahmen bei den Patienten die Zahlen der Leukozyten und Lymphozyten im peripheren Blut während der RT ab. Dieses Ergebnis war aufgrund bereits publizierter Studien zu erwarten [187-190]. Eine Leuko- bzw. Lymphopenie wird in der Klinik während bzw. nach einer Bestrahlungstherapie nicht selten gesehen. Anders als bei systemischen anti-

Tumor-Therapien (z.B. Chemotherapie) oder hämatologischen Grunderkrankungen, führt dies jedoch im Rahmen einer RT in der Regel nicht zur Reaktivierung infektiöser Erkrankungen. Eine antibiotische oder antimykotische Prophylaxe ist dementsprechend während der RT nicht vorgesehen. [191]. Keiner der in die Studie eingeschlossenen Patienten entwickelte eine infektiöse Erkrankung im Rahmen der RT. Der Abfall der Lymphozyten konnte auch beim Vergleich der durchflusszytometrischen Ergebnisse der Patienten mit den GS nachvollzogen werden (siehe 3.12.2.).

4.3.2. Einflüsse auf die T-Lymphozyten

Die T-Zell-Population unter den Lymphozyten nahm bei den Patienten während der RT leicht ab, wobei sich das Verhältnis zwischen CD4- und CD8-positiven Zellen nicht veränderte (siehe 3.4.2.). Ein Anstieg der T_{reg}-Zellen war jedoch zu verzeichnen, jeweils auch bezogen auf die vorhandenen CD4- und CD8-positiven Zellen. Bei Betrachtung der Proliferation konnte bei allen T-Zell-Populationen (gesamt, CD4-positiv, CD8-positiv, T_{reg}) ein deutlicher Anstieg des proliferierenden Zellanteils zum Ende der RT beobachtet werden. Einerseits lässt sich dies als Reaktion des Körpers auf die Zelldepletion durch die RT interpretieren, zum anderen könnte der Anstieg der Proliferationsrate eine direkte Auswirkung der Bestrahlung sein. Letzteres wurde für T_{reg}-Zellen von Persa et al. bereits gezeigt [192]. Bezüglich der Differenzierung der T-Zellen nahm der Anteil der naiven CD4-positiven Zellen ab, während die CD4_{eff}-Zellen anstiegen. Naive Zellen scheinen somit sensibler auf die Bestrahlung zu reagieren als bereits differenzierte Effektorzellen. Die unterschiedlichen Populationen der CD8-positiven T-Zellen erfuhren keine Veränderungen.

Beim Vergleich der beiden RT-Gruppen (Bestrahlung von Prostata + ggf. Samenblasenbasis (n = 16) vs. zusätzliche Bestrahlung des pelvinen Lymphabflussgebietes (n = 5), Ergebnisse siehe 3.11.2.) fiel eine vermehrte Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf den CD4-positiven Zellen der Patienten mit zusätzlicher Bestrahlung des Lymphabflussgebietes im Becken zu den Zeitpunkten C, D und E auf. Somit scheint ein größeres Bestrahlungsvolumen die Zellaktivität der CD4-positiven Zellen zu fördern. Auch bezüglich der T_{reg}-Zellen wurde zu den Zeitpunkten D und E eine höherer

prozentualer Anteil bei den Patienten mit der erweiterten RT gefunden. Eine erweiterte RT bedeutet im Umkehrschluss jedoch auch einen lokal weiter fortgeschrittenen Tumor [127], sodass diese Auswirkungen sowohl auf die vermehrte Strahlenbelastung, als auch auf den größeren Einfluss des Tumors zurück geführt werden können. Letzteres erscheint hingegen eher unwahrscheinlich, da eine Veränderung bereits vor Beginn der RT (Zeitpunkt AB) vorhanden sein müsste. Eine vermehrte Anzahl von T_{reg}-Zellen bedeutet eine verstärkte hemmende Wirkung auf das Immunsystem [23, 193, 194] und stellt somit auch einen Teil des Immun-Edittings (siehe 1.1.5.) dar [195]. Letztendlich wurden Funktion und Aktivität der T_{reg}-Zellen jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, sodass eine abschließende Aussage zu dieser Immunzell-Population nicht möglich ist. Eine genauere Beobachtung und Funktionsanalyse der regulatorischen Immunzellen in Bezug auf die Fragestellung der Arbeit erscheint sinnvoll und sollte in einer weiteren Studie durchgeführt werden.

Der letzte detektierte Unterschied zwischen den beiden RT-Gruppen war die verschiedene Zellviabilität der CD4-positiven Zellen am Zeitpunkt E. Die Patienten mit erweiterter RT hatten hier anteilmäßig signifikant mehr lebende und sowohl weniger apoptotische als auch nekrotische Zellen. Da der Zeitpunkt E etwa drei Monate nach Bestrahlungsende liegt, kann diese Differenz als eine vermehrte Erholung der Zellen auf die größere integrale Dosisbelastung gesehen werden (Hypothese: Die erweiterte RT zerstört mehr Immunzellen als die Standard-RT, infolgedessen erfolgt nach Behandlungsende (Zeitpunkt E) eine vermehrte Neuproduktion von CD4-positiven Zellen bei den Patienten mit dem größeren RT-Volumen). Interessanterweise stieg der Anteil der naiven CD4-positiven Lymphozyten bei den Patienten mit erweiterter RT zum Zeitpunkt E ebenfalls signifikant an. Betrachtet man diese beiden Beobachtungen im Zusammenhang, so wird die Erklärung durch den Erholungseffekt noch plausibler.

Beim Vergleich der beiden Gruppen unterschieden nach HAT (durchgeführte Hormontherapie (n = 17) vs. keine Hormontherapie (n = 4)) konnten lediglich für die Differenzierung der CD8-positiven Zellen Unterschiede festgestellt werden.

An den Zeitpunkten AB und C wiesen die Patienten ohne HAT mehr naive Zellen auf, als die Gruppe mit Androgendeprivation (siehe 3.11.3.). Der Unterschied am Zeitpunkt AB kann durchaus durch die HAT hervorgerufen werden, da diese in der Regel zwei bis drei Monate vor RT-Beginn eingeleitet wird. Zu diskutieren ist jedoch auch die erhöhte Tumorlast bei den Patienten mit HAT als Auslöser. Eine finale Aussage diesbezüglich ist mit den durchgeführten Versuchen nicht möglich. Beim Zeitpunkt C muss durch die bereits begonnene RT von einer multifaktoriellen Genese des Unterschieds ausgegangen werden. Die Werte für die differenzierten Effektoren der CD8-positiven Zellen wiesen zwar auch Unterschiede zwischen den beiden Therapiegruppen auf, schwankten jedoch sehr stark, sodass eine weitere Interpretation unterblieb. Zum Abschluss erfolgte der Vergleich zwischen den Patienten und den GS (siehe 3.12.2. bis 3.12.5.). Bei Betrachtung aller T-Zellen fiel die aufgrund mehrerer Studien erwartete Abnahme der Gesamtpopulation zum Zeitpunkt E bei den Patienten auf [190, 196, 197]. Die o.g. vermehrte Aktivität (detektiert über den Oberflächenmarker CD25) der CD4-positiven Lymphozyten der Patienten mit der höheren integralen Strahlendosis konnte nun im Vergleich aller bestrahlten Patienten mit den GS nachvollzogen werden, da am Zeitpunkt D ebenfalls ein signifikanter Aktivitätsunterschied zwischen den beiden Gruppen bestand. Die Zellen der Patienten zeigten dabei einen höheren Anteil an aktivierten Zellen. Die für die Proliferation festgestellten Veränderungen innerhalb der Patientenzellen (Zunahme über den Bestrahlungszeitraum) konnten auch im Vergleich zu den gesunden Spendern - außer für die T_{reg}-Zellen, hier zeigten sich keine Unterschiede in der Proliferationsrate - nachvollzogen werden. Bezüglich der Differenzierung der Lymphozyten ließ sich sowohl für die CD4- als auch für die CD8-positiven Zellen jeweils ein Unterschied zwischen Patienten und GS erkennen: Während bei den CD4-positiven Zellen der Anteil der naiven Zellen bei den Patienten zum Zeitpunkt E deutlich abnahm, war der Anteil der Effektorgedächtniszellen unter den CD8-positiven Lymphozyten am Zeitpunkt D signifikant höher als bei den GS. Eine ähnliche Entdeckung wurde bereits von Tabi et al. im Jahr 2010 publiziert. In deren Arbeit wird die vermehrte Abnahme der naiven Zellen bzw. die Persistenz

der CD45RA-negativen Zellen auf eine Apoptoseresistenz der Gedächtniszellen zurückgeführt, was nach der durchgeführten Arbeit nachvollziehbar erscheint [198].

4.3.3. Auswirkungen auf die B-Zellen

Auch die B-Lymphozyten der Patienten erfuhren im Laufe der RT einen signifikanten Rückgang unter den Lymphozyten (siehe 3.4.3.). Dies wurde bereits in einer Studie aus den 1980er-Jahren beschrieben [199]. Eine weitere Arbeit befasste sich bereits damals mit der Produktion von Antikörpern nach RT. Für die Klassen IgG, IgA und IgM wurde dabei ein signifikanter Rückgang verzeichnet [200]. In einer neueren Studie aus dem Jahr 1999 wurden von Louagie et al. ebenfalls die Auswirkungen einer externen Bestrahlung auf die Lymphozytengruppen beschrieben und sowohl die in der durchgeführten Arbeit gefundenen, als auch die eben genannten Ergebnisse bestätigt [201]. Im Anschluss an die RT erholten sich die B-Zellen im Gegensatz zu den T-Lymphozyten sehr schnell wieder. Äquivalent zu den bereits oben beschriebenen Veränderungen der T-Zellen bezüglich der Proliferationsrate, wurde auch bei Betrachtung der B-Zellen ein, durch den Zelniedergang bedingter, erhöhter Anteil an proliferierenden Zellen gesehen.

Im Vergleich mit den gesunden Probanden fiel auf, dass sich die B-Zell-Zahlen zu allen Zeitpunkten, auch bereits am Zeitpunkt AB, signifikant unterschieden. Im Blut der Patienten waren durchweg prozentual weniger B-Lymphozyten vorhanden als bei den GS. Die oben beschriebene ansteigende Proliferationsrate bei den B-Lymphozyten der Patienten konnte, im Vergleich mit den GS, ebenfalls nachvollzogen werden. Spînu et al. publizierten im Jahr 2014 ähnliche Veränderungen der B-Zell-Population für Patienten mit einer benignen Prostatahyperplasie (BPH). Die Proliferationsrate wurde jedoch nicht untersucht [202].

4.3.4. Einflüsse auf die NK-Zellen

Im Gegensatz zu den T- und B-Lymphozyten nahm der Anteil der NK-Zellen unter den Lymphozyten zu (siehe 3.4.4.). Dies erscheint jedoch logisch, da es sich um prozentuale Anteile handelt, sodass bei der Abnahme zweier

Populationen zwangsläufig die dritte ansteigen muss. In Anbetracht des Absinkens der absoluten Lymphozytenzahlen der Patienten (gezeigt in 3.4.1.) wäre es jedoch möglich, dass die absolute Anzahl der NK-Zellen dennoch etwas abnimmt. Von Louagie et al. wurden die NK-Zellen unter den Lymphozyten als am wenigsten strahlensensibel beschrieben [201]. Werden lediglich die funktionsfähigen NK-Zellen unter den Lymphozyten betrachtet (charakterisiert als $CD3^+CD19^-CD56^+$) [18], so stiegen diese über den gesamten Beobachtungszeitraum anteilmäßig an (verglichen wurden die Zeitpunkte AB und E). Diese Beobachtung ist vereinbar mit der Aussage von Yang et al. in ihrer Studie von 2013, in der die Verstärkung eines anti-Tumor-Effekts der NK-Zellen durch eine Bestrahlung beschrieben wird [203]. Bezüglich der Proliferation wurden bei alleiniger Betrachtung der Patienten-NK-Zellen (sowohl CD56-positiv als auch -negativ) ähnliche Beobachtungen wie für die B- und T-Lymphozyten gemacht.

Im Therapiegruppenvergleich bezüglich der unterschiedlichen RT-Volumina fiel auf, dass am Zeitpunkt E die Patienten mit der erweiterten RT etwas mehr NK-Zellen im peripheren Blut aufwiesen. Durch die erhöhte Strahlenresistenz [201] konnten die NK-Zellen im Gegensatz zu den übrigen Lymphozytenpopulationen der höheren integralen Strahlendosis besser standhalten. In den nach HAT unterschiedenen Therapiegruppen gab es bezüglich der NK-Zellen keine signifikanten Unterschiede, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Androgendeprivation keine Auswirkungen auf die Population der NK-Zellen hat. Ein statistischer Unterschied bezüglich des Anteils der NK-Zellen an den Lymphozyten konnte zwischen den Patienten und den GS gezeigt werden. Zu den Zeitpunkten C bis E war der NK-Anteil bei den Patienten höher als bei den GS, was durch den Abfall der T- und B-Lymphozytenpopulation zu erklären ist. Ein Unterschied bezüglich der CD56-Expression zeigte sich nicht, sodass die RT die Funktionalität der NK-Zellen scheinbar nicht beeinflusst. Bezüglich der Proliferation wurde für die NK-Zellen der Patienten im Vergleich mit den GS eine andere Beobachtung als für die T- und B-Lymphozyten gemacht: Ein Unterschied war nur an den Zeitpunkten AB und E zu erkennen. Zu diesen Zeitpunkten lag die Proliferationsrate bei den Patienten jeweils signifikant unter

der der GS. Durch die RT wurde, wie bei den anderen Lymphozytenarten auch, die Proliferationsrate der NK-Zellen angehoben, und zwar in etwa auf das Niveau der GS (siehe 3.12.3.). Da laut Yang et al. die Aktivität der anti-Tumor-Antwort der NK-Zellen durch eine Bestrahlung angeregt und verstärkt wird [203], könnte auch die verstärkte Proliferation der NK-Zellen während der RT (Zeitpunkte C und D) auf eine solche zurückgeführt werden. Patienten mit einem PCa, die sich im Moment nicht einer RT unterziehen scheinen den Ergebnissen zufolge eine niedrigere NK-Zell-Proliferationsrate aufzuweisen.

4.3.5. Veränderungen bei den Virus-spezifischen CD8-positiven Zellen

Die Betrachtung von Virus- bzw. Peptid-spezifischen CD8-positiven Zellen erfolgte zur Simulation der Beobachtung von Tumor-spezifischen CD8-positiven Zellen, da durch Feyerabend et al. bereits in Form von Peptidvakzinierungen (siehe 1.2.5.) Klasse-I-Immunantworten gegen Prostatakrebs ausgelöst werden konnten. Diese werden über die T_K -Zellen vermittelt [128].

Die Anteile der jeweiligen antigenspezifischen CD8-positiven Zellen an der Gesamtheit der CD8-positiven Lymphozyten wurde durch die RT nicht signifikant beeinflusst (siehe 3.8.2.). Bezüglich der EBV-BMLF1-spezifischen Zellen (n = 11) konnte für die Proliferationsrate, ebenfalls wie für die anderen bereits beschriebenen Zellpopulationen, ein Anstieg während der RT verzeichnet werden. Die unterschiedlichen Differenzierungsstufen änderten sich durch die Bestrahlung nicht (siehe 3.8.5.). Interessant hierbei waren die verschiedenen Zusammensetzungen der Differenzierungsstufen je nach untersuchtem Antigen. Während nach einer Studie von Appay et al. aus dem Jahr 2002 die Zusammensetzung der Differenzierungsstufen bei akuten Virusinfektionen - auch bei unterschiedlichen Viren - ähnlich ist, so verändert sich diese bei einem Übergang in eine chronische Infektion. Im Vergleich traten in der Population der CMV-spezifischen CD8-positiven Zellen mehr „spätere“ Differenzierungsstufen auf als bei den EBV-spezifischen Zellen. Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit vor allem bei Vergleich der CMV-pp65-spezifischen Zellen mit den EBV-LMP2-spezifischen Zellen erkannt werden [204]. Eine Studie von Iancu et al. aus dem Jahr 2009 bestätigt ebenfalls diese Ergebnisse [205].

Im Vergleich mit den gesunden Probanden wurden bezüglich der Virus-spezifischen CD8-positiven Zellen nur mäßig relevante Unterschiede festgestellt (siehe 3.12.6.). Die Proliferationsrate der CMV-spezifischen Zellen der Patienten (n = 7) stieg unter der RT im Vergleich zu den GS (n = 3) an. Bezüglich der Zellviabilität konnten keine Unterschiede erkannt werden, weshalb davon auszugehen ist, dass die antigenspezifischen Zellen im Allgemeinen nicht in größerem Maße durch die Bestrahlung zu Schaden kommen als die gesamte Lymphozytenpopulation der Patienten.

4.3.6. Auswirkungen auf die Zellfunktion und Zytokinproduktion

Bei Betrachtung der Patientenzellen im ICS fielen bezüglich der Zytokinproduktion keine wesentlichen Veränderungen auf. Die RT scheint die Zellfunktion der Lymphozyten somit nicht einzuschränken. Lediglich nach der Stimulation mit SEB (als Positivkontrolle) konnte in der Population der CD4-positiven Lymphozyten zum Zeitpunkt E eine vermehrte Produktion von IL-17 und IFN- γ erkannt werden (siehe 3.9.2.). Bei den CD8-positiven Zellen trat keine Veränderung auf. Dies ist an sich positiv zu werten, da IFN- γ maßgeblich zur immunologischen Bekämpfung von Tumoren beiträgt und dazu unter anderem CD8-positive T-Zellen rekrutiert [206]. Diese Funktion wird durch die RT folglich nicht eingeschränkt. Die vermehrte Produktion von IL-17 spricht ebenfalls für eine Immunaktivierung [43]. Eine Veränderung wurde jedoch nur bei der Stimulation mit SEB - einem starken Stimulans [207] - detektiert. Ob bei tumorspezifischer Stimulation ebenfalls eine vermehrte IFN- γ -Produktion vorliegt, bleibt fraglich und muss noch genauer untersucht werden.

Im Vergleich zwischen den beiden Therapiegruppen unterschieden bezüglich der RT konnten nach Stimulation mit dem EBV-Peptid BMLF1 Unterschiede am Zeitpunkt AB gefunden werden. Unter den CD4-positiven Lymphozyten der Patienten mit erweiterter RT (n = 2) war der Anteil an IL-2-produzierenden Zellen signifikant höher als bei den Patienten mit der Standard-Bestrahlung (n = 7). Im Gegensatz dazu hatten letztere mehr TNF- α -produzierende CD8-positive Lymphozyten. Diese Unterschiede traten jedoch vor Therapiebeginn auf und können somit nicht auf die unterschiedliche RT zurück geführt werden. Möglich

wäre jedoch, dass sie durch die unterschiedliche Aggressivität der Tumoren bedingt sind.

Zuletzt erfolgte auch hier die Betrachtung der Unterschiede zwischen den Patienten und den gesunden Probanden. Dabei wurden verschiedene Abweichungen entdeckt, die in der folgenden Tabelle 29 zusammengefasst sind.

Tabelle 29: Zusammenfassung der relevanten Ergebnisse aus dem ICS im Vergleich von Patienten und gesunden Probanden, für die detaillierten Ergebnisse siehe 3.12.7.

Stimulans im ICS	CD4-positive Lymphozyten	CD8-positive Lymphozyten
SEB	<ul style="list-style-type: none"> • Zeitpunkt AB: weniger IL-10-produzierende Zellen bei den Patienten • Zeitpunkte AB bis D: weniger IFN-γ-produzierende Zellen bei den Patienten 	<ul style="list-style-type: none"> • Zeitpunkte AB und D: weniger IL-10-produzierende Zellen bei den Patienten
CMV-pp65	<ul style="list-style-type: none"> • Zeitpunkt D: mehr IL-2-produzierende Zellen bei den Patienten • Zeitpunkte C und D: mehr IL-5-produzierende Zellen bei den Patienten 	-
EBV-BMLF1	<ul style="list-style-type: none"> • Zeitpunkt AB: weniger IL-10-produzierende Zellen bei den Patienten • Zeitpunkt AB: weniger IL-17-produzierende Zellen bei den Patienten 	<ul style="list-style-type: none"> • Zeitpunkte AB bis D: weniger IL-10-produzierende Zellen bei den Patienten

Stimulans im ICS	CD4-positive Lymphozyten	CD8-positive Lymphozyten
HIV-RT	<ul style="list-style-type: none"> • Zeitpunkte AB bis E: mehr IL-5-produzierende Zellen bei den Patienten • Zeitpunkte AB bis E: weniger IL-10-produzierende Zellen bei den Patienten • Zeitpunkte AB bis E: mehr IFN-γ-produzierende Zellen bei den Patienten • Zeitpunkte AB, D und E: mehr TNF-α-produzierende Zellen bei den Patienten 	<ul style="list-style-type: none"> • Zeitpunkte AB bis E: weniger IL-10-produzierende Zellen bei den Patienten • Zeitpunkte AB bis E: mehr TNF-α-produzierende Zellen bei den Patienten

Die bei beiden Zellarten zu manchen Zeitpunkten geringere Produktion von IL-10 durch die Patientenzellen ist aufgrund der hemmenden Wirkung dieses Interleukins auf das Immunsystem als positiv zu werten. Ebenfalls in diese Richtung weist die verstärkte Produktion von IL-2 und TNF- α durch die Patientenzellen, da diese zwei Zytokine die Immunantwort verstärken (siehe Abschnitt 1.1.4.). Dem IFN- γ wird auch explizit eine anti-tumoröse Wirkung zugeschrieben (s.o.). Seine Produktion durch die CD4-positiven Zellen der Patienten war im Vergleich mit den GS zwar eingeschränkt, bei den CD8-positiven Zellen, die für die eigentliche Tumorabwehr zuständig sind, konnten allerdings keine Unterschiede nachgewiesen werden. Die RT scheint somit die Zellfunktion der Immunzellen, sowie die Voraussetzungen für eine Immunantwort gegen einen Tumor, nicht einzuschränken. Die direkte anti-tumoröse Immunreaktion wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht. Sogar nach Stimulation mit dem HIV-Peptid als Negativkontrolle ließ sich ein gewisser Grad an Immunaktivierung erkennen.

Auch für die nach CMV-pp65-Stimulation an zwei Zeitpunkten aufgetretene erhöhte Anzahl von IL-5-produzierenden CD4-positiven Lymphozyten unter den Patientenzellen ($n_P = 5$; $n_{GS} = 2$) gibt es eine bereits 2002 von Keilholz et al. publizierte Erklärung. Bei an Tumoren erkrankten Individuen wurde von der Arbeitsgruppe eine Veränderung des Gleichgewichts zwischen der Th1- und

der Th2-Immunantwort zugunsten der Th2-Antwort beschrieben, die somit auch hier nachvollzogen werden kann [208]. IL-5 wurde bereits in den Vorversuchen dieser Arbeit als Marker für die Th2-Zellen ausgewählt (siehe 3.1.2.) und gilt nachgewiesenerweise als Zytokin der Th2-Zellen [42].

4.3.7. Veränderungen durch die lokale Applikation von Steroiden am Enddarm

Patienten mit einer systemischen immunsuppressiven Therapie wurden grundsätzlich nicht in das Patientenkollektiv der Studie aufgenommen, da der Effekt immunsuppressiver Medikamente auf die zu untersuchenden Zellen zu groß ist und somit keine Erkenntnisse zur Auswirkung der RT auf die Immunzellen gewonnen hätten werden können. Bei manchen Patienten war es aufgrund von inflammatorischen Nebenwirkungen der Bestrahlung am Enddarm jedoch nötig, lokal mit Steroiden zu therapieren. Nach einer Studie von Sanguineti et al. käme alternativ das Medikament Sucralfat in Frage. Letzteres wirkt als Aluminiumsalz nur lokal zytoprotektiv und zeigt somit deutlich geringere Auswirkungen auf das Immunsystem [209-211].

Bei den Patienten, die eine lokale Steroidtherapie erhielten ($n = 5$) bestand prinzipiell die Gefahr von systemischen Wirkungen auf die untersuchten Immunzellen. Am Enddarm eingesetzte Steroide können ohne einen so genannten First-pass-Effekt in der Leber direkt in den systemischen Blutkreislauf gelangen. Daher wurden erneut zwei Gruppen unter den Patienten gebildet ($n_{\text{Ster}} = 5$; $n_k = 16$) und diese auf Unterschiede in der Zusammensetzung und Funktion der Lymphozyten untersucht. Unterschiede zeigten sich in einem erhöhten Anteil der B-Lymphozyten der Patienten mit Steroidtherapie an den Zeitpunkten D und E, sowie in einer verringerten Proliferationsrate der CD56-positiven NK-Zellen bei den Patienten mit Applikation von Steroiden am Zeitpunkt D (siehe 3.11.4.). Die Steroide wurden vermehrt gegen Ende der RT eingesetzt, sodass auch nur an diesen Zeitpunkten Abweichungen zu erwarten waren. Um den Effekt genauer zu klären und ggf. gegenüber einem anderen Medikament wie Sucralfat (s.o.) abzugrenzen, müsste eine speziell hierfür konzipierte Studie durchgeführt werden.

Ein weiterer Ansatz für die gefundenen Unterschiede ist die als Indikation für die Steroid-Therapie zugrunde liegende vermehrte Inflammation, die hier als möglicher Confounder mit einem eigenen Einfluss auf das Immunsystem zu werten ist.

4.3.8. Auswirkungen der HAT auf das Immunsystem

Die unter 3.11.3. dargestellten Ergebnisse aus dem Vergleich der Patienten mit HAT (n = 17) gegen die Patienten ohne eine Hormontherapie (n = 4) zeigten lediglich leichte Unterschiede in den Differenzierungsstufen der CD8-positiven Lymphozyten (weniger naive, dafür mehr hochdifferenzierte Effektorzellen bei den Patienten mit HAT). Eine weitergehende Beeinflussung und Beeinträchtigung des Immunsystems durch die Androgendeprivation erscheint somit unwahrscheinlich.

4.3.9. Interpretation der PSA-Verläufe

Prinzipiell fand die Abnahme des PSA-Werts zu einem großen Teil erst nach Ende der RT statt. Dies wurde bereits in verschiedenen Untersuchungen gezeigt [212, 213]. Eine Erklärung dafür ist die Zerstörung von Prostatagewebe durch die RT, was den PSA-Wert zunächst ansteigen lässt. Beispielsweise bei Entzündungen der Prostata steigt der PSA-Wert ebenfalls an [214]. Durch die Strahleneinwirkung werden in den Prostatazellen, sowie in den Tumorzellen, DNA-Schäden ausgelöst, die erst im Verlauf zu einem Absterben der Zellen führen, was den verzögerten PSA-Abfall bedingt [215, 216].

Bei den PSA-Verläufen der Patienten waren Unterschiede zwischen den Gruppen mit und ohne HAT erkennbar. Die HAT führte dabei im Vergleich zu den Patienten ohne Androgendeprivation zu niedrigeren PSA-Werten bei den entsprechenden Patienten (siehe 3.10.2.). Dies erscheint logisch, da durch den Androgenentzug den Prostatazellen der Wachstums- und Proliferationsreiz genommen wird, und wird im klinischen Alltag auch regelmäßig so beobachtet. Ein postinterventionell niedriger PSA-Wert wird von mehreren publizierten Studien als positiver Prognosefaktor für den Therapieerfolg beim Prostatakrebs gesehen [217-221].

Auswirkungen auf das Immunsystem im Zusammenhang mit den PSA-Werten wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. Eine Aussage zur Immuntherapie in Bezug auf die PSA-Werte ist somit nicht möglich.

4.4. Schlussfolgerung

Eine therapeutische Vakzinierung gegen Prostatakrebs wurde bereits in mehreren Studien durchgeführt (siehe auch 1.2.5.). Als Impfstoffe wurden dafür verschiedene Stoffklassen erprobt, dazu zählen unter anderem genetisch veränderte Pockenviren [222-224], DNA-Plasmide [225], Peptide [128], sowie mRNA-Moleküle. Letztere werden auch an der Universität Tübingen in Zusammenarbeit mit der CureVac GmbH erforscht und derzeit im Rahmen einer Phase-IIb-Studie an der urologischen Universitätsklinik eingesetzt [142, 226, 227]. Die Kombinationsmöglichkeiten einer therapeutischen Immunisierung mit der primären Strahlentherapie wurden bisher kaum untersucht. Die vorliegende Arbeit wurde durchgeführt, um möglichst den optimalen Zeitpunkt für den Beginn einer Immuntherapie im Rahmen der RT-Behandlung zu definieren.

Nach Sichtung und Interpretation aller erhobenen Daten ist die Kombination der primären Radiotherapie mit einer immuntherapeutischen Peptidvakzinierung beim lokalisierten Prostatakarzinom auf jeden Fall möglich und sollte in weiteren Studien getestet werden. Das humane Immunsystem wird durch die örtlich beschränkte Bestrahlung der Prostata nicht übermäßig supprimiert, sodass eine Immunantwort gegen die im Vakzinierungscocktail vorhandenen Tumorpeptide erfolgen kann (siehe auch 1.2.5.). Für diverse andere maligne Erkrankungen wurde die Möglichkeit der kombinierten Therapie bereits durch verschiedene Studien nachgewiesen [228, 229].

Während der laufenden RT konnte eine Depletion der meisten Immunzell- Populationen nachgewiesen werden (siehe 3.4.), was eine Immuntherapie im Anschluss an die radiotherapeutische Behandlung sinnvoll erscheinen lässt. Der Beginn sollte folglich nach der Erholungsphase - ab drei Monaten postradiotherapeutisch - geplant werden. Alternativ erscheint ein überlappendes Protokoll sinnvoll, bei dem die erste Vakzinierung bereits gegen

Ende der RT appliziert werden würde, um die zu diesem Zeitpunkt erhöhte Proliferationsrate für die anti-tumoröse Immunantwort auszunutzen. Ein weiteres Argument für einen früheren Beginn mit der Immuntherapie wäre die zu diesem Zeitpunkt noch nicht erfolgte Polarisierung der Th2-Zellen (siehe 4.3.6.). Die erste Applikation des immuntherapeutischen Verfahrens sollte demnach jedoch vor Zeitpunkt C, also in der ersten RT-Hälfte, liegen, was in Anbetracht der übrigen Ergebnisse nicht sinnvoll erscheint.

In einer Studie von Harris et al. aus dem Jahr 2008 wurde eine ähnliche Fragestellung im Mausmodell untersucht. Die besten Ergebnisse bezüglich einer Immunantwort auf die applizierte Immuntherapie (Therapie mit rekombinanten Vaccinia-Viren) konnten für eine Applikation nach RT-Ende gewonnen werden [230]. Ein Procedere mit Impfung vor der Bestrahlung wird dagegen in einer Studie von Tabi et al. aus dem Jahr 2010 vorgeschlagen, in der Tumorantigen-spezifische T-Zellen von an PCa erkrankten Patienten untersucht wurden. Dabei soll die Immunreaktion gegen das Karzinom vor der RT initiiert und durch die Bestrahlung verstärkt werden [198]. Unter den CD4-positiven Lymphozyten fanden sich in der durchgeführten Arbeit vor RT-Beginn mehr naive Zellen, die auf eine Vakzinierung reagieren können. Während der RT konnte eine verstärkte Aktivierung des entsprechenden Zelltyps im Vergleich zu den gesunden Probanden gezeigt werden (erhöhte CD25-Expression der CD4-positiven Lymphozyten am Zeitpunkt D), außerdem nahm der Anteil der differenzierten CD4⁺-Effektorzellen während der RT zu. Die Argumentation der zitierten Studie kann somit ebenfalls nachvollzogen werden, jedoch spricht aufgrund der Gesamtschau der gefundenen Ergebnisse mehr für einen späteren Beginn der Immuntherapie.

Bei den Patienten mit der erweiterten Bestrahlung wurde ein signifikant höherer Grad der Aktivierung unter den CD4-positiven Zellen gefunden (vermehrte CD25-Expression), was - in einem Protokoll mit überlappender Radio-Immunotherapie - für eine bessere Wirkung bei Patienten mit weiter fortgeschrittenen Krebsstadien spricht. In zwei Studien von Baxevanis et al. und Trojan et al. wurde jedoch vermutet, dass eine Vakzinierung bei Patienten mit weniger aggressiven Tumoren besser wirkt [231, 232]. Die Wirkung einer

Vakzinierung wurde in der durchgeführten Arbeit jedoch nicht untersucht, da die eingeschlossenen Patienten eine alleinige Radiotherapie erhielten. Somit können die Aussagen der beiden Studien weder unterstützt noch widerlegt werden.

Die produzierten Zytokine der T-Lymphozyten wurden durch die RT in Richtung der proinflammatorischen und anti-tumorös wirkenden Gruppe (IL-2, TNF- α , etc.) verschoben, wohingegen ein Rückgang der Produktion der auf das Immunsystem hemmend wirkenden Zytokine, beispielweise IL-10, zu verzeichnen war. Insgesamt schien die Antwort der CD8-positiven im Vergleich zu der der CD4-positiven Zellen einen Vorteil unter der Bestrahlung zu haben. Diese Ergebnisse unterstützen ebenfalls die Möglichkeit einer kombinierten Radio-Immunotherapie mit überlappendem Beginn oder eine an die RT angeschlossene Immuntherapie und sprechen gegen einen Beginn der Immuntherapie vor der Bestrahlung.

Die Antigen-spezifischen, CD8-positiven Zellen (für CMV-pp65, EBV-BMLF1, EBV-LMP2 und Inf-Mat) wurden durch die RT nicht in Mitleidenschaft gezogen, was auch von Tabi et al. nachgewiesen wurde [198]. Somit sollten auch durch eine eventuell durchgeführte präradiotherapeutische Vakzinierung erzeugte Tumorantigen-spezifische T_K-Zellen keine Probleme haben, die Phase der RT zu überstehen. Dies wäre jedoch nur bei einem - in dieser Arbeit nicht bevorzugten - Beginn der Immuntherapie vor Bestrahlungsbeginn relevant. Ein überlappendes Protokoll mit einem Anfang der Immuntherapie während der Bestrahlung könnte ebenfalls eingesetzt werden, da die noch folgenden Bestrahlungsfractionen gleichfalls keinen negativen Effekt auf die potenziell bereits vorhandenen Tumorantigen-spezifischen Zellen hätten.

Unter der RT stieg der Anteil der regulatorischen T-Zellen signifikant an. Da sie möglicherweise eine anti-tumoröse Immunantwort supprimieren [25, 26], ist ebenfalls ein Start der Immuntherapie nach Bestrahlungsende zu bevorzugen, auch wenn in der hier durchgeführten Studie kein signifikanter Abfall der T_{reg}-Zellen nach RT-Ende nachgewiesen werden konnte. Der relative Anstieg der T_{reg}-Zellen ist durch deren Radioresistenz zu erklären [192]. Ein darüber hinaus gehender Ansatz zur Depletion der regulatorischen T-Zellen vor Beginn einer

Immuntherapie wurde von einer Gruppe Tübinger Forscher (Immatic Biotechnologies GmbH) für das Nierenzellkarzinom entwickelt und publiziert. Mit einer einmaligen Cyclophosphamid-Gabe vor Beginn der Vakzinierungen konnte die Zahl der T_{reg}-Zellen reduziert und dadurch ein längeres Gesamtüberleben unter den Patienten erzielt werden [177, 233]. Allgemein wurde bereits von verschiedenen Autoren eine verbesserte Antwort auf die Immuntherapie bei onkologischen Erkrankungen nach einer T_{reg}-Depletion nachgewiesen [234-236]. Auch die Ergebnisse nach alleiniger Radiotherapie sind nachgewiesenermaßen nach Minimierung der regulatorischen T-Zellen besser [237].

Die Proliferationsrate aller untersuchter Subgruppen der Lymphozyten stieg während der Strahlentherapie an, somit würden auch die - bei einem entsprechenden Therapieansatz - durch die Vakzinierung bereits erzeugten, gegen das Karzinom gerichteten, Immunzellen während der RT einen Proliferationsreiz erfahren. Tabi et al. beobachteten in ihrer Arbeit interessanterweise eine geringere Anzahl an proliferierenden Zellen unter der Bestrahlung. Diese Unterschiede sind möglicherweise auf den unterschiedlichen Studienaufbau zurückzuführen. In der zitierten Studie wurden Patienten mit lokal fortgeschrittenem PCa untersucht, die eine RT mit einer niedrigeren Gesamtdosis, jedoch einer erhöhten Fraktionsdosis erhielten (je 2,75 Gy bis 55 Gy Gesamtdosis in der Studie von Tabi et al. vs. je 1,8 Gy bis 78 Gy Gesamtdosis in der hier vorliegenden Arbeit) [198].

Unabhängig von den Effekten einer Vakzinierung auf die T-Lymphozyten verstärkt die Strahlentherapie die Aktivität der NK-Zellen, die wesentlich an der Tumorabwehr des Immunsystems beteiligt sind.

In einem Übersichtsartikel aus dem Jahr 2015 beschrieben Sharabi et al. die synergistische Wirkung einer Bestrahlung und einer Immuntherapie mittels eines anti-CTLA-4-Antikörpers im Tiermodell. Die besten Therapieergebnisse konnten hierbei mit einer simultanen Applikation von Radio- und Immuntherapie erzielt werden [238]. Für die Kombination von Bestrahlung und Peptidvakzinierungen erscheint der Beginn der Immunisierungen jedoch aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nach Abschluss der RT am

sinnvollsten. Ein überlappendes Protokoll wäre alternativ denkbar. Die beiden Ansätze sollten in einer prospektiven Studie miteinander verglichen werden.

In mehreren Studien wurde bereits der synergistische Effekt von Radiotherapie und therapeutischer Vakzinierung beim Prostatakarzinom gezeigt [230, 239, 240]. Eine Weiterführung der Immunisierungen über die RT hinaus (bei einem überlappenden Therapieansatz) ist wichtig um die durch die Bestrahlung vorgeschädigten Zellen des Karzinoms vom Immunsystem weiter wirkungsvoll zu bekämpfen. Dieses Vorgehen wird als „Boosting“ bezeichnet [198]. Bei nacheinander erfolgenden Therapien (Vakzinierung nach RT-Abschluss) sind repetitive Immunisierungen folglich ebenfalls sinnvoll.

Eine Aussage bezüglich einer unterschiedlichen Wirkung der Immuntherapie bei Tumoren verschiedener Aggressivität kann aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit nicht endgültig gemacht werden. Zwar erfuhren die Immunzellen der Patienten, die aufgrund ihres weiter fortgeschrittenen Tumorleidens eine erweiterte Strahlentherapie erhielten, eine verstärkte Aktivierung während der RT, jedoch wurde in zwei Studien bereits dargelegt, dass eine Vakzinierung bei Tumoren eines niedrigeren Aggressivitätsgrads besser wirkt [231, 232].

Die Androgendeprivation, die bei einem Teil der Patienten eingesetzt wurde, sorgte nach den Ergebnissen dieser Arbeit für niedrigere PSA-Werte nach Ende der Strahlentherapie. Jedoch sind die PSA-Werte von Patienten mit und ohne HAT nur bedingt vergleichbar und nur vier Patienten erhielten keine Hormontherapie, sodass keine weiteren Folgerungen bezüglich des Therapieergebnis daraus gezogen wurden. [217-221]. Letztendlich konnten keine negativen Auswirkungen der HAT auf das Immunsystem der Patienten nachgewiesen werden, sodass im Falle einer anti-Tumor-Vakzinierung eine antiandrogene Therapie keine Beeinträchtigung der folgenden Immunreaktion verursachen sollte.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Immunstatus von 21 Patienten während der Radiotherapie ihres Prostatakarzinoms untersucht. Längerfristig soll der optimale Zeitpunkt für die Applikation einer Immuntherapie in Kombination mit der Bestrahlung festgelegt werden.

Hierzu wurde vor, während und nach der Bestrahlungstherapie Blut abgenommen, die Lymphozyten isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es wurden die Verläufe der Zellanteile über die Therapie hinweg untersucht, darüber hinaus wurden Vergleiche zwischen unterschiedlichen Therapiegruppen (Hormon-ablative Therapie, Vorliegen einer erweiterten Bestrahlung des pelvinen Lymphabflusswegs, Applikation einer lokalen Steroidtherapie) und mit sechs gesunden Probanden vorgenommen.

Nach Sichtung der Ergebnisse konnten einige Veränderungen im Immunstatus der untersuchten Patienten erkannt werden: Die absoluten Zahlen der Leukozyten und Lymphozyten nahmen während der Bestrahlungstherapie ab. Davon besonders betroffen waren B- und T-Zellen, während der relative Anteil der NK-Zellen zunahm. Außerdem stieg der Anteil der regulatorischen T-Zellen unter der Bestrahlung an. Bei fast allen untersuchten Zellpopulationen konnte gegen Bestrahlungsende eine deutlich erhöhte Proliferationsrate detektiert werden. Im Vergleich mit den Ergebnissen der gesunden Probanden konnten vor allem die erniedrigte Immunzellzahl und die erhöhte Proliferationsrate nachgewiesen werden. Als Simulation für Tumorantigen-spezifische CD8⁺-T-Zellen wurden in der Studie Virusantigen-spezifische Zellen der Patienten untersucht (für CMV, EBV und Influenza). Bei diesen Zellen konnten unter der Radiotherapie keine einschränkende Veränderungen nachgewiesen werden, sodass es nahe liegt, dass eventuell vorhandene anti-Tumor-Immunzellen ebenfalls keinen Schaden nehmen würden. Dies sollte durch speziell dafür konzipierte Studien bestätigt werden.

Die Ergebnisse der durchgeführten Arbeit zeigen, dass eine Kombination von immuntherapeutischen Verfahren, zum Beispiel eine Peptidvakzinierung, mit der Radiotherapie möglich ist. Ein Beginn der Immuntherapie ist entweder mindestens drei Monate nach Ende der Bestrahlung denkbar, wenn das

Immunsystem sich bereits wieder teilweise erholt hat. Alternativ scheint ein überlappendes Therapieprotokoll sinnvoll, das die erhöhte Proliferationsrate der Immunzellen unter der Radiotherapie ausnutzen würde. Diese Ansätze sollten in einer vergleichenden Studie gegeneinander getestet werden.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklung der T-Zellen im Thymus	6
Abbildung 2: Subtypen der reifen CD4-positiven T-Zellen mit ihren Oberflächencharakteristika und Hauptzytokinen.....	7
Abbildung 3: Oberflächenantigene auf CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten im zeitlichen Verlauf nach Antigenkontakt	9
Abbildung 4: Häufigkeit der Krebssterbefälle in Deutschland 2010	15
Abbildung 5: Altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterberaten für das PCa in Deutschland	16
Abbildung 6: Originalgrafik von D. F. Gleason zur Einteilung der histologischen Befunde in den Gleason-Score	18
Abbildung 7: A: Ablauf der Behandlung mit Sipuleucel-T; B: Vermuteter Wirkmechanismus von Sipuleucel-T	24
Abbildung 8: Design der durchgeführten Studie mit 21 Patienten und 6 gesunden Spendern (GS)	30
Abbildung 9: Schema der Durchflusszytometrie	40
Abbildung 10: Differenzierung von Vollblut durch den Plot SSC vs. FSC in Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und Zelltrümmer.....	41
Abbildung 11: Übersicht über die vier verwendeten Färbepanäle mit den entsprechenden Antikörpern (mit angekoppelten Fluorochromen) bzw. Färbesubstanzen	43
Abbildung 12: Spektrale Überlappung der eingesetzten Qdot-Fluorochrome...	61
Abbildung 13: Auswertung für Färbung 1 am Beispiel des Patienten RTP9, Zeitpunkt D.....	63
Abbildung 14: Auswertung für Färbung 2 am Beispiel des gesunden Spenders RTP103, Zeitpunkt D.....	64
Abbildung 15: Auswertung für Färbung 3 am Beispiel von Patient RTP8, Zeitpunkt A	65
Abbildung 16: Auswertung für das ICS am Beispiel des Patienten RTP11, Zeitpunkt AB nach Stimulation mit SEB	66

Abbildung 17: Entwicklung der absoluten Leukozyten- (links) und Lymphozytenzahlen (rechts) der Patienten RTP20, 21, 23, 24 und 25 (n = 5) über den Verlauf der Radiotherapie.....	69
Abbildung 18: Verlauf der absoluten Leukozyten- (links) und Lymphozytenzahlen (rechts) der Patienten RTP12, 15 und 19 (n = 3) im Therapieverlauf verglichen mit vorhandenen Werten von einem früheren Zeitpunkt.	70
Abbildung 19: Oben: T-Zell-Verlauf während des Bestrahlungszeitraums. Unten: Verläufe der CD4- (links) und CD8-positiven T-Zellen (rechts) während der RT	71
Abbildung 20: Verlauf der regulatorischen T-Zellen während der RT	72
Abbildung 21: Links: Verlauf des Quotienten von regulatorischen T-Zellen ($CD3^+CD4^+CD25^+Foxp3^+$) zu CD4-positiven Effektor-T-Zellen ($CD3^+CD4^+CD25^-Foxp3^-$). Rechts: Verlauf des Quotienten von regulatorischen T-Zellen (Phänotyp s.o.) zu CD8-positiven Effektor-T-Zellen ($CD3^+CD8^+$).....	72
Abbildung 22: B-Zell-Verlauf während der Bestrahlungs-Therapie	73
Abbildung 23: Verlauf der NK-Zellen während der Therapie.....	74
Abbildung 24: Entwicklung des Anteils der voll funktionsfähigen NK-Zellen unter den NK-Zellen während der Bestrahlung	74
Abbildung 25: Verlauf der dreifach definierten NK-Zellen als Anteil der lebenden Lymphozyten über den Verlauf der RT	75
Abbildung 26: Veränderungen in der Proliferationsrate der verschiedenen Zellpopulationen	77
Abbildung 27: Veränderungen in der Differenzierung der CD4-positiven T-Zellen durch die RT.....	80
Abbildung 28: Verlauf der HLA-Peptid-Multimer-positiven Zellen als prozentualer Anteil der lebenden CD8-positiven Lymphozyten über die Bestrahlung	83
Abbildung 29: Verlauf der Proliferationsrate für EBV-BMLF1-spezifische Zellen (links, n = 16) und CMV-pp65-spezifische Zellen (rechts, n = 8)	84

Abbildung 30: FACS-Dotplots für RTP3: Von oben nach unten sind die Zeitpunkte A, B, C, D und E gezeigt. Linke Spalte: Identifizierung der für Influenza-Matrixprotein spezifischen, CD8-positiven Zellen im Bereich der CD4-negativen Zellen (Angaben in % der lebenden CD8-positiven Lymphozyten); Rechte Spalte: Identifizierung der Proliferationsrate der Inf-Mat-spezifischen Zellen (Angaben in % der Inf-Mat-spezifischen, lebenden CD8-positiven Lymphozyten).....	85
Abbildung 31: Verlauf der Zellviabilität für EBV-LMP2-spezifische CD8-positive Zellen	86
Abbildung 32: Zusammensetzung der Virus-spezifischen CD8-positiven Lymphozyten.....	87
Abbildung 33: Oben links: Anteil der IL-17-produzierenden, CD4-positiven Lymphozyten. Oben rechts: Produktion von IFN- γ durch CD4-positive Zellen nach Stimulation mit SEB. Unten links: IFN- γ -Produktion durch CD8- positive Zellen. Unten rechts: IFN- γ -produzierende Zellen mit gleichzeitiger Exozytose von zytotoxischen Granula	89
Abbildung 34: Veränderung der Lymphozyten-Subpopulationen im Vergleich der zwei RT-Gruppen.....	96
Abbildung 35: Unterschiede in der Zellviabilität der CD4-positiven Lymphozyten bezüglich der zwei verschiedenen RT-Gruppen	97
Abbildung 36: Übersicht über die Hormon-ablative Therapie mit der jeweiligen Therapiedauer und den zugeordneten Patientenzahlen	98
Abbildung 37: Unterschiedliche Differenzierungsstufen der CD8-positiven Zellen in den nach HAT unterschiedenen Therapiegruppen	99
Abbildung 38: Übersicht über die Unterschiede in der Proliferationsrate der EBV-BMLF1-spezifischen CD8-positiven Zellen für die nach HAT unterschiedenen Therapiegruppen	100
Abbildung 39: Vergleich der Patienten mit lokaler Steroidtherapie am Enddarm (n = 5) mit den übrigen Patienten (n = 16)	101
Abbildung 40: Verlauf des Lymphozytenanzeils der Patienten im Vergleich mit den gesunden Spendern (GS)	103

Abbildung 41: Links: Vergleich der Anteile aktivierter CD4-positiver T-Zellen von Patienten und GS. Rechts: Vergleich der B-Zell-Anteile unter den Lymphozyten von Patienten und GS.....	105
Abbildung 42: Vergleich der NK-Zell-Anteile unter den Lymphozyten von Patienten und GS.....	105
Abbildung 43: Unterschiede in den Proliferationsraten zwischen Patienten und GS als Anteile der jeweiligen Überpopulation	107
Abbildung 44: Links: Verlauf der naiven CD4-positiven Zellen im Vergleich zwischen Patienten und gesunden Probanden. Rechts: Verlauf der Effektor-Gedächtniszellen der CD8-positiven Zellen im Vergleich zwischen Patienten und GS.....	108
Abbildung 45: Vergleich der CMV-pp65-spezifischen CD8-positiven Zellen von Patienten und GS bezüglich Proliferationsrate (links) und naiven Zellen (rechts).....	109
Abbildung 46: Vergleich der EBV-BMLF1-spezifischen CD8-positiven Zellen von Patienten und GS bezüglich der Zelldifferenzierung.....	110
Abbildung 47: Oben: Vergleich der IFN- γ -produzierenden CD4-positiven Zellen von Patienten und GS nach Stimulation mit SEB. Unten links: Vergleich der CD107a-exprimierenden CD8-positiven Zellen von Patienten und gesunden Probanden nach Stimulation mit SEB. Unten rechts: Vergleich der IL-10-produzierenden CD8-positiven Zellen von Patienten und GS nach Stimulation mit SEB	112
Abbildung 48: Vergleich der IL-10-produzierenden CD8-positiven Zellen von Patienten und GS nach Stimulation mit EBV-BMLF1	114
Abbildung 49: Vergleich der Anzahl basal Zytokin-produzierender CD4-positiver Zellen von Patienten und gesunden Probanden (nach Stimulation mit einem HIV-Peptid als Negativkontrolle für das ICS)	116
Abbildung 50: Vergleich der Anzahl basal Zytokin-produzierender CD8-positiver Zellen von Patienten und gesunden Probanden (nach Stimulation mit einem HIV-Peptid als Negativkontrolle für das ICS)	117
Abbildung 51: Differenzierung zwischen Lymphozyten und Monozyten bei der Auswertung der durchflusszytometrischen Daten.....	128

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich von angeborenem und adaptivem Immunsystem anhand ausgewählter Aspekte.....	2
Tabelle 2: In den durchgeführten Experimenten untersuchte Zytokine und ihre Bedeutung.....	11
Tabelle 3: Risikoeinteilung der Prostatakarzinome unter Beachtung des PSA-Wertes, des Gleason-Scores und der T-Kategorie des Tumors.	18
Tabelle 4: Pathologische TNM-Klassifikation des PCa nach den UICC-Richtlinien.....	19
Tabelle 5: Klinische Patientendaten	31
Tabelle 6: Konzentrationen bzw. Verdünnungen der benutzten Färbesubstanzen und Antikörper in alphabetischer Reihenfolge.....	43
Tabelle 7: Übersicht über die Verdünnung der benutzten Isotyp-Kontrollen in alphabetischer Reihenfolge.....	45
Tabelle 8: Antikörper für die Herstellung der Kompensations-Beads.....	50
Tabelle 9: Reagenzien für die Herstellung der Qdot-Beads.....	51
Tabelle 10: Konfiguration des Durchflusszytometers	53
Tabelle 11: Weitere Analyse für Färbung 1	55
Tabelle 12: Weiteres Vorgehen für Färbung 2	56
Tabelle 13: Weitere Analyse für das ICS	57
Tabelle 14: Färbeindices für die Live/Dead-Aqua-Färbung im Vergleich zwischen dem im Labor etablierten (alten) Protokoll und dem neuen, kombinierten Färbeprotokoll.....	59
Tabelle 15: Ergebnisse der Vorversuche für die Detektion von IL-4 und IL-5...	60
Tabelle 16: Übersicht über alle durchgeführten Tests für Patienten und gesunde Spender.....	67
Tabelle 17: Übersicht über die verschiedenen Veränderungen der Proliferationsrate bei unterschiedlichen Zellpopulationen.....	76
Tabelle 18: Anteile der verschiedenen Differenzierungsstufen der CD8-positiven Zellen während der RT.....	80
Tabelle 19: Anteil der HLA-Peptid-Multimer-positiven Zellen an den lebenden CD8-positiven Lymphozyten aus Färbung 3 in Prozent.....	81

Tabelle 20: Darstellung der Verläufe der HLA-Multimer-positiven Zellen	82
Tabelle 21: Übersicht über die Auswertungen bezüglich der Zytokinproduktion für CD4- und CD8-positive, lebende Lymphozyten.....	88
Tabelle 22: Übersicht über die klinischen Daten der Patienten.....	91
Tabelle 23: Übersicht über die Altersstruktur der Patienten und der gesunden Probanden bei Studieneinschluss.....	103
Tabelle 24: Vergleich der Lymphozyten von Patienten und GS bezüglich der Zytokinproduktion nach Stimulation mit SEB.	111
Tabelle 25: Vergleich der Lymphozyten von Patienten und GS bezüglich der Zytokinproduktion nach Stimulation mit HIV (Negativkontrolle).	115
Tabelle 26: Zusammenfassung der Ergebnisse für die Patienten aus den Hauptversuchen	119
Tabelle 27: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Vergleichen der Patienten mit den gesunden Probanden.....	121
Tabelle 28: Übersicht über die benutzten Antikörperpanels für die vier Färbeprotokolle	126
Tabelle 29: Zusammenfassung der relevanten Ergebnisse aus dem ICS im Vergleich von Patienten und gesunden Probanden.....	136

8. Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
APC	Antigen-präsentierende Zelle oder Allophycocyanin
BCR	B-Zell-Rezeptor
β-ME	beta-Mercapturethanol
BD	Becton Dickinson (BD Biosciences)
BE	Blutentnahme
BMLF1	BamHI-M leftward reading frame 1
BPH	benigne Prostatahyperplasie
BSA	bovine serum albumine
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CCR7	C-C Chemokin-Rezeptor Typ 7
CD	Cluster of differentiation
CD4 _{eff}	CD4-positive Effektorzellen
CD8 _{eff}	CD8-positive Effektorzellen
CMV	Zytomegalievirus
cTx cNx cMx	TNM-Klassifikation (Primärtumorgröße, Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen) aus klinischen Untersuchungen
Cy7	Cyanin 7
CT	Computertomographie
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4
d	Tage
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
DEGRO	Deutsche Gesellschaft für Radioonkologie
DMSO	Dimethylsulfoxidg
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor
Dres.	Doktores
EBV	Epstein-Barr-Virus
ED	Erstdiagnose

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISpot	Enzyme-linked immuno spot assay
et al.	et alii
FACS	Fluorescence-activated cell sorting (hier im Sinne von Durchflusszytometrie verwendet)
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluorescein
Foxp3	forkhead box p3
FSC	forward angle light scatter
ggf.	gegebenenfalls
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GM-CSF	Granulozyten und Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GS	gesunde Spender
Gy	Gray
Hb	Hämoglobin
HAT	Hormon-ablative Therapie
HDR	high dose rate
HIFU	hochintensiver fokussierter Ultraschall
HIV	humanes Immunodefizienz-Virus
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HS	Humanserum
ICAM	intracellular adhesion molecule
ICS	intracellular cytokine staining = intrazelluläre Zytokin-Färbung
ID	Identifikationsnummer
ILL	innate-like Lymphozyten
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
Inf	Influenza
J.	Jahr(e)
LAMP-1	Lysosomal-associated membrane protein 1
LDR	low dose rate

LFA	Lymphoytenfunktion-assoziiertes Antigen
LHRH	Luteinisierungs-Hormon-Releasing-Hormon
LMP2	latency membrane protein 2
LP	Longpass
LSM	Lymphocyte Separation Medium
LT- α	Lymphotoxin- α
Mat	Matrix
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
min	Minuten
ml	Milliliter
Mo.	Monate
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NKT-Zellen	natürliche Killer-T-Zellen
Nr.	Nummer
n	Anzahl
n_e	Anzahl der Patienten mit erweiterter RT
n_{GS}	Anzahl der gesunden Spender
n_H	Anzahl der Patienten mit HAT
n_k	Anzahl der Patienten ohne Steroidtherapie (keine Steroide)
n_o	Anzahl der Patienten ohne HAT
n_P	Anzahl der Patienten (im Vergleich mit den HD)
n_S	Anzahl der Patienten mit Standard-RT
n_{Ster}	Anzahl der Patienten mit Steroidtherapie
NaAzid	Natriumazid (NaN_3)
ng	Nanogramm
o.g.	oben genannt
p	p-Wert = Signifikanzwert = Überschreitungswahrscheinlichkeit

PAMP	pathogen-associated molecular pattern (Pathogen-assozierte molekulare Strukturen)
PAP	prostatic acid phosphatase (prostatistische saure Phosphatase)
Pat.	Patient(en)
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline = phosphatgepufferte Salzlösung
PCa	Prostatakarzinom
PD	Privatdozent/in
PD-1	programmed cell death 1-Molekül
PE	Phycoerythrin
PenStrep	Penicillin + Streptomycin
PI	Propidiumiodid
PJ	Praktisches Jahr des Medizinstudiums
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMT	Photomultiplier-Tube
pp65	Phosphoprotein 65
Prof.	Professor/in
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PSCA	prostate stem cell antigen
PSMA	prostate specific membrane antigen
Qdot	Quantumdot
®	registrierte Marke
RKI	Robert-Koch-Institut
rpm	rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
RT	Radiotherapie, auch reverse Transkriptase (in Bezug auf HIV)
SEB	Staphylococcus Enterotoxin B
sek	Sekunden
SEM	standard error of the mean = Standardfehler des Mittelwerts
SI	staining index
s.o.	siehe oben

SSC	side angle light scatter
STEAP	six transmembrane epithelial antigen of the prostate
s.u.	siehe unten
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
TBS	Tris-buffered saline
TBSA	Tris-buffered saline + azide
TCR	T-Zell-Rezeptor
T _{EMRA}	T-Effektorgedächtniszellen mit Expression von CD45RA
T _H	T-Helfer-Zellen
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TLR	Toll-like Rezeptor
T _K	T-Killer-Zellen
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
UICC	Union internationale contre le cancer
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
unspez.	unspezifisch
USA	United States of America = Vereinigte Staaten von Amerika
v.a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial growth factor
vgl.	vergleiche
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach
#	Bestell- / Katalog-Nummer

9. Literaturverzeichnis

1. Janeway, C.A., Jr., Medzhitov, R., *Innate Immune Recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
2. Medzhitov, R., Janeway, C. Jr., *Innate immune recognition: mechanisms and pathways*. Immunological Reviews, 2000. **173**: p. 89-97.
3. Medzhitov, R., Janeway, C.A. Jr., *Innate immune recognition and control of adaptive immune responses*. Semin Immunol, 1998. **10**(5): p. 351-353.
4. Gasper, D.J., Tejera, M.M., Suresh, M., *CD4 T-cell memory generation and maintenance*. Crit Rev Immunol, 2014. **34**(2): p. 121-146.
5. Katovich Hurley, C., Giles, R.C., Capra, J.D., *The human MHC: evidence for multiple HLA-D-region genes*. Immunol Today, 1983. **4**(8): p. 219-226.
6. Gourraud, P.A., Khankhanian, P., Cereb, N., Yang, S.Y., Feolo, M., Maiers, M., Rioux, J.D., Hauser, S., Oksenberg, J., *HLA diversity in the 1000 genomes dataset*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e97282.
7. Murphy, K., Travers, P., Walport, M., *Janeway's Immunobiology*. 8 ed. 2012, Garland Science, Taylor & Francis Group, New York.
8. Baines, M., Ebringer, A., *HLA and disease*. Mol Aspects Med, 1992. **13**(4): p. 263-378.
9. Osei-Bimpong, A., McLean, R., Bhonda, E., Lewis, S.M., *The use of the white cell count and haemoglobin in combination as an effective screen to predict the normality of the full blood count*. Int J Lab Hematol, 2012. **34**(1): p. 91-97.
10. Zirakzadeh, A.A., Marits, P., Sherif, A., Winqvist, O., *Multiplex B cell characterization in blood, lymph nodes, and tumors from patients with malignancies*. J Immunol, 2013. **190**(11): p. 5847-5855.
11. Pieper, K., Grimbacher, B., Eibel, H., *B-cell biology and development*. J Allergy Clin Immunology, 2013. **131**(4): p. 957-971.
12. Melchers, F., ten Boekel, E., Seidl, T., Kong, X.C., Yamagami, T., Onishi, K., Shimizu, T., Rolink, A.G., Andersson, J., *Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells*. Immunol Rev, 2000. **175**: p. 33-46.
13. Moser, K., Tokoyoda, K., Radbruch, A., MacLennan, I., Manz, R.A., *Stromal niches, plasma cell differentiation and survival*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(3): p. 265-270.
14. Shapiro-Shelef, M., Calame, K., *Regulation of plasma-cell development*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(3): p. 230-242.
15. Murphy, K., Travers, P., Walport, M., *Janeway Immunologie*. 7 ed. 2009, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
16. Kurosaki, T., Kometani, K., Ise, W., *Memory B cells*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(3): p. 149-159.
17. Biron, C.A., Nguyen, K.B., Plen, G.C., Cousens, L.P., Salazar-Mather, T.P., *Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 189-220.

18. Mavilio, D., Lombardo, G., Benjamin, J., Kim, D., Follman, D., Marcenaro, E., O'Shea, M.A., Kinter, A., Kovacs, C., Moretta, A., Fauci, A.S., *Characterization of CD56⁻/CD16⁺ natural killer (NK) cells: A highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals.* Proc Natl Acad Sci USA, 2005. **102**(8): p. 2886-2891.
19. Bonneville, M., O'Brien, R.L., Born, W.K., *$\gamma\delta$ T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity.* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(7): p. 467-478.
20. Geginat, J., Paroni, M., Facciotti, F., Gruarin, P., Kastirr, I., Caprioli, F., Pagani, M., Abrignani, S., *The CD4-centered universe of human T cell subsets.* Semin Immunol, 2013. **25**(4): p. 252-262.
21. Borowski, C., Martin, C., Gounari, F., Haughn, L., Aifantis, I., Grassi, F., von Boehmer, H., *On the brink of becoming a T cell.* Curr Opin Immunol, 2002. **14**(2): p. 200-206.
22. Dzhagalov, I.L., Chen, K.G., Herzmark, P., Robey, E.A., *Elimination of Self-Reactive T Cells in the Thymus: A Timeline for Negative Selection.* PLoS Biol, 2013. **11**(5): p. e1001566.
23. Chattopadhyay, S., Chakraborty, N.G., Mukherji, B., *Regulatory T cells and tumor immunity.* Cancer Immunol Immunother, 2005. **54**(12): p. 1153-1161.
24. Kitagishi, Y., Kobayashi, M., Yamashina, Y., Matsuda, S., *Elucidating the regulation of T cell subsets (Review).* Int J Mol Med, 2012. **30**(6): p. 1255-1260.
25. Afzali, B., Lombardi, G., Lechler, R.I., Lord, G.M., *The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune diseases.* Clin Exp Immunol, 2007. **148**(1): p. 32-46.
26. Strauss, L., Czystowska, M., Szajnik, M., Mandapathil, M., Whiteside, T.L., *Differential responses of human regulatory T cells (Treg) and effector T cells to rapamycin.* PLoS One, 2009. **4**(6): p. e5994.
27. Adeegbe, D.O., Nishikawa, H., *Natural and Induced T Regulatory Cells in Cancer.* Front Immunol, 2013. **4**(190).
28. Huang, H., Ma, Y., Dawicki, W., Zhang, X., Gordon, J.R., *Comparison of Induced Versus Natural Regulatory T Cells of the Same TCR Specificity for Induction of Tolerance to an Environmental Antigen.* J Immunol, 2013. **191**(3): p. 1136-1143.
29. Cox, M.A., Kahan, S.M., Zajac, A.J., *Anti-viral CD8 T-cells and the cytokines that they love.* Virology, 2013. **435**(1): p. 157-169.
30. Guidotti, L.G., Chisari, F.V., *Cytokine-mediated control of viral infections.* Virology, 2000. **273**(2): p. 221-7.
31. Harty, J.T., Tvinnereim, A.R., White, D.W., *CD8⁺ T cell effector mechanisms in resistance to infection.* Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 275-308.
32. Appay, V., van Lier, R.A.W., Sallusto, F., Roederer, M., *Phenotype and Function of Human T Lymphocyte Subsets: Consensus and Issues.* Cytometry A, 2008. **73**(11): p. 975-983.
33. Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., Lanzavecchia, A., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions.* Nature, 1999. **401**(6754): p. 708-712.

34. Sallusto, F., Geginat, J., Lanzavecchia, A., *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 745-763.
35. Lanzavecchia, A., Sallusto, F., *Understanding the generation and function of memory T cell subsets*. *Curr Opin Immunol*, 2005. **17**(3): p. 326-332.
36. Tomiyama, H., Matsuda, T., Takiguchi, M., *Differentiation of Human CD8+ T Cells from a Memory to Memory/Effector Phenotype*. *J Immunol*, 2002. **168**(11): p. 5538-5550.
37. Reinke, S., Geissler, S., Taylor, W.R., Schmidt-Bleek, K., Juelke, K., Schwachmeyer, V., Dahne, M., Hartwig, T., Akyüz, L., Meisel, C., Unterwalder, N., Singh, N.B., Reinke, P., Haas, N.P., Volk, H.D., Duda, G.N., *Terminally differentiated CD8+ T cells negatively affect bone regeneration in humans*. *Sci Transl Med*, 2013. **5**(177): p. 177ra36.
38. Huang, Y., Heiser, R.A., Detanico, T.O., Getahun, A., Kirchenbaum, G.A., Casper, T.L., Aydintug, M.K., Carding, S.R., Ikuta, K., Huang, H., Cambier, J.C., Wysocki, L.J., O'Brien, R.L., Born, W.K., *$\gamma\delta$ T cells affect IL-4 production and B-cell tolerance*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015. **112**(1): p. E39-48.
39. Chan, W.L., Pejnovic, N., Liew, T.V., Lee, C.A., Groves, R., Hamilton, H., *NKT cell subsets in infection and inflammation*. *Immunol Lett*, 2003. **85**(2): p. 159-163.
40. Vazquez, M.I., Catalan-Dibene, J., Zlotnik, A., *B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment*. *Cytokine*, 2015.
41. Sim, G.C., Radvanyi, L., *The IL-2 cytokine family in cancer immunotherapy*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2014. **25**(4): p. 377-390.
42. Wynn, T.A., *Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies*. *Nat Rev Immunol*, 2015.
43. Yang, B., Kang, H., Fung, A., Zhao, H., Wang, T., Ma, D., *The role of interleukin 17 in tumour proliferation, angiogenesis, and metastasis*. *Mediators Inflamm*, 2014. **2014**.
44. Ma, L., Zhao, J., Li, T., He, Y., Wang, J., Xie, L., Qin, X., Li, S., *Association between tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms and prostate cancer risk: a meta-analysis*. *Diagn Pathol*, 2014. **9**(74).
45. Watts, T.H., *TNF/TNFR Family Members in Costimulation of T Cell Responses*. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 23-68.
46. Aktas, E., Kucuksezzer, U.C., Bilgic, S., Erten, G., Deniz, G., *Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity*. *Cell Immunol*, 2009. **254**(2): p. 149-154.
47. Jaffee, E.M., Pardoll, D.M., *Murine tumor antigens: is it worth the search?* *Curr Opin Immunol*, 1996. **8**(5): p. 622-627.
48. Klein, G., *The strange road to the tumor-specific transplantation antigens (TSTAs)*. *Cancer Immun*, 2001. **1**: p. 6.
49. Dunn, G.P., Old, L.J., Schreiber, R.D., *The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting*. *Immunity*, 2004. **21**(2): p. 137-148.

50. Bodmer, W.F., Browning, M.J., Krausa, P., Rowan, A., Bicknell, D.C., Bodmer, J.G., *Tumor escape from immune response by variation in HLA expression and other mechanisms*. Ann N Y Acad Sci, 1993. **12**(690): p. 42-49.
51. Rosenberg, S.A., Restifo, N.P., *Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer*. Science, 2015. **348**(6230): p. 62-68.
52. Sitohy, B., Nagy, J.A., Dvorak, H.F., *Anti-VEGF/VEGFR therapy for cancer: reassessing the target*. Cancer Res, 2012. **72**(8): p. 1909-1914.
53. White, C.A., Weaver, R.L., Grillo-López, A.J., *Antibody-targeted immunotherapy for treatment of malignancy*. Annu Rev Med, 2001. **52**: p. 125-145.
54. Rammensee, H.G., *Some considerations on the use of peptides and mRNA for therapeutic vaccination against cancer*. Immunol Cell Biol, 2006. **84**(3): p. 290-294.
55. Cherryholmes, G.A., Stanton, S.E., Disis, M.L., *Current methods of epitope identification for cancer vaccine design*. Vaccine, 2015.
56. Butterfield, L.H., *Cancer vaccines*. BMJ, 2015. **350**(h988).
57. Sui, C.G., Wu, D., Meng, F.D., Yang, M.H., Jiang, Y.H., *Anti-prostate cancer effects of CTL cell induction in vitro by recombinant adenovirus mediated PSMA/4-1BBL dendritic cells: an immunotherapy study*. Genet Mol Res, 2015. **14**(2): p. 7208-7217.
58. Ito, A., Kondo, S., Tada, K., Kitano, S., *Clinical Development of Immune Checkpoint Inhibitors*. Biomed Res Int, 2015. **2015**(605478).
59. Drake, C.G., *Prostate cancer as a model for tumour immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(8): p. 580-593.
60. Ness, N., Andersen, S., Valkov, A., Nordby, Y., Donnem, T., Al-Saad, S., Busund, L.T., Bremnes, R.M., Richardsen, E., *Infiltration of CD8+ lymphocytes is an independent prognostic factor of biochemical failure-free survival in prostate cancer*. Prostate, 2014. **74**(14): p. 1452-1461.
61. De Marzo, A.M., Platz, E.A., Sutcliffe, S., Xu, J., Grönberg, H., Drake, C.G., Nakai, Y., Isaacs, W.B., Nelson, W.G., *Inflammation in prostate carcinogenesis*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(4): p. 256-269.
62. Flammiger, A., Bayer, F., Cirugeda-Kühnert, A., Huland, H., Tennstedt, P., Simon, R., Minner, S., Bokemeyer, C., Sauter, G., Schlomm, T., Trepel, M., *Intratumoral T but not B lymphocytes are related to clinical outcome in prostate cancer*. APMIS, 2012. **120**(11): p. 901-908.
63. Kärjä, V., Aaltomaa, S., Lipponen, P., Isotalo, T., Talja, M., Mokka, R., *Tumour-infiltrating lymphocytes: A prognostic factor of PSA-free survival in patients with local prostate carcinoma treated by radical prostatectomy*. Anticancer Res, 2005. **25**(6C): p. 4435-4438.
64. Sfanos, K.S., Bruno, T.C., Meeker, A.K., De Marzo, A.M., Isaacs, W.B., Drake, C.G., *Human prostate-infiltrating CD8+ T lymphocytes are oligoclonal and PD-1+*. Prostate, 2009. **69**(15): p. 1694-1703.
65. Davidsson, S., Ohlson, A.L., Andersson, S.O., Fall, K., Meisner, A., Fiorentino, M., Andrén, O., Rider, J.R., *CD4 helper T cells, CD8 cytolytic T cells, and FOXP3(+) regulatory T cells with respect to lethal prostate cancer*. Mod Pathol, 2013. **26**(3): p. 448-455.

66. Flammiger, A., Weisbach, L., Huland, H., Tennstedt, P., Simon, R., Minner, S., Bokemeyer, C., Sauter, G., Schlomm, T., Trepel, M., *High tissue density of FOXP3+ T cells is associated with clinical outcome in prostate cancer*. Eur J Cancer, 2013. **49**(6): p. 1273-1279.
67. DKG-DKH-AWMF. *Leitlinienprogramm Onkologie: Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Langversion 3.0, 2. Aktualisierung (AWMF Registernummer: 034/022OL)*. 2014 [cited 2014 Okt 16]; Available from: <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>
68. RKI-GEKID. *Krebs in Deutschland 2009/2010, 9. Ausgabe*. 2013 [cited 2014 Okt 16]; Available from: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2013/krebs_in_deutschland_2013.pdf?__blob=publicationFile.
69. Haas, G.P., Delongchamps, N., Brawley, O.W., Wang, C.Y., de la Roza, G., *The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies*. Can J Urol, 2008. **15**(1): p. 3866-3871.
70. Morgan, T., Palapattu, G., Wei, J., *Screening for Prostate Cancer- Beyond Total PSA, Utilization of Novel Biomarkers*. Curr Urol Rep, 2015. **16**(9): p. 537.
71. Bruner, D.W., Moore, D., Parlanti, A., Dorgan, J., Engstrom, P., *Relative risk of prostate cancer for men with affected relatives: systematic review and meta-analysis*. Int J Cancer, 2003. **107**(5): p. 797-803.
72. Johns, L.E., Houlston, R.S., *A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk*. BJU Int., 2003. **91**(9): p. 789-794.
73. Zeegers, M.P., Jellema, A., Ostrer, H., *Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma: a meta-analysis*. Cancer, 2003. **98**(8): p. 1894-1903.
74. Harris, R., Lohr, K.N., *Screening for prostate cancer: an update of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force*. Ann Intern Med, 2002. **137**(11): p. 917-929.
75. Lilja, H., Cronin, A.M., Dahlin, A., Manjer, J., Nilsson, P.M., Eastham, J.A., Bjartell, A.S., Scardino, P.T., Ulmert, D., Vickers, A.J., *Prediction of significant prostate cancer diagnosed 20 to 30 years later with a single measure of prostate-specific antigen before the age 50*. Cancer, 2011. **117**(6): p. 1210-1219.
76. Mistry, K., Cable, G., *Meta-analysis of prostate-specific antigen and digital rectal examination as screening tests for prostate carcinoma*. J Am Board Fam Pract, 2003. **16**(2): p. 95-101.
77. Schröder, F.H., Hugosson, J., Roobol, M.J., Tammela, T.L., Zappa, M., Nelen, V., Kwiatkowski, M., Lujan, M., Mänttinen, L., Lilja, H., Denis, L.J., Recker, F., Paez, A., Bangma, C.H., Carlsson, S., Puliti, D., Villers, A., Rebillard, X., Hakama, M., Stenman, U.H., Kujala, P., Taari, K., Aus, G., Huber, A., van der Kwast, T.H., van Schaik, R.H., de Koning, H.J., Moss, S.M., Auvinen, A., *Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up*. Lancet, 2014.

78. Mottet, N., Bastian, P.J., Bellmunt, J., van den Bergh, R.N.C., Bolla, M., van Casteren, N.J., Cornford, P., Joniau, S., Mason, M.D., Matveev, V., van der Kwast, T.H., van der Poel, H., Rouvière, O., Wiegel, T. *Guidelines on Prostate Cancer*. 2014 [cited 2014 Okt 16]; Available from: [http://www.uroweb.org/gls/pdf/09 Prostate Cancer_LRLV2.pdf](http://www.uroweb.org/gls/pdf/09%20Prostate%20Cancer_LRLV2.pdf).
79. Türkeri, L., Tarcan, T., Biren, T., Küllü, S., Akdas, A., *Transrectal ultrasonography versus digitally guided prostate biopsies in patients with palpable lesions on digital rectal examination*. Br J Urol, 1995. **76**(2): p. 184-186.
80. Hoogendam, A., Buntinx, F., de Vet, H.C., *The diagnostic value of digital rectal examination in primary care screening for prostate cancer: a meta-analysis*. Fam Pract, 1999. **16**(6): p. 621-626.
81. Halpern, E.J., Strup, S.E., *Using gray-scale and color and power Doppler sonography to detect prostatic cancer*. Am J Roentgenol, 2000. **174**(3): p. 623-627.
82. Tamsel, S., Killi, R., Hekimgil, M., Altay, B., Soydan, S., Demirpolat, G., *Transrectal ultrasound in detecting prostate cancer compared with serum total prostate-specific antigen levels*. J Med Imaging Radiat Oncol, 2008. **52**(1): p. 24-28.
83. Nelson, E.D., Slotoroff, C.B., Gomella, L.G., Halpern, E.J., *Targeted biopsy of the prostate: the impact of color Doppler imaging and elastography on prostate cancer detection and Gleason score*. Urology, 2007. **70**(6): p. 1136-1140.
84. Beyersdorff, D., Hamm, B., *MRT zur Problemlösung beim Nachweis des Prostatakarzinoms*. Rofo, 2005. **177**(6): p. 788-795.
85. Lawrentschuk, N., Fleshner, N., *The role of magnetic resonance imaging in targeting prostate cancer in patients with previous negative biopsies and elevated prostate-specific antigen levels*. BJU Int., 2009. **103**(6): p. 730-733.
86. Humphrey, P.A., *Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate*. Modern Pathology, 2004. **17**(3): p. 292-306.
87. Epstein, J.I., Allsbrook, W.C. Jr., Amin, M.B., Egevad, L.L., *The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma*. Am J Surg Pathol, 2005. **29**(9): p. 1228-1242.
88. Cheng, L., Montironi, R., Bostwick, D.G., Lopez-Beltran, A., Berney, D.M., *Staging of prostate cancer*. Histopathology, 2012. **60**(1): p. 87-117.
89. Abuzallouf, S., Dayes, I., Lukka, H., *Baseline staging of newly diagnosed prostate cancer: a summary of the literature*. J Urol, 2004. **171**(6 Pt 1): p. 2122-2127.
90. Wilt, T.J., MacDonald, R., Rutsk, I., Shamliyan, T.A., Taylor, B.C., Kane, R.L., *Systematic review: comparative effectiveness and harms of treatments for clinically localized prostate cancer*. Ann Intern Med, 2008. **148**(6): p. 435-448.
91. Bill-Axelsson, A., Holmberg, L., Garmo, H., Rider, J.R., Taari, K., Busch, C., Nordling, S., Häggman, M., Andersson, S.O., Spångberg, A., Andrén, O., Palmgren, J., Steineck, G., Adami, H.O., Johansson, J.E., *Radical*

- prostatectomy or watchful waiting in early prostate cancer.* N Engl J Med, 2014. **370**(10): p. 932-942.
92. Lucca, I., Klatte, T., Shariat, S.F., *Re: radical prostatectomy or watchful waiting in early prostate cancer.* Eur Urol, 2014. **66**(2): p. 386-387.
 93. Markun, S., *Prostatectomie vs. "Watchful waiting" bei frühem Prostatakarzinom.* Praxis, 2014. **103**(15): p. 909-910.
 94. Klotz, L., *Active surveillance for prostate cancer: for whom?* J Clin Oncol, 2005. **23**(32): p. 8165-8169.
 95. Klotz, L., Zhang, L., Lam, A., Nam, R., Mamedov, A., Loblaw, A., *Clinical results of long-term follow-up of a large, active surveillance cohort with localized prostate cancer.* J Clin Oncol, 2010. **28**(1): p. 126-131.
 96. De Carlo, F., Celestino, F., Verri, C., Masedu, F., Liberati, E., Di Stasi, S.M., *Retropubic, Laparoscopic, and Robot-Assisted Radical Prostatectomy: Surgical, Oncological and Functional Outcomes: A Systematic Review.* Urol Int, 2014.
 97. Swindle, P., Eastham, J.A., Ohori, M., Kattan, M.W., Wheeler, T., Maru, N., Slawin, K., Scardino, P.T., *Do margins matter? The prognostic significance of positive surgical margins in radical prostatectomy specimens.* J Urol, 2005. **174**(3): p. 903-907.
 98. Cesaretti, J.A., Stone, N.N., Skoutiers, V.M., Park, J.L., Stock, R.G., *Brachytherapy for the treatment of prostate cancer.* Cancer J, 2007. **13**(5): p. 302-312.
 99. Koukourakis, G., Kelekis, N., Armonis, V., Kouloulis, V., *Brachytherapy for prostate cancer: a systematic review.* Adv Urol, 2009. **2009**(ID: 327945).
 100. Sharkey, J., Cantor, A., Solc, Z., Huff, W., Chovnik, S.D., Behar, R.J., Perez, R., Otheguy, J., Rabinowitz, R., *103Pb brachytherapy versus radical prostatectomy in patients with clinically localized prostate cancer: a 12-year experience from a single group practice.* Brachytherapy, 2005. **4**(1): p. 34-44.
 101. Demanes, D.J., Rodriguez, R.R., Schour, L., Brnadt, D., Altieri, G., *High-dose-rate intensity-modulated brachytherapy with external beam radiotherapy for prostate cancer: California endocurietherapy's 10-year results.* Int J Radiat Oncol Phys, 2005. **61**(5): p. 1306-1316.
 102. Galalae, R.M., Martinez, A., Mate, T., Mitchell, C., Edmundson, G., Nuernberg, N., Eulau, S., Gustafson, G., Gribbe, M., Kovács, G., *Long-term outcome by risk factors using conformal high-dose-rate brachytherapy (HDR-BT) boost with or without neoadjuvant androgen suppression for localized prostate cancer.* Int J Radiat Oncol Phys, 2004. **58**(4): p. 1048-1055.
 103. Deger, S., Boehmer, D., Roigas, J., Schink, T., Wernecke, K.D., Wiegel, T., Hinkelbein, W., Budach, V., Loening, S.A., *High dose rate (HDR) brachytherapy with conformal radiation therapy for localized prostate cancer.* Eur Urol, 2005. **47**(4): p. 441-448.
 104. Klotz, L., *Hormone therapy for patients with prostate carcinoma.* Cancer, 2000. **88**(12 Suppl): p. 3009-3014.
 105. Studer, U.E., Whelan, P., Albrecht, W., Casselman, J., de Reijke, T., Hauri, D., Loidl, W., Isorna, S., Sundaram, S.K., Debois, M., Collette, L.,

- Immediate or deferred androgen deprivation for patients with prostate cancer not suitable for local treatment with curative intent: European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Trial 30891.* J Clin Oncol, 2006. **24**(12): p. 1868-1876.
106. Bolla, M., Collette, L., Blank, L., Warde, P., Dubois, J.B., Mirimanoff, R.O., Storme, G., Bernier, J., Kuten, A., Sternberg, C., Mattelaer, J., Lopez Torecilla, J., Pfeffer, J.R., Lino Cutajar, C., Zurlo, A., Pierart, M., *Long-term results with immediate androgen suppression and external irradiation in patients with locally advanced prostate cancer (an EORTC study): a phase III randomised trial.* Lancet, 2002. **360**(9327): p. 103-106.
 107. Bolla, M., Artignan, X., Chirpaz, E., Balosso, J., Descotes, J.L., *Current studies of combined radiotherapy-hormone therapy in localized and locally advanced prostatic cancers.* Cancer Radither, 1998. **2**(6): p. 783-786.
 108. Denham, J.W., Steigler, A., Lamb, D.S., Joseph, D., Turner, S., Matthews, J., Atkinson, C., North, J., Christie, D., Spry, N.A., Tai, K.H., Wynne, C., D'Este, C., *Short-term neoadjuvant androgen deprivation and radiotherapy for locally advanced prostate cancer: 10-year data from the TROG 96.01 randomised trial.* Lancet Oncol, 2011. **12**(5): p. 451-459.
 109. Schmidt-Hansen, M., Hoskin, P., Kirkbride, P., Hasler, E., Bromham, N., *Hormone and radiotherapy versus hormone or radiotherapy alone for non-metastatic prostate cancer: a systematic review with meta-analyses.* Clin Oncol (R Coll Radiol), 2014. **26**(10): p. e21-46.
 110. Granfors, T., Modig, H., Damber, J.E., Tomic, R., *Combined orchiectomy and external radiotherapy versus radiotherapy alone for nonmetastatic prostate cancer with or without pelvic lymph node involvement: a prospective randomized study.* J Urol, 1998. **159**(6): p. 2030-2034.
 111. Bourke, L., Kirkbride, P., Hooper, R., Rosario, A.J., Chico, T.J., Rosario, D.J., *Endocrine therapy in prostate cancer: time for reappraisal of risks, benefits and cost-effectiveness?* Br J Cancer, 2013. **108**(1): p. 9-13.
 112. Aus, G., *Current status of HIFU and cryotherapy in prostate cancer--a review.* Eur Urol, 2006. **50**(5): p. 927-934.
 113. Tilly, W., Gellermann, J., Graf, R., Hildebrandt, B., Weissbach, L., Budach, V., Felix, R., Wust, P., *Regional hyperthermia in conjunction with definitive radiotherapy against recurrent or locally advanced prostate cancer T3 pN0 M0.* Strahlenther Onkol, 2005. **181**(1): p. 35-41.
 114. Tannock, I.F., de Wit, R., Berry, W.R., Horti, J., Pluzanska, A., Chi, K.N., Oudard, S., Théodore, C., James, N.D., Turesson, I., Rosenthal, M.A., Eisenberger, M.A., *Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer.* N Engl J Med, 2004. **351**(15): p. 1502-1512.
 115. Kupelian, P.A., Potters, L., Khuntia, D., Ciezki, J.P., Reddy, C.A., Reuther, A.M., Carlson, T.P., Klein, E.A., *Radical prostatectomy, external beam radiotherapy <72 Gy, external beam radiotherapy > or =72 Gy, permanent seed implantation, or combined seeds/external beam radiotherapy for stage T1-T2 prostate cancer.* Int J Radiat Oncol Phys, 2004. **58**(1): p. 25-33.

116. Morris, D.E., Emami, B., Mauch, P.M., Konski, A.A., Tao, M.L., Ng, A.K., Klein, E.A., Mohideen, N., Hurwitz, M.D., Fraas, B.A., Roach, M., Gore, E.M., Tepper, J.E., *Evidence-based review of three-dimensional conformal radiotherapy for localized prostate cancer: an ASTRO outcomes initiative*. Int J Radiat Oncol Phys, 2005. **62**(1): p. 3-19.
117. Nilsson, S., Nurlén, B.J., Widmark, A., *A systematic overview of radiation therapy effects in prostate cancer*. Acta Oncol, 2004. **43**(4): p. 316-81.
118. Schwarz, R., *Kurative Radiotherapie des lokalisierten Prostatakarzinoms. Behandlungsverfahren und Ergebnisse*. Urologe A, 2003. **42**(9): p. 1212-1220.
119. Bolla, M., Van Tienhoven, G., Warde, P., Dubois, J.B., Mirimanoff, R.O., Storme, G., Bernier, J., Kuten, A., Sternberg, C., Billiet, I., Torecilla, J.L., Pfeffer, R., Cutajar, C.L., Van der Kwast, T., Collette, L., *External irradiation with or without long-term androgen suppression for prostate cancer with high metastatic risk: 10-year results of an EORTC randomised study*. Lancet Oncol, 2010. **11**(11): p. 1066-1073.
120. D'Amico, A.V., Chen, M.H., Renshaw, A.A., Loffredo, M., Kantoff, P.W., *Androgen suppression and radiation vs radiation alone for prostate cancer: a randomized trial*. JAMA, 2008. **299**(3): p. 289-295.
121. Bria, E., Cuppone, F., Giannarelli, D., Milella, M., Ruggeri, E.M., Sperduti, I., Pinnarò, P., Terzoli, E., Cognetti, F., Carlini, P., *Does hormone treatment added to radiotherapy improve outcome in locally advanced prostate cancer?: meta-analysis of randomized trials*. Cancer, 2009. **115**(15): p. 3446-3456.
122. Kumar, S., Shelley, M., Harrison, C., Coles, B., Wilt, T.J., Mason, M.D., *Neo-adjuvant and adjuvant hormone therapy for localised and locally advanced prostate cancer*. Cochrane Database Syst Rev, 2006. **(4)**.
123. See, W.A., *Adjuvant hormone therapy after radiation or surgery for localized or locally advanced prostate cancer*. Curr Treat Options Oncol, 2003. **4**(5): p. 351-362.
124. Shelley, M.D., Kumar, S., Coles, B., Wilt, T., Staffurth, J., Mason, M.D., *Adjuvant hormone therapy for localised and locally advanced prostate carcinoma: a systematic review and meta-analysis of randomised trials*. Cancer Treat Rev, 2009. **35**(7): p. 540-548.
125. Perez, C.A., Michalski, J., Brown, K.C., Lockett, M.A., *Nonrandomized evaluation of pelvic lymph node irradiation in localized carcinoma of the prostate*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1996. **36**(3): p. 573-584.
126. Pommier, P., Chabaud, S., Lagrange, J.L., Richaud, P., Lesaunier, F., Le Prise, E., Wagner, J.P., Hay, M.H., Beckendorf, V., Suchaud, J.P., Pabot du Chatelard, P.M., Bernier, V., Voirin, N., Perol, D., Carrie, C., *Is there a role for pelvic irradiation in localized prostate adenocarcinoma? Preliminary results of GETUG-01*. J Clin Oncol, 2007. **25**(34): p. 5366-5377.
127. Wang, D., Lawton, C., *Pelvic lymph node irradiation for prostate cancer: who, why, and when?* Semin Radiat Oncol, 2008. **18**(1): p. 35-40.
128. Feyerabend, S., Stevanovic, S., Gouttefangeas, C., Wernet, D., Hennenlotter, J., Bedke, J., Dietz, K., Pascolo, S., Kuczyk, M., Rammensee, H.G., Stenzl, A., *Novel multi-peptide vaccination in Hla-*

- A2+ hormone sensitive patients with biochemical relapse of prostate cancer*. *Prostate*, 2009. **69**(9): p. 917-927.
129. Kantoff, P.W., Higano, C.S., Shore, N.D., Berger, E.R., Small, E.J., Penson, D.F., Redfern, C.H., Ferrari, A.C., Dreicer, R., Sims, R.B., Xu, Y., Frohlich, M.W., Schellhammer, P.F., *Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(5): p. 411-422.
 130. Drake, C.G., Antonarakis, E.S., *Current status of immunological approaches for the treatment of prostate cancer*. *Curr Opin Urol*, 2012. **22**(3): p. 192-202.
 131. Bedke, J., Gouttefangeas, C., Stenzl, A., *Prostatakarzinom: Die Vakzinierung als neue Therapieoption*. *Urologe A*, 2012. **51**(1): p. 44-49.
 132. Gerritsen, W.R., *The evolving role of immunotherapy in prostate cancer*. *Ann Oncol*, 2012. **23**(Suppl 8): p. viii22-27.
 133. Schweizer, M.T., Drake, C.G., *Immunotherapy for prostate cancer: recent developments and future challenges*. *Cancer Metastasis Rev*, 2014. **33**(2-3): p. 641-655.
 134. European Medicines Agency (EMA, E. *Provenge: Autologe, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, aktiviert mit PAP-GM-CSF (Sipuleucel-T) - Zusammenfassung des EPAR für die Öffentlichkeit*. 2013 [cited 2014 Oct 28]; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/002513/WC500151157.pdf.
 135. George, D.J., Nabhan, C., DeVries, T., Whitmore, J.B., Gomella, L.G., *Survival Outcomes of Sipuleucel-T Phase III Studies: Impact of Control-Arm Cross-Over to Salvage Immunotherapy*. *Cancer Immunol Res*, 2015.
 136. European Medicines Agency (EMA, E. *Public statement: Provenge - Withdrawal of the marketing authorisation in the European Union*. 2015 11 May 2015 [cited 2016 Feb 11]; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Public_statement/2015/05/WC500186950.pdf.
 137. Kantoff, P.W., Schuetz, T.J., Blumenstein, B.A., Glode, L.M., Bilhartz, D.L., Wyand, M., Manson, K., Panicali, D.L., Laus, R., Schlom, J., Dahut, W.L., Arlen, P.M., Gulley, J.L., Godfrey, W.R., *Overall survival analysis of a phase II randomized controlled trial of a Poxviral-based PSA-targeted immunotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer*. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(7): p. 1099-1105.
 138. Mandl, S.J., Rountree, R.B., Dela Cruz, T.B., Foy, S.P., Cote, J.J., Gordon, E.J., Trent, E., Delcayre, A., Franzusoff, A., *Elucidating immunologic mechanisms of PROSTVAC cancer immunotherapy*. *J Immunother Cancer*, 2014. **2**(1): p. 34-46.
 139. Madan, R.A., Arlen, P.M., Mohebtash, M., Hodge, J.W., Gulley, J.L., *Prostvac-VF: a vector-based vaccine targeting PSA in prostate cancer*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2009. **18**(7): p. 1001-1011.
 140. McNeel, D.G., Dunphy, E.J., Davies, J.G., Frye, T.P., Johnson, L.E., Staab, M.J., Horvath, D.L., Straus, J., Alberti, D., Marnocha, R., Liu, G., Eickhoff, J.C., Wilding, G., *Safety and immunological efficacy of a DNA*

- vaccine encoding prostatic acid phosphatase in patients with stage D0 prostate cancer.* J Clin Oncol, 2009. **27**(25): p. 4047-4054.
141. Kübler, H., Maurer, T., Stenzl, A., Feyerabend, S., Steiner, U., Schostak, M., Schultze-Seemann, W., vom Dorp, F., Pilla, L., Viatali, G., Hampel, C., Wedel, S., Trojan, L., Hiller, K., Sommerauer, M., Jocham, D., Scheel, B., Lander, T., Kallen, K., Miller, K., *Final analysis of a phase I/IIa study with CV9103, an intradermally administered prostate cancer immunotherapy based on self-adjuvanted mRNA.* J Clin Oncol, 2011. **29**(Suppl 15): p. 15.
 142. Kübler, H., Scheel, B., Gnad-Vogt, U., Miller, K., Schultze-Seemann, W., Vom Dorp, F., Parmiani, G., Hampel, C., Wedel, S., Trojan, L., Jocham, D., Maurer, T., Rippin, G., Fotin-Mleczek, M., von der Mülbe, F., Probst, J., Hoerr, I., Kallen, K.J., Lander, T., Stenzl, A., *Self-adjuvanted mRNA vaccination in advanced prostate cancer patients: a first-in-man phase I/IIa study.* J Immunother Cancer, 2015. **3**(26).
 143. Noguchi, M., Moriya, F., Suekane, S., Ohnishi, R., Matsueda, S., Sasada, T., Yamada, A., Itoh, K., *A phase II trial of personalized peptide vaccination in castration-resistant prostate cancer patients: prolongation of prostate-specific antigen doubling time.* BMC Cancer, 2013. **13**: p. 613.
 144. Noguchi, M., Arai, G., Matsumoto, K., Naito, S., Moriya, F., Suekane, S., Komatsu, N., Matsueda, S., Sasada, T., Yamada, A., Kakuma, T., Itoh, K., *Phase I trial of a cancer vaccine consisting of 20 mixed peptides in patients with castration-resistant prostate cancer: dose-related immune boosting and suppression.* Cancer Immunol Immunother, 2015. **64**(4): p. 493-505.
 145. Fuessel, S., Meye, A., Schmitz, M., Zastrow, S., Linné, C., Richter, K., Löbel, B., Hakenberg, O.W., Hoelig, K., Rieber, E.P., Wirth, M.P., *Vaccination of hormone-refractory prostate cancer patients with peptide cocktail-loaded dendritic cells: results of a phase I clinical trial.* Prostate, 2006. **66**(8): p. 811-821.
 146. Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., Akerley, W., van den Eertwegh, A.J., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J.M., Linette, G.P., Hogg, D., Ottensmeier, C.H., Lebbé, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J.I., Wolchok, J.D., Weber, J.S., Tian, J., Yellin, M.J., Nichol, G.M., Hoos, A., Urba, W.J., *Improved survival with ipilimumab with metastatic melanoma.* N Engl J Med, 2010. **363**(8): p. 711-723.
 147. Kwon, E.D., Drake, C.G., Scher, H.I., Fizazi, K., Bossi, A., van den Eertwegh, A.J., Krainer, M., Houede, N., Santos, R., Mahammedi, H., Ng, S., Maio, M., Franke, F.A., Sundar, S., Agarwal, N., Bergman, A.M., Ciuleanu, T.E., Korbenfeld, E., Sengeløv, L., Hansen, S., Logothetis, C., Beer, T.M., McHenry, M.B., Gagnier, P., Liu, D., Gerritsen, W.R., *Ipilimumab versus placebo after radiotherapy in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer that had progressed after docetaxel chemotherapy (CA184-043): a multicentre, randomised, double-blind, phase 3 trial.* Lancet Oncol, 2014. **15**(7): p. 700-712.

148. Slovin, S.F., Higano, C.S., Hamid, O., Tejawani, S., Harzstark, A., Alumkal, J.J., Scher, H.I., Chin, K., Gagnier, P., McHenry, M.B., Beer, T.M., *Ipilimumab alone or in combination with radiotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer: results from an open-label, multicenter phase I/II study*. *Ann Oncol*, 2013. **24**(7): p. 1813-1821.
149. McNeel, D.G., Smith, H.A., Eickhoff, J.C., Lang, J.M., Staab, M.J., Wilding, G., Liu, G., *Phase I trial of tremelimumab in combination with short-term androgen deprivation in patients with PSA-recurrent prostate cancer*. *Cancer Immunol Immunother*, 2012. **61**(7): p. 1137-1147.
150. Bracarda, S., Altavilla, A., Hamzaj, A., Sisani, M., Marrocolo, F., Del Buono, S., Danielli, R., *Immunologic checkpoints blockade in renal cell, prostate, and urothelial malignancies*. *Semin Oncol*, 2015. **42**(3): p. 495-505.
151. Tang, P.A., Heng, D.Y., *Programmed death 1 pathway inhibition in metastatic renal cell cancer and prostate cancer*. *Curr Oncol Rep*, 2013. **15**(2): p. 98-104.
152. Liu, H., Moy, P., Kim, S., Xia, Y., Rajasekaran, A., Navarro, V., Knudsen, B., Bander, N.H., *Monoclonal antibodies to the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen also react with tumor vascular endothelium*. *Cancer Res*, 1997. **57**(17): p. 3629-3634.
153. Bander, N.H., Milowsky, M.I., Nanus, D.M., Kostakoglu, L., Vallabhajosula, S., Goldsmith, S.J., *Phase I trial of 177lutetium-labeled J591, a monoclonal antibody to prostate-specific membrane antigen, in patients with androgen-independent prostate cancer*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(21): p. 4591-4601.
154. Tagawa, S.T., Beltran, H., Vallabhajosula, S., Goldsmith, S.J., Osborne, J., Matulich, D., Petrillo, K., Parmar, S., Nanus, D.M., Bander, N.H., *Anti-prostate-specific membrane antigen-based radioimmunotherapy for prostate cancer*. *Cancer*, 2010. **116**(4 Suppl): p. 1075-1083.
155. Tagawa, S.T., Milowsky, M.I., Morris, M., Vallabhajosula, S., Christos, P., Akhtar, N.H., Osborne, J., Goldsmith, S.J., Larson, S., Taskar, N.P., Scher, H.I., Bander, N.H., Nanus, D.M., *Phase II study of Lutetium-177-labeled anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 for metastatic castration-resistant prostate cancer*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(18): p. 5182-5191.
156. Finkelstein, S.E., Salenius, S., Mantz, C.A., Shore, N.D., Fernandez, E.B., Shulman, J., Myslicki, F.A., Agassi, A.M., Rotterman, Y., DeVries, T., Sims, R., *Combining immunotherapy and radiation for prostate cancer*. *Clin Genitourin Cancer*, 2015. **13**(1): p. 1-9.
157. Widenmeyer, M., Griesemann, H., Stevanovic, S., Feyerabend, S., Klein, R., Attig, S., Hennenlotter, J., Wernet, D., Kuprash, D.V., Sazykin, A.Y., Pascolo, S., Stenzl, A., Gouttefangeas, G., Rammensee, H.G., *Promiscuous survivin peptide induces robust CD4+ T-cell responses in the majority of vaccinated cancer patients*. *Int J Cancer*, 2012. **131**(1): p. 140-149.
158. Dittrich, W., Göhde, W., *Flow-through chamber for photometrics to measure and count all particles in a dispersion medium*. 1968: Deutschland.

159. Bonner, W.A., Hulett, H.R., Sweet, R.G., Herzenberg, L.A., *Fluorescence activated cell sorting*. Rev Sci Instrum, 1972. **43**(3): p. 404-409.
160. Jaroszeski, M.J., Radcliff, G., *Fundamentals of flow cytometry*. Mol Biotechnol, 1999. **11**(1): p. 37-53.
161. Altman, J.D., Moss, P.A., Goulder, P.J., Barouch, D.H., McHeyzer-Williams, M.G., Bell, J.I., McMichael, A.J., Davis, M.M., *Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes*. Science, 1996. **274**(5284): p. 94-96.
162. Hadrup, S.R., MAurer, D., Laske, K., Frøsig, T.M., Andersen, S.R., Britten, C.M., van der Burg, S.H., Walter, S., Gouttefangeas, C., *Cryopreservation of MHC multimers: Recommendations for quality assurance in detection of antigen specific T cells*. Cytometry A, 2015. **87**(1): p. 37-48.
163. Lovelace, P., Maecker, H.T., *Multiparameter Intracellular Cytokine Staining*. Methods Mol Biol, 2011. **699**: p. 165-178.
164. Crawford, T.Q., Jalbert, E., Ndhlovu, L.C., Barbour, J.D., *Concomitant evaluation of PMA+ionomycin-induced kinase phosphorylation and cytokine production in T cell subsets by flow cytometry*. Cytometry A, 2014. **85**(3): p. 268-276.
165. Trickett, A., Kwan, Y.L., *T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads*. J Immunol Methods, 2003. **275**(1-2): p. 251-255.
166. Libri, V., Azevedo, R.I., Jackson, S.E., Di Mitri, D., Lachmann, R., Fuhrmann, S., Vukmanovic-Stejic, M., Yong, K., Battistini, L., Kern, F., Soares, M.V.D., Akbar, A.N., *Cytomegalovirus infection induces the accumulation of short-lived, multifunctional CD4+ CD45RA+ CD27- T cells: the potential involvement of interleukin-7 in this process*. Immunology, 2011. **132**(3): p. 326-339.
167. Alter, G., Malenfant, J.M., Altfeld, M., *CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity*. J Immunol Methods, 2004. **294**(1-2): p. 15-22.
168. Jenapharm, *Doloproct 0,1 % + 2 % Rektalcreme Gebrauchsinformation: Information für den Anwender*.
169. Bull, M., Lee, D., Stucky, J., Chiu, Y.L., Rubin, A., Horton, H., McElrath, M.J., *Defining Blood Processing Parameters for Optimal Detection of Cryopreserved Antigen-Specific Responses for HIV Vaccine Trials*. J Immunol Methods, 2007. **322**(1-2): p. 57-69.
170. Germann, A., Oh, Y.J., Schmidt, T., Schön, U., Zimmermann, H., von Briesen, H., *Temperature fluctuations during deep temperature cryopreservation reduce PBMC recovery, viability and T-cell function*. Cryobiology, 2013. **67**(2): p. 193-200.
171. Janetzki, S., Panageas, K.S., Ben-Porat, L., Boyer, J., Britten, C.M., Clay, T.M., Kalos, M., Maecker, H.T., Romero, P., Yuan, J., Kast, W.M., Hoos, A., *Results and harmonization guidelines from two large-scale international Elispot proficiency panels conducted by the Cancer Vaccine Consortium (CVC/SVI)*. Cancer Immunol Immunother, 2008. **57**(3): p. 303-315.
172. Britten, C.M., Gouttefangeas, C., Welters, M.J., Pawelec, G., Koch, S., Ottensmeier, C., Mander, A., Walter, S., Paschen, A., Müller-Berghaus,

- J., Haas, I., Mackensen, A., Køllgaard, T., Thor Straten, P., Schmitt, M., Giannopoulos, K., Maier, R., Veelken, H., Bertinetti, C., Konur, A., Huber, C., Stevanović, S., Wölfel, T., van der Burg, S.H., *The CIMT-monitoring panel: a two-step approach to harmonize the enumeration of antigen-specific CD8+ T lymphocytes by structural and functional assays*. *Cancer Immunol Immunother*, 2008. **57**(3): p. 289-302.
173. Sallusto, F., Lanzavecchia, A., *Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity*. *Eur J Immunol*, 2009. **39**(8): p. 2076-2082.
174. Albers, A.E., Schaefer, C., Visus, C., Gooding, W., DeLeo, A.B., Whiteside, T.L., *Spontaneous apoptosis of tumor-specific tetramer+ CD8+ T lymphocytes in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer*. *Head Neck*, 2009. **31**(6): p. 773-781.
175. Riccardi, C., Nicoletti, I., *Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry*. *Nat Protoc*, 2006. **1**(3): p. 1458-1461.
176. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C., *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V*. *J Immunol Methods*, 1995. **184**(1): p. 39-51.
177. Walter, S., Weinschenk, T., Stenzl, A., Zdrojowy, R., Pluzanska, A., Szczylik, C., Staehler, M., Brugger, W., Dietrich, P.Y., Mendrzyk, R., Hilf, N., Schoor, O., Fritsche, J., Mahr, A., Maurer, D., Vass, V., Trautwein, C., Lewandrowski, P., Flohr, C., Pohla, H., Stanczak, J.J., Bronte, V., Mandruzzato, S., Biedermann, T., Pawelec, G., Derhovanessian, E., Yamagishi, H., Miki, T., Hongo, F., Takaha, N., Hirakawa, K., Tanaka, H., Stevanovic, S., Frisch, J., Mayer-Mokler, A., Kirner, A., Rammensee, H.G., Reinhardt, C., Singh-Jasuja, H., *Multipeptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival*. *Nat Med*, 2012. **18**(8): p. 1254-1261.
178. Sandberg, J.K., Fast, N.M., Nixon, D.F., *Functional heterogeneity of cytokines and cytolytic effector molecules in human CD8+ lymphocytes*. *J Immunol*, 2001. **167**(1): p. 181-187.
179. De Rosa, S.C., Herzenberg, L.A., Herzenberg, L.A., Roederer, M., *11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity*. *Nat Med*, 2001. **7**(2): p. 245-248.
180. Baitsch, L., Legat, A., Barba, L., Fuertes Marraco, S.A., Rivals, J.P., Baumgaertner, P., Christiansen-Jucht, C., Bouzourene, H., Rimoldi, D., Pircher, H., Rufer, N., Matter, M., Michielin, O., Speiser, D.E., *Extended co-expression of inhibitory receptors by human CD8 T-cells depending on differentiation, antigen-specificity and anatomical localization*. *PLoS One*, 2012. **7**(2): p. e30852.
181. Henao-Tamayo, M., Irwin, S.M., Shang, S., Ordway, D., Orme, I.M., *T lymphocyte surface expression of exhaustion markers as biomarkers of the efficacy of chemotherapy for tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*, 2011. **91**(4): p. 308-313.
182. Keeney, M., Gratama, J.W., Chin-Yee, I.H., Sutherland, D.R., *Isotype controls in the analysis of lymphocytes and CD34+ stem and progenitor*

- cells by flow cytometry--time to let go!* Cytometry, 1998. **34**(6): p. 280-283.
183. Loken, M.R., Parks, D.R., Herzenberg, L.A., *Two-color immunofluorescence using a fluorescence-activated cell sorter*. J Histochem Cytochem, 1977. **25**(7): p. 899-907.
 184. Bagwell, C.B., Adams, E.G., *Fluorescence spectral overlap compensation for any number of flow cytometric parameters*. Ann N Y Acad Sci, 1993. **677**: p. 167-184.
 185. Roederer, M., *Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats*. Cytometry, 2001. **45**(3): p. 194-205.
 186. Abrams, B., Dubrovski, T., *Quantum dots in flow cytometry*. Methods Mol Biol, 2007. **347**: p. 185-203.
 187. Catena, C., Parasacchi, P., Conti, D., Sgura, A., Trenta, G., Righi, E., Trinci, M.M., Trinci, M., *Peripheral blood lymphocyte decrease and micronucleus yields during radiotherapy*. Int J Radiat Biol, 1997. **72**(5): p. 575-585.
 188. Lissoni, P., Meregalli, S., Bonetto, E., Mancuso, M., Brivio, F., Colciago, M., Gardani, G., *Radiotherapy-induced lymphocytopenia: changes in total lymphocyte count and in lymphocyte subpopulations under pelvic irradiation in gynecologic neoplasms*. J Biol Regul Homeost Agents, 2005. **19**(3-4): p. 153-158.
 189. Pinkawa, M., Djukic, V., Klotz, J., Petz, D., Piroth, M.D., Holy, R., Eble, M.J., *Hematologic changes during prostate cancer radiation therapy are dependent on the treatment volume*. Future Oncol, 2014. **10**(5): p. 835-843.
 190. Sage, E.K., Sedelmayr, M., Gehrman, M., Bayer, C., Schilling, D., Duma, M.N., Schmid, T.E., Geinitz, H., Multhoff, G., *Radiation-induced modulation in the distribution of lymphocytes in prostate cancer patients*. 2014.
 191. Martino, R., Lopez, R., Sureda, A., Brunet, S., Domingo-Albós, A., *Risk of reactivation of a recent invasive fungal infection in patients with hematological malignancies undergoing further intensive chemoradiotherapy. A single-center experience and review of the literature*. Hematologica, 1997. **82**(3): p. 297-304.
 192. Persa, E., Balogh, A., Sáfrány, G., Lumniczky, K., *The effect of ionizing radiation on regulatory T cells in health and disease*. Cancer Lett, 2015.
 193. Hadaschik, B., Su, Y., Huter, E., Ge, Y., Hohenfellner, M., Beckhove, P., *Antigen specific T-cell responses against tumor antigens are controlled by regulatory T cells in patients with prostate cancer*. J Urol, 2012. **187**(4): p. 1458-1465.
 194. Radosavljević, G.D., Jovanović, I.P., Kanjevac, T.V., Arsenijević, N.N., *The role of regulatory T cells in the modulation of anti-tumor immune response*. Srp Arh Celok Lek, 2013. **141**(3-4): p. 262-267.
 195. Wang, H.Y., Lee, D.A., Peng, G., Guo, Z., Li, Y., Kiniwa, Y., Shevach, E.M., Wang, R.F., *Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy*. Immunity, 2004. **20**(1): p. 107-118.

196. Sankatsing, S.U., Hillebergt, M.M., Gras, L., Brinkmann, K., van der Ende, M., de Wolf, F., Stalpers, L.J., Prins, J.M., *Prolonged Decrease of CD4+ T Lymphocytes in HIV-1-Infected Patients After Radiotherapy for a Solid Tumor*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2013. **62**(5): p. 546-549.
197. Newman, G.H., Rees, G.J., Jones, R.S., Grove, E.A., Preece, A.W., *Changes in helper and suppressor T lymphocytes following radiotherapy for breast cancer*. Clin Radiol, 1987. **38**(2): p. 191-193.
198. Tabi, Z., Spary, L.K., Coleman, S., Clayton, A., Mason, M.D., Staffurth, J., *Resistance of CD45RA- T cells to apoptosis and functional impairment, and activation of tumor-antigen specific T cells during radiation therapy of prostate cancer*. J Immunol, 2010. **185**(2): p. 1330-1339.
199. Kietlinska, Z., *Effects of therapies of cervical cancer on the count and function of peripheral lymphocytes*. Eur J Gynaecol Oncol, 1988. **9**(1): p. 20-27.
200. Bolla, M., Favre, M., Bensa, J.C., Lachet, B., *The short effect of pelvic radiotherapy of gynecological cancers on humoral and cell mediated immunity*. Biomed Pharmacother, 1982. **36**(3): p. 139-144.
201. Louagie, H., van Eijkeren, M., Philippe, J., Thierens, H., de Ridder, L., *Changes in peripheral blood lymphocyte subsets in patients undergoing radiotherapy*. Int J Radiat Biol, 1999. **75**(6): p. 767-771.
202. Spînu, D., Mischianu, D., Surcel, M., Huică, R., Munteanu, A., Pîrvu, I., Ciotaru, D., Bratu, O., Farcaș, C., Manache, Ș., Ursaciuc, C., *Immunological investigations in prostatic pathology--a prospective study*. Roum Arch Microbiol Immunol, 2014. **73**(1-2): p. 51-55.
203. Yang, K.L., Wang, Y.S., Chang, C.C., Huang, S.C., Huang, Y.C., Chi, M.S., Chi, K.H., *Reciprocal complementation of the tumoricidal effects of radiation and natural killer cells*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e61797.
204. Appay, V., Dunbar, P.R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G.M., Papagno, L., Ogg, G.S., King, A., Lechner, F., Spina, C.A., Little, S., Havlir, D.V., Richman, D.D., Gruener, N., Pape, G., Waters, A., Easterbrook, P., Salio, M., Cerundolo, V., McMichael, A.J., Rowland-Jones, S.L., *Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections*. Nat Med, 2002. **8**(4): p. 379-385.
205. Iancu, E.M., Corthesy, P., Baumgaertner, P., Devevre, E., Voelter, V., Romero, P., Speiser, D.E., Rufer, N., *Clonotype selection and composition of human CD8 T cells specific for persistent herpes viruses varies with differentiation but is stable over time*. J Immunol, 2009. **183**(1): p. 319-331.
206. Lim, J.Y., Gerber, S.A., Murphy, S.P., Lord, E.M., *Type I interferons induced by radiation therapy mediate recruitment and effector function of CD8(+) T cells*. Cancer Immunol Immunother, 2014. **63**(3): p. 259-271.
207. Krakauer, T., Stiles, B.G., *The staphylococcal enterotoxin (SE) family: SEB and siblings*. Virulence, 2013. **4**(8): p. 759-773.
208. Keilholz, U., Weber, J., Finke, J.H., Gabrilovich, D.I., Kast, W.M., Disis, M.L., Kirkwood, J.M., Scheibenbogen, C., Schlom, J., Maino, V.C., Lysterly, H.K., Lee, P.P., Storkus, W., Marincola, F., Worobec, A. and Atkins, M.B., *Immunologic monitoring of cancer vaccine therapy: results*

- of a workshop sponsored by the Society for Biological Therapy. J Immunother*, 2002. **25**(2): p. 97-138.
209. Sanguinetti, G., Franzone, P., Marcenaro, M., Foppiano, F., Vitale, V., *Sucralfate versus mesalazine versus hydrocortisone in the prevention of acute radiation proctitis during conformal radiotherapy for prostate carcinoma. A randomized study. Strahlenther Onkol*, 2003. **179**(7): p. 464-470.
210. Hille, A., Schmidt-Giese, E., Herrmann, R.M., Herrmann, M.K., Rave-Fränk, M., Schirmer, M., Christiansen, H., Hess, C.F., Ramadori, G., *A prospective study of faecal calprotectin and lactoferrin in the monitoring of acute radiation proctitis in prostate cancer treatment. Scand J Gastroenterol*, 2008. **43**(1): p. 52-58.
211. Masuelli, L., Tumino, G., Turriziani, M., Modesti, A., Bei, R., *Topical use of sucralfate in epithelial wound healing: clinical evidences and molecular mechanisms of action. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 2010. **4**(1): p. 25-36.
212. Schröder, C., Schmidt, M., Eßer-Naumann, S., Sidow, D., Blank, E., Buchali, A., *Poster: Untersuchung des Verlaufes des PSA-Wertes bis 4 Jahre nach Strahlentherapie bei Patienten mit Prostata-Ca in Abhängigkeit von der Gesamtdosis (DEGRO 2014)*. 2014.
213. Riedinger, J.M., Eche, N., Bachaud, J.M., Crehange, G., Fulla, Y., Thuillier, F., *PSA kinetics after radiotherapy. Ann Biol Clin (Paris)*, 2009. **67**(4): p. 395-404.
214. Ponniah, S., Arah, I., Alexander, R.B., *PSA is a candidate self-antigen on autoimmune chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. Prostate*, 2000. **44**(1): p. 49-54.
215. Shields, L., Vega-Carrascal, I., Singleton, S., Lyng, F.M., McClean, B., *Cell survival and DNA damage in normal prostate cells irradiated out-of-field. Radiat Res*, 2014. **182**(5): p. 499-506.
216. Gravina, G.L., Marampon, F., Sherris, D., Vittorini, F., Di Cesare, E., Tombolini, V., Lenzi, A., Jannini, E.A., Festuccia, C., *Torc1/Torc2 inhibitor, Palomid 529, enhances radiation response modulating CRM1-mediated survivin function and delaying DNA repair in prostate cancer models. Prostate*, 2014. **74**(8): p. 852-868.
217. Kubicek, G.J., Naguib, M., Redfield, S., Grayback, N., Olszanski, A., Dawson, G., Brown, S.I., *PSA decrease during combined-modality radiotherapy predicts for treatment outcome. Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2010. **78**(3): p. 759-762.
218. Schüller, P., Schäfer, U., Micke, O., Panke, J.E., Willich, N., *PSA course after definitive high-dose radiotherapy of localized prostate cancer. Anticancer Res*, 2005. **25**(3A): p. 1555-1557.
219. Cheung, R., Tucker, S.L., Kuban, D.A., *First-year PSA kinetics and minima after prostate cancer radiotherapy are predictive of overall survival. Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006. **66**(1): p. 20-24.
220. Schaefer, U., Micke, O., Willich, N., *Prostate-specific antigen (PSA) and radiotherapy in locally confined prostate cancer. Anticancer Res*, 1999. **19**(4A): p. 2645-2648.

221. Yock, T.I., Zietman, A.L., Shipley, W.U., Thakral, H.K., Coen, J.J., *Long-term durability of PSA failure-free survival after radiotherapy for localized prostate cancer*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2002. **54**(2): p. 420-426.
222. Lechleider, R.J., Arlen, P.M., Tsang, K.Y., Steinberg, S.M., Yokokawa, J., Cereda, V., Camphausen, K., Schlom, J., Dahut, W.L., Gulley, J.L., *Safety and Immunologic Response of a Viral Vaccine to PSA in Combination with Radiation Therapy when Metronomic-Dose IL-2 Is Used as an Adjuvant*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(16): p. 5284-5291.
223. Gulley, J.L., Arlen, P.M., Bastian, A., Morin, S., Marte, J., Beetham, P., Tsang, K.Y., Yokokawa, J., Hodge, J.W., Ménard, C., Camphausen, K., Coleman, C.N., Sullivan, F., Steinberg, S.M., Schlom, J., Dahut, W., *Combining a Recombinant Cancer Vaccine with Standard Definitive Radiotherapy in Patients with Localized Prostate Cancer*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(9): p. 3353-3362.
224. Kaufman, H.L., Divgi, C.R., *Optimizing Prostate Cancer Treatment by Combining Local Radiation Therapy with Systemic Vaccination*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(19 Pt 1): p. 6757-6762.
225. McNeel, D.G., Becker, J.T., Eickhoff, J.C., Johnson, L.E., Bradley, E., Pohlkamp, I., Staab, M.J., Liu, G., Wilding, G., Olson, B.M., *Real-time immune monitoring to guide plasmid DNA vaccination schedule targeting prostatic acid phosphatase in patients with castration-resistant prostate cancer*. *Clin Cancer Res*, 2014. **20**(14): p. 3692-3704.
226. Kallen, K.J., Heidenreich, R., Schnee, M., Petsch, B., Schlake, T., Thess, A., Baumhof, P., Scheel, B., Koch, S.D., Fotin-Mlecsek, M., *A novel, disruptive vaccination technology: self-adjuvanted RNActive(R) vaccines*. *Hum Vaccin Immunother*, 2013. **9**(10): p. 2263-2276.
227. Rausch, S., Schwentner, C., Stenzl, A., Bedke, J., *mRNA vaccine CV9103 and CV9104 for the treatment of prostate cancer*. *Hum Vaccin Immunother*, 2014. **10**(11): p. 3146-3152.
228. Bloy, N., Pol, J., Manic, G., Vitale, I., Eggermont, A., Galon, J., Tartour, E., Zitvogel, L., Kroemer, G., Galluzzi, L., *Trial Watch: Radioimmunotherapy for oncological indications*. *Oncoimmunology*, 2014. **3**(9): p. e954929.
229. Vacchelli, E., Vitale, I., Tartour, E., Eggermont, A., Sautès-Fridmann, C., Galon, J., Zitvogel, L., Kroemer, G., Galluzzi, L., *Trial Watch: Anticancer radioimmunotherapy*. *Oncoimmunology*, 2013. **2**(9): p. e25595.
230. Harris, T.J., Hipkiss, E.L., Borzillary, S., Wada, S., Grosso, J.F., Yen, H.R., Getnet, D., Bruno, T.C., Goldberg, M.V., Pardoll, D.M., DeWeese, T.L., Drake, C.G., *Radiotherapy Augments the Immune Response to Prostate Cancer in a Time-Dependent Manner*. *Prostate*, 2008. **68**(12): p. 1319-1329.
231. Baxevanis, C.N., Papamichail, M., Perez, S.A., *Prostate cancer vaccines: the long road to clinical application*. *Cancer Immunol Immunother*, 2015. **64**(4): p. 401-408.
232. Trojan, A., Giger, R., Rist, N., Speck, R.F., *Impaired CD8+ T-Cell Reactivity against Viral Antigens in Cancer Patients with Solid Tumors*. *Infection*, 2004. **32**(5): p. 287-292.

233. Walter, S., Weinschenk, T., Reinhardt, C., Sing-Jasuja, H., *Single-dose cyclophosphamide synergizes with immune responses to the renal cell cancer vaccine IMA901*. *Oncoimmunology*, 2013. **2**(1): p. e22246.
234. Thomas-Schoemann, A., Batteux, F., Alexandre, J., *A new strategy to target regulatory T cells in solid tumors*. *Oncoimmunology*, 2013. **2**(3): p. e23338.
235. Zeng, H., Chi, H., *The interplay between regulatory T cells and metabolism in immune regulation*. *Oncoimmunology*, 2013. **2**(11): p. e26586.
236. Baba, J., Watanabe, S., Saida, Y., Tanaka, T., Miyabayashi, T., Koshio, J., Ichikawa, K., Nozaki, K., Koya, T., Deguchi, K., Tan, C., Miura, S., Tanaka, H., Tanaka, J., Kagamu, H., Yoshizawa, H., Nakata, K., Narita, I., *Depletion of radio-resistant regulatory T cells enhances antitumor immunity during recovery from lymphopenia*. *Blood*, 2012. **120**(12): p. 2417-2427.
237. Kachikwu, E.L., Iwamoto, K.S., Liao, Y.P., DeMarco, J.J., Agazaryan, N., Economou, J.S., McBride, W.H., Schaeue, D., *Radiation enhances regulatory T cell representation*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011. **81**(4): p. 1128-1135.
238. Sharabi, A.B., Lim, M., DeWeese, T.L., Drake, C.G., *Radiation and checkpoint blockade immunotherapy: radiosensitisation and potential mechanisms of synergy*. *Lancet Oncol*, 2015. **16**(13): p. e498-509.
239. Schaeue, D., Comin-Anduix, B., Ribas, A., Zhang, L., Goodglick, L., Sayre, J.W., Debucquoy, A., Haustermans, K., McBride, W.H., *T-Cell Responses to Survivin in Cancer Patients Undergoing Radiation Therapy*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(15): p. 4883-4890.
240. Gupta, A., Probst, H.C., Vuong, V., Landshammer, A., Muth, S., Yagita, H., Schwendener, R., Pruschy, M., Knuth, A., van den Broek, M., *Radiotherapy Promotes Tumor-Specific Effector CD8+ T Cells via Dendritic Cell Activation*. *J Immunol*, 2012. **189**(2): p. 558-566.

10. Erklärung zum Eigenanteil

Die Idee zur durchgeführten Arbeit wurde von Dr. Franziska Eckert und Dr. Cihan Gani aus der Klinik für Radioonkologie der Universität Tübingen entwickelt. Durch die beiden Personen wurde der Ethikantrag für die Studiendurchführung gestellt und die Patienten rekrutiert. Die HLA-Typisierungen erfolgten durch Dr. Barbara Schmid-Horch aus der Abteilung für Transfusionsmedizin der Universität Tübingen. Die Blutentnahmen bei den Patienten, sowie die ersten Isolationen der PBMC wurden durch die beiden Ärzte der Radioonkologie durchgeführt. Im weiteren Verlauf wurden die Zellisolationen aus den Blutproben der Patienten von medizinisch-technischen Assistenten der Klinik für Radioonkologie durchgeführt. Die Rekrutierung der gesunden Probanden, sowie deren Blutentnahmen und PBMC-Isolationen erfolgten zu gleichen Teilen durch Dr. Franziska Eckert, Dr. Cihan Gani und Philipp Schädle.

Seitens der Immunologie wurde die Studie von Dr. Cécile Gouttefangeas begleitet. Alle Versuche, Analysen und Auswertungen wurden durch Philipp Schädle durchgeführt. Während der gesamten Arbeit wurde der Doktorand von Dr. Cécile Gouttefangeas, Dr. Franziska Eckert und Dr. Cihan Gani betreut und angeleitet. Die Korrektur des Manuskripts erfolgte durch Prof. Dr. H.-G. Rammensee, Dr. Cécile Gouttefangeas und Dr. Cihan Gani.

Philipp Schädle, Leinfelden-Echterdingen, 26. Oktober 2016

11. Danksagung

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. H.-G. Rammensee für die Ermöglichung der durchgeführten Arbeit bedanken. Während der gesamten Zeit stand er mir stets mit guten Hinweisen zur Seite.

Des weiteren bedanke ich mich herzlich bei meinen drei Betreuern PD Dr. C. Gouttefangeas aus der Abteilung für Immunologie, sowie Dr. F. Eckert und Dr. C. Gani aus der Abteilung für Radioonkologie. Während mich Frau Dr. Gouttefangeas in alle Labormethoden einführte, einen Großteil der praktischen Arbeit eng begleitete und bei Fragen und Problemen immer sofort eine gute Hilfestellung zu geben wusste, konnte ich bei klinischen Fragestellungen und Unsicherheiten bezüglich des Probandenkollektivs jederzeit auf die Unterstützung von Dres. Eckert und Gani bauen. Die beiden rekrutierten ebenfalls alle Patienten und führten die Blutentnahmen bei ihnen durch. Ein weiterer Dank gilt meiner Arbeitsgruppe im Institut für Immunologie, insbesondere Dr. K. Laske und S. Heidt, die mich wo immer möglich unterstützten. Ein herzlicher Dank geht ebenfalls an Dr. B. Schmid-Horch vom Zentrum für Transfusionsmedizin für die HLA-Typisierungen der Patienten. Ebenfalls möchte ich den Mitarbeitern der Radioonkologie danken, die die PBMC-Isolationen aus den Blutproben der Patienten durchführten.

Weiterhin möchte ich unbekannterweise allen Patienten danken, die sich bereit erklärt haben ein Teil der durchgeführten Arbeit zu werden. Des weiteren danke ich allen gesunden Probanden.

Zu guter Letzt gilt ein ganz besonderer Dank meinen Eltern und Großeltern, meiner Familie und meiner Freundin, die mich alle während der gesamten teils anstrengenden, manchmal etwas frustrierenden und oft auch wieder erfolgreichen Arbeit, sowie während meiner gesamten Studienzzeit begleitet, unterstützt, aufgebaut und bestärkt haben. Sie alle haben dazu beigetragen, mich zu dem Menschen zu machen, der ich heute bin.

12. Lebenslauf

Name: Philipp Sebastian Schädle
Geburtsdatum und -ort: 15.03.1990 in Ostfildern

Bildungsweg

09/1996 - 06/2000 Lindachschule in Leinfelden-Echterdingen
09/2000 - 06/2009 Abitur am Philipp-Matthäus-Hahn-Gymnasium
Leinfelden-Echterdingen
10/2009 - 06/2016 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-
Universität Tübingen
16.06.2016 Erteilung der Approbation als Arzt durch das
Regierungspräsidium Stuttgart

Stipendien

11/2009 - 06/2016 Stipendiat bei der Studienstiftung des deutschen
Volkes
10/2009 - 08/2016 Stipendiat bei e-fellows.net

Praktische Erfahrung

2009 / 2010 Pflegepraktika für insgesamt 90 Tage am
Paracelsus-Krankenhaus Ostfildern-Ruit

2012 / 2013 / 2014 Famulaturen für insgesamt 120 Tage:

- Diabetologie und Endokrinologie, Marienhospital
Stuttgart
- Kardiologie und kardiologische Intensivmedizin,
Herzzentrum Bad Krozingen
- Allgemeinmedizin, hausärztliche
Gemeinschaftspraxis in Penzberg
- Flughafenklinik Frankfurt am Main
- Anästhesiologie und Intensivmedizin, Klinikum am
Steinenberg Reutlingen

05/2015 - 09/2015	PJ-Tertial Innere Medizin, Klinikum am Steinenberg Reutlingen
09/2015 - 12/2015	PJ-Tertial Chirurgie, Spital Limmattal Schlieren (Schweiz)
12/2015 - 04/2016	PJ-Tertial Anästhesiologie und Intensivmedizin, Klinikum am Steinenberg Reutlingen

Weitere Kenntnisse und Engagement

Sprachen:	Deutsch (Muttersprache) Englisch (fließend in Wort und Schrift) Französisch (fortgeschrittene Kenntnisse)
seit 2006	ehrenamtliche Mitarbeit beim Deutschen Roten Kreuz Leinfelden-Echterdingen

13. Bisherige Poster und Vorträge

- Poster: „Immune status of patients with localized prostate carcinoma during primary radiotherapy“ - 12th CIMT Annual Meeting, Mai 2014, Mainz, Deutschland
- Kurzvortrag: „Zellulärer Immunstatus unter primärer Radiotherapie bei lokalisiertem Prostatakarzinom“ - 20. DEGRO-Jahrestagung, Juli 2014, Düsseldorf, Deutschland

Anhang

I. Übersicht über die Therapie der Patienten

Legende zur Tabelle:

P Prostata

L pelviner Lymphabfluss

G Gynäkomastieprophylaxe

Patient	RT		HAT	
	Zielvolumina und -dosis	Zeitraum	Dauer	Zeitraum
RTP1	P (78 Gy)	07.06. - 02.08.2011	6 Mo.	03/2011 - 09/2011
RTP2	P (74 Gy)	04.05. - 28.06.2011	9 Mo.	11/2010 - 07/2011
RTP3	P + L + G (74 / 50,4 / 12 Gy)	05.07. - 24.08.2011	2 - 3 J.	ab 04/2011
RTP5	P + L + G (70 / 50,4 / 12 Gy)	23.05. - 13.07.2011	2 - 3 J.	ab 02/2011
RTP6	P (78 Gy)	04.07. - 25.08.2011	keine	-
RTP7	P (78 Gy)	14.07. - 06.09.2011	6 Mo.	03/2011 - 09/2011
RTP8	P + L + G (78 / 50,4 / 12 Gy)	22.08. - 14.10.2011	2 - 3 J.	ab 06/2011
RTP9	P + L + G (70 / 50,4 / 12 Gy)	26.07. - 13.09.2011	dauerhaft	Orchiektomie 04/2011
RTP11	P (78 Gy)	08.08. - 30.09.2011	6 Mo.	04/2011 - 10/2011
RTP12	P (74 Gy)	30.08. - 20.10.2011	2 - 3 J.	ab 04/2011
RTP13	P (78 Gy)	12.09. - 07.11.2011	6 Mo.	06/2011 - 12/2011
RTP14	P (78 Gy)	08.11.2011 - 02.01.2012	keine	-
RTP15	P + L + G (78 / 50,4 / 12 Gy)	14.11.2011 - 09.01.2012	2 - 3 J.	ab 08/2011
RTP16	P (78 Gy)	30.11.2011 - 25.01.2012	keine	-
RTP18	P (78 Gy)	12.12.2011 - 06.02.2012	9 Mo.	05/2011 - 02/2012
RTP19	P (78 Gy)	03.01. - 27.02.2012	keine	-
RTP20	P (78 Gy)	11.01. - 05.03.2012	ca. 1 J.	10/2011 - Ende 2012

Patient	RT		HAT	
	Zielvolumina und -dosis	Zeitraum	Dauer	Zeitraum
RTP21	P + G (78 / 12 Gy)	23.01. - 15.03.2012	2 - 3 J.	ab 10/2011
RTP23	P (74 Gy)	20.02. - 12.04.2012	4 Mo.	12/2011 - 03/2012
RTP24	P (78 Gy)	06.03. - 02.05.2012	6 Mo.	12/2011 - 05/2012
RTP25	P (78 Gy)	14.03. - 10.05.2012	6 Mo.	02/2012 - 07/2012

Weitere klinische Patientendaten sind in den Abschnitten 2.1.3. und 3.10. dargestellt.

II. Übersicht über die gesunden Spender

Gesunder Spender	Geburtsdatum	Alter bei BE
RTP101	17.11.1948	63 Jahre
RTP103	03.06.1951	61 Jahre
RTP104	16.12.1960	51 Jahre
RTP105	25.05.1963	49 Jahre
RTP106	16.09.1959	53 Jahre
RTP107	30.09.1960	52 Jahre

III. Übersicht über die Blutentnahmen

Pat.	BE A (vor RT)	Zeit zw. A und B (in d)	BE B (Be- ginn RT)	Zeit zw. B und C (in d)	BE C (Mitte RT)	Zeit zw. C und D (in d)	BE D (Ende RT)	Zeit zw. D und E (in d)	BE E (3-6 Mo. nach RT)
RTP1	23.05. 2011	1	24.05. 2011	33	29.06. 2011	34	02.08. 2011	92	04.11. 2011
RTP2	18.04. 2011	1	19.04. 2011	43	01.06. 2011	27	28.06. 2011	94	30.09. 2011
RTP3	16.06. 2011	6	22.06. 2011	33	25.07. 2011	27	22.08. 2011	88	18.11. 2011
RTP5			23.05. 2011	29	21.06. 2011	29	13.07. 2011	93	14.10. 2011
RTP6	04.07. 2011	0	04.07. 2011	26	30.07. 2011	26	25.08. 2011	92	25.11. 2011
RTP7	27.06. 2011	2	29.06. 2011	43	11.08. 2011	29	09.09. 2011	98	16.12. 2011
RTP8	09.08. 2011	13	22.08. 2011	23	14.09. 2011	29	13.10. 2011	152	13.03. 2012

Pat.	BE A (vor RT)	Zeit zw. A und B (in d)	BE B (Be- ginn RT)	Zeit zw. B und C (in d)	BE C (Mitte RT)	Zeit zw. C und D (in d)	BE D (Ende RT)	Zeit zw. D und E (in d)	BE E (3-6 Mo. nach RT)
RTP9	26.07. 2011	0	26.07. 2011	23	18.08. 2011	29	16.09. 2011	89	14.12. 2011
RTP11			08.08. 2011	32	09.09. 2011	21	30.09. 2011	102	10.01. 2012
RTP12			30.08. 2011	24	23.09. 2011	34	27.10. 2011	92	27.01. 2012
RTP13			14.09. 2011	26	10.10. 2011	28	07.11. 2011	95	10.02. 2012
RTP14			08.11. 2011	28	06.12. 2011	27	02.01. 2012	121	08.05. 2012
RTP15			14.11. 2011	23	07.12. 2011	33	09.01. 2012	95	13.04. 2012
RTP16			01.12. 2011	26	27.12. 2011	29	25.01. 2012	121	24.05. 2012
RTP18			12.12. 2011	29	10.01. 2012	27	06.02. 2012	88	04.05. 2012
RTP19			04.01. 2012	27	31.01. 2012	27	27.02. 2012	85	22.05. 2012
RTP20			11.01. 2012	27	07.02. 2012	27	05.03. 2012	120	03.08. 2012
RTP21			23.01. 2012	24	16.02. 2012	28	15.03. 2012	99	22.06. 2012
RTP23			20.02. 2012	25	16.03. 2012	27	12.04. 2012	106	27.07. 2012
RTP24			06.03. 2012	23	29.03. 2012	34	02.05. 2012	93	03.08. 2012
RTP25			14.03. 2012	31	11.04. 2012	29	10.05. 2012	103	21.08. 2012
RTP 101			05.11. 2012	28	03.12. 2012	50	22.02. 2013		
RTP 103			05.11. 2012	28	03.12. 2012	50	22.01. 2013		
RTP 104			05.11. 2012	28	03.12. 2012	39	11.01. 2013		
RTP 105			30.10. 2012	27	26.11. 2012	23	19.12. 2012		
RTP 106			30.10. 2012	27	26.11. 2012	23	19.12. 2012		
RTP 107			23.11. 2012	27	20.12. 2012	25	14.01. 2013		

IV. Rohdatentabellen aus den durchflusszytometrischen Analysen

IV.i. Legende

	Versuch nicht geplant
	Versuch nicht durchgeführt (zu wenige / keine Zellen vorhanden) oder Ausschluss des Messwerts wegen Problemen bei Versuch oder Messung
	Oberpopulation enthielt zu wenige Zellen, daher keine Subgruppenanalyse

Alle Angaben als Anteil der Oberpopulation in Prozent.

IV.ii. Färbeprotokoll 1

Lymphozyten von Einzelzellen

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1	49,80	70,10	55,00	55,30	74,30
RTP2	45,70	50,10	24,70	28,50	58,20
RTP3	52,90	63,00	55,60	47,20	39,90
RTP5		62,20	53,90	42,20	40,30
RTP6		54,30	65,40	52,60	
RTP7	70,90	62,10	60,40		
RTP8	67,70	72,50	55,10	29,40	49,30
RTP9		67,00	11,40	53,20	54,30
RTP11		77,80	66,00	68,20	
RTP12		76,00	72,50	62,60	67,00
RTP13		77,70	60,00	62,80	58,90
RTP14		56,40	45,20		43,60
RTP15		36,90	28,90	13,30	42,70
RTP16		69,10	45,50	30,80	12,20
RTP18		57,30	59,50	38,60	62,20
RTP19		61,80	45,60	54,90	52,50
RTP20		74,60	54,60	64,80	50,20
RTP21		44,90	44,80	19,30	28,70
RTP23		50,70	49,50	33,00	17,30
RTP24		61,60	52,50	27,90	30,70
RTP25		50,50	25,20	39,60	39,70
RTP101		53,30	36,70	50,10	
RTP103		64,40	48,60	61,50	
RTP104		62,00	47,10	63,60	
RTP105		66,40	54,10	47,20	
RTP106		81,50	76,30	74,40	
RTP107		78,30	63,60	65,20	

Lymphozyten von lebenden Zellen

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1	85,90	92,80	79,50	73,90	83,30
RTP2	55,20	65,40	42,60	41,70	70,20
RTP3	66,50	72,70	64,30	54,40	46,80
RTP5		81,10	80,70	57,00	62,50
RTP6		90,70	75,80	70,60	
RTP7	84,10	81,50	72,20		
RTP8	86,10	85,00	81,80	69,50	73,40
RTP9		78,30	30,70	63,00	65,80
RTP11		86,40	79,30	84,60	
RTP12		83,80	81,50	72,10	77,60
RTP13		90,80	76,20	73,00	75,30
RTP14		75,50	57,60		60,00
RTP15		51,50	39,80	19,80	63,60
RTP16		79,40	63,50	43,70	21,00
RTP18		80,30	78,60	66,60	92,90
RTP19		71,70	76,10	75,40	73,30
RTP20		80,30	65,40	70,60	79,40
RTP21		65,00	55,70	25,90	48,90
RTP23		67,20	69,90	61,00	52,50
RTP24		74,40	68,40	55,40	68,20
RTP25		65,30	56,70	49,60	68,60
RTP101		60,40	50,30	63,60	
RTP103		72,00	59,70	74,10	
RTP104		65,10	51,30	93,00	
RTP105		82,20	71,90	74,80	
RTP106		90,70	86,60	87,70	
RTP107		82,90	82,80	83,60	

T-Zellen von Lymphozyten (CD3⁺CD19⁻)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1	52,30	55,70	59,80	41,70	35,00
RTP2	67,40	69,00	60,80	60,20	59,30
RTP3	58,80	55,70	37,50	43,60	38,70
RTP5		72,70	77,70	74,20	44,60
RTP6		72,70	49,60	58,10	
RTP7	55,60	67,20	53,90		
RTP8	74,50	72,20	60,60	60,30	54,20
RTP9		52,60	51,30	54,80	46,40
RTP11		60,80	64,30	55,20	
RTP12		64,60	59,70	45,40	63,00
RTP13		76,00	71,00	71,30	70,70
RTP14		72,10	59,50		64,90
RTP15		57,50	63,30	60,00	30,80
RTP16		63,30	66,90	71,20	24,60
RTP18		71,00	82,80	82,40	87,40

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP19		51,80	71,20	45,20	55,70
RTP20		71,60	67,00	61,60	60,70
RTP21		80,70	72,40	60,00	72,80
RTP23		43,40	43,00	50,10	19,80
RTP24		56,80	51,20	58,60	60,30
RTP25		58,70	42,50	58,50	54,20
RTP101		66,20	75,80	68,90	
RTP103		60,50	51,50	57,80	
RTP104		81,30	76,40	76,00	
RTP105		62,00	58,10	51,00	
RTP106		67,70	61,40	66,20	
RTP107		71,00	64,10	61,60	

B-Zellen von Lymphozyten (CD3⁺CD19⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1	7,92	8,50	2,96	3,39	3,74
RTP2	2,48	2,60	1,39	1,52	1,83
RTP3	8,23	8,21	2,68	2,13	5,49
RTP5		1,42	0,89	1,58	0,88
RTP6		3,72	1,82	1,39	
RTP7	6,73	5,43	1,76		
RTP8	5,96	1,91	1,61	2,84	6,18
RTP9		5,84	1,95	3,21	6,85
RTP11		2,96	5,51	0,95	
RTP12		4,18	2,62	4,25	6,50
RTP13		1,21	1,18	0,69	2,77
RTP14		3,23	2,77		1,73
RTP15		4,88	0,79	1,17	2,13
RTP16		5,55	6,98	1,71	2,65
RTP18		6,13	4,41	2,16	2,80
RTP19		2,75	1,78	1,69	3,08
RTP20		8,75	4,68	2,69	2,07
RTP21		4,09	1,71	2,33	1,69
RTP23		3,21	2,85	2,10	12,90
RTP24		4,04	2,43	1,72	2,79
RTP25		5,85	5,06	1,92	6,34
RTP101		11,40	5,36	4,62	
RTP103		16,50	14,50	15,60	
RTP104		3,49	2,06	2,12	
RTP105		7,23	6,95	4,24	
RTP106		16,30	16,80	16,90	
RTP107		1,36	3,49	3,04	

NK-Zellen von Lymphozyten (CD3⁻CD19⁻)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1	39,60	35,70	37,20	54,80	61,20
RTP2	30,00	28,30	37,80	38,20	38,80
RTP3	32,90	36,00	59,80	54,20	55,80
RTP5		25,90	21,40	24,20	54,40
RTP6		23,50	48,60	40,50	
RTP7	37,60	27,20	44,20		
RTP8	19,50	25,80	37,80	36,80	39,60
RTP9		41,60	46,80	42,00	46,70
RTP11		36,10	30,10	43,70	
RTP12		31,10	37,50	50,20	30,40
RTP13		22,50	27,70	27,90	26,40
RTP14		24,60	37,70		33,30
RTP15		37,50	35,90	38,80	67,00
RTP16		31,10	26,10	27,10	72,50
RTP18		22,80	12,70	15,40	9,65
RTP19		45,40	26,90	53,10	41,20
RTP20		19,60	28,30	35,60	37,20
RTP21		15,20	25,90	37,50	25,50
RTP23		53,30	54,00	47,70	67,10
RTP24		39,10	46,40	39,50	36,70
RTP25		35,00	51,30	38,70	38,30
RTP101		22,10	18,70	26,40	
RTP103		22,90	34,10	26,40	
RTP104		15,10	21,30	21,80	
RTP105		30,60	34,80	44,60	
RTP106		15,80	21,60	16,70	
RTP107		27,50	32,30	35,00	

Proliferierende T-Zellen (CD3⁺CD19⁻Ki67⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1	2,12	1,70	3,36	3,25	3,38
RTP2	6,12	2,83	6,20	5,43	2,98
RTP3	2,65	2,52	4,50	8,44	6,75
RTP5		2,68	6,52	7,77	2,45
RTP6		3,21	4,01	16,00	
RTP7	1,50	1,65	3,58		
RTP8	1,57	1,76	3,04	4,06	2,08
RTP9		2,10	7,11	4,97	3,89
RTP11		1,46	3,53	11,90	
RTP12		2,54	4,29	4,14	2,32
RTP13		1,82	2,69	3,29	2,79
RTP14		2,63	3,28		3,20
RTP15		8,73	4,02	8,22	5,75
RTP16		2,51	4,42	5,84	3,23
RTP18		1,79	4,02	5,18	2,05

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP19		4,45	19,80	6,34	3,70
RTP20		2,87	6,99	4,88	4,16
RTP21		7,24	4,61	12,10	6,06
RTP23		2,55	10,60	11,40	8,38
RTP24		1,98	4,02	9,30	4,88
RTP25		2,18	6,14	4,36	3,16
RTP101		2,58	2,47	1,93	
RTP103		2,61	3,41	2,68	
RTP104		1,56	1,55	1,59	
RTP105		4,15	8,81	5,65	
RTP106		1,42	1,51	1,42	
RTP107		1,75	2,09	2,44	

T_H-Zellen von T-Zellen (CD3⁺CD19⁻CD4⁺CD8⁻)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1	66,10	59,30	69,30	70,30	63,80
RTP2	55,60	58,10	59,70	55,60	58,10
RTP3	66,20	70,70	75,50	77,30	67,70
RTP5		27,20	31,20	44,40	26,20
RTP6		70,90	62,20	66,90	
RTP7	60,50	60,30	66,30		
RTP8	74,10	66,30	67,00	77,20	69,50
RTP9		70,40	73,20	70,10	70,10
RTP11		44,70	60,00	55,90	
RTP12		58,80	53,70	51,10	46,70
RTP13		55,50	55,30	48,30	37,80
RTP14		76,00	70,60		64,90
RTP15		75,80	85,20	82,10	85,30
RTP16		76,90	78,70	72,00	73,10
RTP18		57,50	56,10	43,30	46,30
RTP19		62,50	69,30	61,20	63,70
RTP20		43,80	39,40	44,40	34,00
RTP21		78,80	81,90	72,50	82,10
RTP23		70,30	76,80	66,80	58,60
RTP24		47,50	48,20	37,20	45,40
RTP25		56,50	52,30	53,20	48,20
RTP101		55,70	71,40	67,10	
RTP103		54,00	58,00	52,80	
RTP104		43,30	35,30	49,30	
RTP105		65,80	63,60	61,40	
RTP106		67,90	62,20	65,70	
RTP107		66,40	68,30	67,30	

T_K-Zellen von T-Zellen (CD3⁺CD19⁻CD4⁻CD8⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1	21,20	33,00	24,60	21,50	27,80
RTP2	35,50	33,20	31,30	33,30	28,10
RTP3	27,70	23,90	19,10	17,90	17,90
RTP5		66,10	62,80	49,40	60,40
RTP6		19,60	24,30	16,70	
RTP7	28,70	29,20	25,10		
RTP8	21,40	26,50	21,70	14,80	22,00
RTP9		20,70	18,10	18,90	20,10
RTP11		46,90	33,00	35,10	
RTP12		34,50	39,10	39,90	46,40
RTP13		32,60	29,00	38,80	48,60
RTP14		21,30	24,40		29,40
RTP15		19,00	10,50	12,50	9,53
RTP16		20,10	17,30	22,20	19,00
RTP18		37,20	38,30	45,50	35,90
RTP19		32,70	19,40	33,40	29,70
RTP20		47,90	49,10	46,30	56,10
RTP21		17,90	15,60	18,10	13,90
RTP23		25,60	17,00	21,90	22,50
RTP24		46,20	44,70	53,30	47,60
RTP25		35,20	34,10	35,80	42,10
RTP101		34,70	22,00	24,90	
RTP103		38,80	35,80	39,80	
RTP104		50,00	57,70	44,80	
RTP105		26,90	29,30	30,50	
RTP106		26,30	30,50	28,00	
RTP107		29,70	28,30	29,10	

Proliferierende T_H-Zellen (CD3⁺CD19⁻CD4⁺CD8⁻Ki67⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1	2,57	1,87	3,28	3,03	3,13
RTP2	7,62	3,01	7,09	6,02	2,94
RTP3	3,48	3,08	5,49	9,75	6,33
RTP5		3,60	5,33	6,71	5,71
RTP6		3,05	5,02	15,71	
RTP7	1,73	1,79	3,36		
RTP8	1,60	2,02	3,28	3,84	2,25
RTP9		2,30	6,92	5,04	4,54
RTP11		2,12	4,20	14,34	
RTP12		2,50	4,55	4,17	2,68
RTP13		2,52	3,27	4,14	4,60
RTP14		2,60	3,76		3,92
RTP15		8,49	4,01	8,50	5,83
RTP16		2,31	4,33	6,36	3,19
RTP18		2,05	4,66	6,94	2,66

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP19		5,16	15,13	6,32	4,03
RTP20		3,46	7,03	5,30	7,14
RTP21		6,81	4,34	12,90	5,41
RTP23		2,73	9,93	10,00	9,58
RTP24		2,76	5,57	13,65	6,82
RTP25		2,50	7,30	5,41	3,52
RTP101		2,53	2,42	2,09	
RTP103		2,91	4,04	3,08	
RTP104		1,89	2,55	2,46	
RTP105		4,31	10,49	6,13	
RTP106		1,34	1,63	1,43	
RTP107		2,00	2,20	2,71	

Aktivierte T_H -Zellen ($CD3^+CD19^-CD4^+CD8^-CD25^+$)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1	5,96	4,56	3,07	4,09	3,02
RTP2	3,25	2,21	2,94	1,78	0,76
RTP3	8,11	4,74	4,65	4,91	7,04
RTP5		2,71	3,69	3,38	1,67
RTP6		4,50	4,39	4,97	
RTP7	2,32	2,22	1,50		
RTP8	3,83	3,70	4,60	13,18	8,39
RTP9		6,45	8,29	5,80	7,24
RTP11		1,96	3,57	2,89	
RTP12		1,06	0,69	0,78	1,13
RTP13		4,29	3,28	2,99	3,28
RTP14		4,00	2,52		5,02
RTP15		3,03	4,89	10,37	5,70
RTP16		2,50	2,98	4,09	4,91
RTP18		5,58	6,38	6,44	6,15
RTP19		1,64	3,99	2,53	2,58
RTP20		7,24	2,77	4,70	3,70
RTP21		3,20	4,00	6,52	3,06
RTP23		2,99	1,94	1,26	4,87
RTP24		2,45	6,48	5,28	3,21
RTP25		3,95	4,25	3,03	4,18
RTP101		3,16	3,61	3,40	
RTP103		2,23	2,54	2,95	
RTP104		2,98	2,97	3,09	
RTP105		2,45	2,87	2,95	
RTP106		1,89	1,92	2,06	
RTP107		7,02	4,06	4,45	

Proliferierende T_K-Zellen (CD3⁺CD19⁻CD4⁻CD8⁺Ki67⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1	0,56	0,57	1,73	2,12	1,93
RTP2	2,64	1,66	2,88	3,05	1,71
RTP3	0,61	0,47	0,52	1,80	3,85
RTP5		2,10	6,39	6,61	1,07
RTP6		1,31	1,73	15,44	
RTP7	0,77	1,05	2,76		
RTP8	0,63	0,52	1,10	2,18	0,47
RTP9		0,96	5,21	2,76	1,20
RTP11		0,66	1,71	7,13	
RTP12		1,37	1,91	1,29	0,94
RTP13		0,67	1,31	1,40	1,20
RTP14		1,54	1,05		1,15
RTP15		4,98	1,76	2,72	4,03
RTP16		1,51	2,56	2,10	1,89
RTP18		0,83	1,73	2,16	1,46
RTP19		1,24	17,63	3,82	1,62
RTP20		0,83	2,70	1,42	1,30
RTP21		4,17	2,86	6,45	6,23
RTP23		1,01	6,05	12,72	4,58
RTP24		0,59	1,22	3,84	1,90
RTP25		0,99	3,85	1,95	2,11
RTP101		2,08	0,99	0,81	
RTP103		1,57	1,49	1,62	
RTP104		0,70	0,53	0,28	
RTP105		2,33	3,96	2,47	
RTP106		0,99	0,84	0,81	
RTP107		0,52	0,90	0,97	

Aktivierte T_K-Zellen (CD3⁺CD19⁻CD4⁻CD8⁺CD25⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1	0,28	0,38	0,40	0,41	0,47
RTP2	0,44	0,47	0,28	0,23	0,12
RTP3	2,09	2,04	1,71	1,90	1,80
RTP5		0,09	0,22	0,34	0,06
RTP6		0,67	0,33	0,93	
RTP7	1,27	1,33	1,11		
RTP8	0,32	0,38	0,14	1,32	0,84
RTP9		2,53	3,38	1,98	2,79
RTP11		0,01	0,05	0,03	
RTP12		0,58	0,33	0,28	0,26
RTP13		0,17	0,14	0,12	0,11
RTP14		1,06	0,41		0,69
RTP15		1,71	2,55	3,48	2,47
RTP16		0,36	0,33	0,22	0,94
RTP18		0,38	0,48	0,32	0,78

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP19		0,19	1,06	0,22	0,43
RTP20		1,97	0,69	3,16	1,50
RTP21		4,05	2,85	5,26	2,04
RTP23		3,17	2,80	2,36	2,16
RTP24		0,19	0,57	0,37	0,23
RTP25		1,19	0,56	0,38	0,54
RTP101		1,30	0,47	0,35	
RTP103		0,36	0,56	0,53	
RTP104		0,32	0,16	0,24	
RTP105		1,48	1,03	1,63	
RTP106		0,83	0,62	0,69	
RTP107		1,97	1,67	1,72	

Regulatorische T-Zellen von T_H-Zellen (CD3⁺CD19⁻CD4⁺CD8⁻Foxp3⁺CD25⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1	5,22	8,02	4,98	6,52	4,64
RTP2	7,13	6,24	7,00	6,25	3,67
RTP3	9,05	6,10	6,68	6,53	8,71
RTP5		6,25	6,91	6,51	5,58
RTP6		5,54	4,90	4,00	
RTP7	3,21	3,24	2,11		
RTP8	3,16	2,67	5,12	8,20	6,85
RTP9		7,48	8,86	9,13	10,20
RTP11		2,80	5,65	3,96	
RTP12		2,71	2,61	3,54	4,21
RTP13		4,32	2,87	3,26	3,45
RTP14		4,76	5,05		7,61
RTP15		3,28	5,46	11,80	7,32
RTP16		2,30	3,37	4,78	4,67
RTP18		3,32	4,11	4,21	3,13
RTP19		2,38	5,40	3,71	3,38
RTP20		7,86	8,86	9,57	8,70
RTP21		4,12	4,34	7,88	3,91
RTP23		4,22	2,86	2,73	6,74
RTP24		3,95	7,37	5,87	3,72
RTP25		6,09	9,84	6,66	7,50
RTP101		4,94	4,90	4,88	
RTP103		4,65	4,43	5,08	
RTP104		2,95	2,72	3,10	
RTP105		4,77	4,73	4,51	
RTP106		2,24	2,26	2,28	
RTP107		12,90	10,30	10,70	

Proliferierende regulatorische T-Zellen (CD3⁺CD19⁻CD4⁺CD8⁻Foxp3⁺CD25⁺Ki67⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1	10,00	7,39	13,10	6,52	13,70
RTP2	17,80	5,36	19,50	9,31	4,56
RTP3	9,21	6,10	5,69	15,20	8,71
RTP5		11,10	11,70	14,70	14,90
RTP6		21,50	20,40	42,60	
RTP7	9,00	8,72	16,10		
RTP8	8,48	12,90	5,67	9,78	7,58
RTP9		6,94	20,60	9,86	10,80
RTP11		13,10	12,20	32,30	
RTP12		13,60	18,40	14,50	10,30
RTP13		10,10	11,00	11,80	17,80
RTP14		7,32	6,14		10,80
RTP15		25,70	8,26	12,10	14,70
RTP16		9,09	3,37	13,90	42,10
RTP18		11,20	13,00	29,00	13,40
RTP19		28,00	46,20	26,60	22,00
RTP20		10,40	12,70	9,47	21,20
RTP21		31,00	19,90	46,60	28,40
RTP23		11,10	31,90	20,70	36,90
RTP24		14,00	18,80	48,40	36,10
RTP25		12,90	20,30	15,80	11,10
RTP101		14,80	15,00	9,94	
RTP103		13,00	21,90	14,70	
RTP104		13,30	25,30	16,30	
RTP105		23,50	34,30	33,40	
RTP106		8,57	16,40	11,80	
RTP107		4,90	8,15	9,97	

Proliferierende B-Zellen (CD3⁻CD19⁺Ki67⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1	1,66	1,38	7,50	2,89	4,63
RTP2	7,56	7,34	9,76	11,70	7,27
RTP3	3,28	2,41	3,83	14,90	9,08
RTP5		12,10	21,00	23,80	14,60
RTP6		3,10	6,44	39,40	
RTP7	1,25	1,50	4,30		
RTP8	2,45	6,53	15,50	5,23	1,82
RTP9		1,62	4,24	6,20	2,16
RTP11		3,94	2,88	37,40	
RTP12		6,92	10,10	3,99	2,68
RTP13		3,72	4,17	7,57	2,58
RTP14		2,98	3,57		3,62
RTP15		21,70	8,11	11,60	14,10

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP16		2,96	4,26	14,10	3,33
RTP18		1,79	3,82	6,89	3,02
RTP19		4,46	19,30	7,97	5,99
RTP20		1,26	2,45	3,31	4,09
RTP21		7,24	10,10	11,50	16,30
RTP23		9,04	29,90	28,80	5,14
RTP24		3,73	4,51	11,20	11,10
RTP25		1,75	4,21	7,29	2,48
RTP101		1,92	2,70	2,77	
RTP103		0,81	1,76	1,16	
RTP104		1,82	3,08	4,98	
RTP105		5,82	8,79	11,80	
RTP106		0,82	1,07	1,15	
RTP107		3,76	2,28	3,81	

Proliferierende NK-Zellen (CD3⁻CD19⁻Ki67⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1	3,69	6,24	9,74	8,02	6,03
RTP2	11,10	7,95	16,80	16,00	7,87
RTP3	9,43	9,24	7,46	14,40	12,40
RTP5		8,17	15,80	19,60	7,02
RTP6		7,92	7,21	11,00	
RTP7	6,90	8,82	14,00		
RTP8	3,84	2,76	6,26	4,60	3,72
RTP9		4,02	7,82	9,48	5,55
RTP11		5,94	9,12	15,20	
RTP12		5,16	5,93	6,18	4,60
RTP13		4,45	6,27	8,23	6,88
RTP14		6,01	11,20		7,34
RTP15		6,22	10,90	17,30	7,58
RTP16		5,00	11,30	13,30	1,28
RTP18		6,38	9,57	15,40	9,30
RTP19		4,97	18,00	6,43	5,01
RTP20		4,81	11,10	8,13	8,47
RTP21		21,70	10,80	18,10	10,70
RTP23		6,53	12,00	31,00	5,52
RTP24		3,52	5,03	12,60	12,70
RTP25		6,33	14,40	11,00	7,21
RTP101		10,60	10,30	6,88	
RTP103		8,19	8,42	7,75	
RTP104		20,30	32,50	9,90	
RTP105		12,90	16,10	18,60	
RTP106		7,64	8,57	7,49	
RTP107		4,46	5,91	6,42	

Voll funktionsfähige NK-Zellen von NK-Zellen (CD3⁻CD19⁻CD56⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1	44,40	97,90	95,50	70,50	90,40
RTP2	80,80	69,70	61,80	57,30	61,40
RTP3	94,90	93,70	59,00	70,00	65,90
RTP5		86,50	88,50	82,50	42,60
RTP6		93,80	67,00	79,70	
RTP7	68,80	64,50	55,00		
RTP8	81,40	81,80	54,40	63,80	65,20
RTP9		84,40	82,50	71,60	70,80
RTP11		57,80	60,60	83,80	
RTP12		58,20	61,10	39,30	66,90
RTP13		71,50	48,50	58,10	83,80
RTP14		68,00	44,90		77,80
RTP15		92,90	55,80	67,20	91,30
RTP16		82,30	43,60	63,70	55,50
RTP18		72,90	84,30	89,30	91,80
RTP19		91,70	90,70	76,90	92,60
RTP20		62,20	68,20	51,30	76,80
RTP21		90,00	48,90	60,30	80,60
RTP23		63,30	89,50	95,00	98,80
RTP24		34,20	39,00	64,60	81,10
RTP25		72,70	83,00	76,40	94,20
RTP101		73,10	44,20	21,20	
RTP103		78,20	75,00	71,70	
RTP104		58,50	55,40	30,00	
RTP105		90,70	88,90	83,80	
RTP106		92,00	88,10	88,60	
RTP107		78,60	79,10	84,90	

Proliferierende, voll funktionsfähige NK-Zellen (CD3⁻CD19⁻CD56⁺Ki67⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1	3,34	6,14	9,75	6,70	5,46
RTP2	10,95	8,83	17,43	17,73	8,12
RTP3	9,08	8,83	6,52	13,57	9,81
RTP5		8,39	17,18	20,78	8,21
RTP6		7,22	4,88	9,79	
RTP7	3,18	4,62	7,65		
RTP8	3,89	2,55	7,17	4,36	3,99
RTP9		3,64	7,52	8,85	5,44
RTP11		4,52	7,73	15,79	
RTP12		4,25	5,44	5,67	4,23
RTP13		4,56	6,53	7,08	6,48
RTP14		4,38	9,10		5,39
RTP15		6,50	10,81	16,28	6,29
RTP16		4,66	13,19	13,65	1,97
RTP18		6,12	9,07	14,97	9,54

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP19		4,72	18,18	5,54	4,63
RTP20		3,32	10,73	5,72	7,34
RTP21		21,32	8,75	2,63	10,22
RTP23		4,75	11,61	30,78	5,46
RTP24		3,92	5,46	13,49	11,52
RTP25		3,74	13,27	10,31	6,77
RTP101		11,33	10,32	7,03	
RTP103		6,82	6,85	6,22	
RTP104		17,10	27,94	10,76	
RTP105		11,76	14,63	16,85	
RTP106		7,48	8,11	6,72	
RTP107		3,90	5,17	5,93	

IV.iii. Färbeprotokoll 2

Lymphozyten von Einzelzellen

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				53,00	77,00
RTP2		40,00	22,90	26,70	
RTP3	52,40	72,60	54,10	54,50	44,90
RTP5		51,90	50,50	55,20	
RTP6		63,40	70,80		
RTP7	77,70	74,80	67,70		
RTP8	55,30	71,20	44,50		51,10
RTP9		69,50	16,00	57,40	54,10
RTP11		71,00	68,70		
RTP12		78,30	68,40	65,00	75,20
RTP13		89,30	75,50	78,60	74,00
RTP14		60,30	42,40		42,40
RTP15			36,60	23,50	
RTP16		69,90		47,00	
RTP18		56,50	61,70		
RTP19		70,10		53,60	60,40
RTP20		84,10	66,20	71,40	
RTP21		57,30	52,20	29,20	
RTP23		50,20			
RTP24		59,60	52,80		25,90
RTP25		56,20	39,70	51,10	61,50
RTP101		73,30	58,50	67,50	
RTP103		76,20	69,80	75,00	
RTP104		54,80	55,00	73,30	
RTP105		75,70	70,00	56,50	
RTP106		70,30	59,90	58,60	
RTP107		81,30	67,70	75,20	

Lebende CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻Annexin V⁻PI⁻)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				80,70	62,60
RTP2		81,40	70,30	55,80	
RTP3	39,50	55,50	76,80	77,50	70,70
RTP5		61,20	43,90	45,60	
RTP6		28,30	70,80		
RTP7	69,30	71,70	87,20		
RTP8	92,00	88,60	89,40		91,10
RTP9		81,70	51,30	84,30	82,80
RTP11		87,00	82,20		
RTP12		79,20	90,70	79,00	58,30
RTP13		79,80	81,60	83,40	39,30
RTP14		83,60	77,80		60,30
RTP15			85,50	69,50	
RTP16		83,70		46,20	
RTP18		86,80	75,30		
RTP19		77,90		84,50	58,60
RTP20		73,30	43,90	83,20	
RTP21		47,30	88,00	30,10	
RTP23		80,90			
RTP24		89,00	74,00		42,00
RTP25		49,60	35,90	45,00	41,20
RTP101		54,40	77,00	90,80	
RTP103		66,90	68,40	77,80	
RTP104		44,60	44,40	85,70	
RTP105		57,70	44,10	51,20	
RTP106		61,30	54,70	59,50	
RTP107		88,30	81,00	81,50	

Apoptotische CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻Annexin V⁺PI⁻)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				7,66	13,70
RTP2		10,60	12,10	15,90	
RTP3	29,20	23,60	17,10	13,30	19,20
RTP5		17,30	21,30	26,90	
RTP6		33,90	13,80		
RTP7	17,00	14,00	7,38		
RTP8	3,91	5,20	5,97		4,50
RTP9		9,45	22,40	9,21	8,87
RTP11		7,24	10,90		
RTP12		12,60	4,74	14,60	20,30
RTP13		11,80	12,10	9,52	29,60
RTP14		10,80	15,50		17,60
RTP15			9,24	16,30	
RTP16		9,59		24,40	
RTP18		8,91	12,50		

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP19		9,48		8,64	19,30
RTP20		16,80	27,10	9,49	
RTP21		27,50	7,45	35,40	
RTP23		14,00			
RTP24		4,61	8,76		23,10
RTP25		27,70	42,40	28,10	30,30
RTP101		35,20	14,10	5,85	
RTP103		18,10	17,60	14,50	
RTP104		30,20	34,10	8,45	
RTP105		19,20	26,50	18,30	
RTP106		28,50	34,50	25,80	
RTP107		7,46	12,90	12,00	

Nekrotische CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻Annexin V^{+/−}PI⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				11,60	23,73
RTP2		8,17	18,04	28,74	
RTP3	31,32	20,94	6,08	9,24	10,07
RTP5		21,78	35,25	27,91	
RTP6		37,98	15,49		
RTP7	13,83	14,56	5,65		
RTP8	4,05	5,35	4,59		4,43
RTP9		8,84	26,37	6,49	8,38
RTP11		8,97	7,11		
RTP12		8,16	4,53	6,47	21,42
RTP13		8,40	6,34	7,11	31,09
RTP14		5,88	6,90		22,38
RTP15			5,68	14,13	
RTP16		6,79		29,63	
RTP18		4,24	12,07		
RTP19		12,75		7,03	22,40
RTP20		10,08	29,06	7,30	
RTP21		25,21	4,60	34,39	
RTP23		5,06			
RTP24		6,40	17,41		35,21
RTP25		22,79	21,70	26,95	28,43
RTP101		10,55	9,12	3,42	
RTP103		15,00	14,02	7,65	
RTP104		25,24	21,53	5,80	
RTP105		23,11	29,43	30,56	
RTP106		10,18	10,78	14,64	
RTP107		4,21	6,10	6,50	

Lebende CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺Annexin V⁻PI⁻)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				91,80	89,30
RTP2		88,60	88,00	83,50	
RTP3	61,00	70,70	83,20	87,50	83,80
RTP5		76,30	68,90	60,70	
RTP6		43,20	88,10		
RTP7	89,10	90,40	92,90		
RTP8	95,40	94,50	95,10		96,50
RTP9		86,10	69,80	91,90	90,80
RTP11					
RTP12		91,40	95,30	92,50	85,70
RTP13		93,30	92,60	95,30	78,40
RTP14		88,20	87,50		85,60
RTP15			89,90	83,30	
RTP16		82,60		75,00	
RTP18		86,00	85,00		
RTP19		79,10		86,60	66,40
RTP20		82,10	71,50	91,80	
RTP21		41,40	83,80	30,80	
RTP23		81,80			
RTP24					
RTP25		80,00	54,60	77,60	73,80
RTP101		87,80	91,20	96,60	
RTP103		89,00	87,40	89,60	
RTP104		81,60	78,30	88,50	
RTP105		82,00	77,70	80,40	
RTP106		84,50	81,40	78,60	
RTP107		93,30	86,40	87,70	

Apoptotische CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺Annexin V⁺PI⁻)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				5,29	8,32
RTP2		9,90	10,60	13,20	
RTP3	35,10	25,70	14,60	10,00	13,20
RTP5		21,00	27,10	35,10	
RTP6		50,80	9,21		
RTP7	8,94	7,74	5,23		
RTP8	3,49	4,20	3,80		2,11
RTP9		9,61	23,30	5,88	6,82
RTP11					
RTP12		6,98	3,22	5,87	11,70
RTP13		6,26	6,83	4,04	19,20
RTP14		10,80	11,50		13,10
RTP15			7,83	13,30	
RTP16		15,30		22,30	
RTP18		12,40	11,70		

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP19		12,80		9,61	20,40
RTP20		15,30	21,10	5,09	
RTP21		46,20	11,40	49,70	
RTP23		16,40			
RTP24					
RTP25		17,10	41,90	18,00	22,90
RTP101		8,19	7,09	2,39	
RTP103		7,39	9,08	7,15	
RTP104		13,30	15,50	7,53	
RTP105		13,50	16,50	11,10	
RTP106		10,00	12,80	12,60	
RTP107		5,37	11,50	10,20	

Nekrotische CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺Annexin V^{+/-}PI⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				2,87	2,40
RTP2		1,75	1,80	3,76	
RTP3	3,91	3,57	2,14	2,54	3,00
RTP5		3,13	4,61	4,58	
RTP6		6,08	2,73		
RTP7	2,13	2,13	2,10		
RTP8	1,09	1,34	1,07		1,40
RTP9		4,15	6,84	2,23	2,38
RTP11					
RTP12		1,65	1,48	1,62	2,67
RTP13		0,48	0,61	0,65	2,42
RTP14		1,32	1,29		1,73
RTP15			2,29	3,39	
RTP16		2,10		2,76	
RTP18		1,64	3,32		
RTP19		8,21		3,99	13,60
RTP20		2,60	7,47	3,10	
RTP21		12,49	4,74	19,55	
RTP23		1,87			
RTP24					
RTP25		2,91	3,55	4,38	3,24
RTP101		4,02	2,02	1,15	
RTP103		3,57	3,52	3,29	
RTP104		5,14	6,16	3,96	
RTP105		4,60	5,81	8,40	
RTP106		5,54	5,85	8,89	
RTP107		1,36	2,14	2,00	

CMV-pp65-spezifische CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺CMV-pp65⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,00	0,00
RTP2		0,80	0,78	0,70	
RTP3	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
RTP5		6,52	4,84	4,20	
RTP6		0,55	0,77		
RTP7	0,05	0,05	0,08		
RTP8	0,00	0,00	0,01		0,00
RTP9		0,00	0,00	0,01	0,00
RTP11					
RTP12		1,65	1,82	1,60	1,26
RTP13		0,00	0,01	0,00	0,01
RTP14		0,00	0,00		0,00
RTP15			0,00	0,00	
RTP16		0,00		0,00	
RTP18		8,67	6,27		
RTP19		1,04		1,01	1,20
RTP20		0,55	0,45	0,56	
RTP21		0,00	0,00	0,00	
RTP23		0,08			
RTP24					
RTP25		0,00	0,01	0,01	0,00
RTP101		0,00	0,00	0,00	
RTP103		5,04	4,70	4,97	
RTP104		0,04	0,05	0,05	
RTP105		0,00	0,00	0,00	
RTP106		2,22	2,49	2,79	
RTP107		0,00	0,00	0,00	

Lebende CMV-pp65-spezifische CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁺CMV-pp65⁺
Annexin VPI)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2		85,90	86,90	81,20	
RTP3					
RTP5		81,70	76,80	73,30	
RTP6		45,30	90,00		
RTP7	96,30	95,70	86,10		
RTP8					
RTP9					
RTP11					
RTP12		92,40	96,20	94,20	90,30
RTP13					
RTP14					
RTP15					

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP16					
RTP18		88,20	78,40		
RTP19		85,60		87,30	73,90
RTP20		81,40	82,60	93,80	
RTP21					
RTP23		32,40			
RTP24					
RTP25					
RTP101					
RTP103		91,00	91,00	91,90	
RTP104		68,20	52,50	77,70	
RTP105					
RTP106		89,10	87,80	88,40	
RTP107					

Apoptotische CMV-pp65-spezifische CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺CMV-pp65⁺Annexin V⁺PI⁻)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2		12,50	11,70	16,70	
RTP3					
RTP5		17,70	23,00	26,00	
RTP6		52,10	13,80		
RTP7	1,85	2,13	1,39		
RTP8					
RTP9					
RTP11					
RTP12		6,40	2,54	4,82	9,07
RTP13					
RTP14					
RTP15					
RTP16					
RTP18		11,20	20,30		
RTP19		10,50		9,46	19,60
RTP20		17,00	14,60	4,84	
RTP21					
RTP23		18,90			
RTP24					
RTP25					
RTP101					
RTP103		6,85	7,02	5,61	
RTP104		11,40	20,00	8,51	
RTP105					
RTP106		9,80	11,40	10,60	
RTP107					

Nekrotische CMV-pp65-spezifische CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺CMV-pp65⁺ Annexin V^{+/}PI⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2		1,74	1,73	2,83	
RTP3					
RTP5		1,11	0,91	1,29	
RTP6		2,99	15,49		
RTP7	1,85	4,26	12,50		
RTP8					
RTP9					
RTP11					
RTP12		1,19	1,29	0,93	0,60
RTP13					
RTP14					
RTP15					
RTP16					
RTP18		0,64	1,30		
RTP19		3,95		3,64	6,89
RTP20		1,60	3,05	1,34	
RTP21					
RTP23		48,60			
RTP24					
RTP25					
RTP101					
RTP103		2,13	2,00	2,54	
RTP104		20,42	27,50	13,83	
RTP105					
RTP106		1,11	0,89	1,04	
RTP107					

CMV-pp65-spezifische Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁺ Annexin V⁻PI⁻CMV-pp65⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,00	0,00
RTP2		0,77	0,77	0,68	
RTP3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
RTP5		7,02	5,41	5,09	
RTP6		0,58	0,78		
RTP7	0,06	0,05	0,08		
RTP8	0,00	0,00	0,00		0,00
RTP9		0,00	0,00	0,00	0,00
RTP11					
RTP12		1,76	1,97	1,73	1,43
RTP13		0,00	0,00	0,00	0,00
RTP14		0,00	0,00		0,00

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP15			0,00	0,00	
RTP16		0,00		0,00	
RTP18		8,90	5,78		
RTP19		1,10		1,01	1,31
RTP20		0,55	0,52	0,57	
RTP21		0,00	0,00	0,00	
RTP23		0,03			
RTP24					
RTP25		0,00	0,00	0,00	0,00
RTP101		0,00	0,00	0,00	
RTP103		5,04	4,71	4,94	
RTP104		0,03	0,03	0,04	
RTP105		0,00	0,00	0,00	
RTP106		2,33	2,67	3,13	
RTP107		0,00	0,00	0,00	

EBV-BMLF1-spezifische CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁺EBV-BMLF1⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,00	0,00
RTP2		0,03	0,04	0,02	
RTP3	0,23	0,23	0,11	0,09	0,10
RTP5		0,04	0,03	0,03	
RTP6		0,40	0,44		
RTP7	0,06	0,05	0,06		
RTP8	0,07	0,12	0,08		0,06
RTP9		0,10	0,04	0,04	0,09
RTP11					
RTP12		0,05	0,04	0,07	0,06
RTP13		0,01	0,09	0,10	0,01
RTP14		2,96	1,98		1,72
RTP15			0,01	0,03	
RTP16		0,13		0,11	
RTP18		0,26	0,21		
RTP19		0,02		0,03	0,05
RTP20		0,39	0,15	0,07	
RTP21		0,82	1,20	0,76	
RTP23		1,21			
RTP24					
RTP25		0,76	0,95	0,82	0,71
RTP101		0,05	0,04	0,04	
RTP103		0,02	0,02	0,03	
RTP104		0,22	0,20	0,30	
RTP105		0,00	0,01	0,00	
RTP106		0,70	0,62	0,80	
RTP107		0,01	0,02	0,02	

Lebende EBV-BMLF1-spezifische CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺EBV-BMLF1⁺ Annexin V⁻PI⁻)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2					
RTP3	62,70	74,30	79,50	74,30	
RTP5		78,00	72,20	65,30	
RTP6		56,20	93,10		
RTP7	98,20	93,50	83,30		
RTP8	93,90	94,80	81,80		94,70
RTP9		82,00			87,50
RTP11					
RTP12		92,50	88,90	97,10	96,60
RTP13			86,00	95,50	
RTP14		85,70	87,40		84,50
RTP15					
RTP16		81,60		82,40	
RTP18		96,10	96,30		
RTP19				84,40	85,40
RTP20		84,10	79,90	94,80	
RTP21		53,90	89,10	50,00	
RTP23		78,60			
RTP24					
RTP25		80,90	51,10	82,30	78,20
RTP101		64,90	90,30	93,10	
RTP103					
RTP104		75,80	66,90	88,30	
RTP105					
RTP106		89,00	86,70	87,30	
RTP107					

Apoptotische EBV-BMLF1-spezifische CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺EBV-BMLF1⁺ Annexin V⁺PI⁻)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2					
RTP3	34,30	25,00	18,20	22,90	
RTP5		20,70	25,90	32,70	
RTP6		41,40	6,49		
RTP7	1,75	6,52	3,70		
RTP8	4,08	5,22	3,64		2,63
RTP9		16,40			12,50
RTP11					
RTP12		5,97	3,70	2,86	3,41
RTP13			12,30	3,93	
RTP14		14,40	12,80		15,50

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP15					
RTP16		18,40		17,60	
RTP18		3,89	3,74		
RTP19				12,50	14,60
RTP20		14,60	16,50	1,29	
RTP21		44,40	9,59	45,20	
RTP23		20,40			
RTP24					
RTP25		17,20	46,70	15,10	19,20
RTP101		32,40	6,45	5,17	
RTP103					
RTP104		18,70	27,30	7,93	
RTP105					
RTP106		10,10	12,20	12,50	
RTP107					

Nekrotische EBV-BMLF1-spezifische CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺EBV-BMLF1⁺Annexin V^{+/−}PI⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2					
RTP3	2,94	0,65	2,27	2,86	
RTP5		2,44	1,85	2,04	
RTP6		2,37	0,33		
RTP7	0,00	2,17	12,96		
RTP8	2,04	0,00	14,54		2,63
RTP9		1,64			0,00
RTP11					
RTP12		1,49	7,41	0,00	0,00
RTP13			1,75	0,56	
RTP14		0,33	0,49		0,70
RTP15					
RTP16		0,00		0,00	
RTP18		0,00	0,00		
RTP19				3,12	0,00
RTP20		1,29	3,60	3,23	
RTP21		1,72	1,29	4,76	
RTP23		1,01			
RTP24					
RTP25		1,88	2,22	2,61	2,65
RTP101		2,70	3,23	1,72	
RTP103					
RTP104		5,56	5,82	3,72	
RTP105					
RTP106		0,90	1,13	0,26	
RTP107					

EBV-BMLF1-spezifische Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺ Annexin V^{PI}EBV-BMLF1⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,00	0,01
RTP2		0,03	0,04	0,02	
RTP3	0,24	0,24	0,10	0,08	0,09
RTP5		0,04	0,03	0,03	
RTP6		0,52	0,46		
RTP7	0,06	0,05	0,06		
RTP8	0,07	0,12	0,07		0,06
RTP9		0,10	0,04	0,03	0,09
RTP11					
RTP12		0,06	0,04	0,08	0,07
RTP13		0,00	0,09	0,10	0,00
RTP14		2,87	1,98		1,70
RTP15			0,01	0,03	
RTP16		0,13		0,12	
RTP18		0,28	0,23		
RTP19		0,02		0,03	0,06
RTP20		0,40	0,16	0,08	
RTP21		1,07	1,29	1,24	
RTP23		1,16			
RTP24					
RTP25		0,77	0,91	0,88	0,76
RTP101		0,04	0,04	0,04	
RTP103		0,02	0,01	0,02	
RTP104		0,21	0,17	0,31	
RTP105		0,00	0,01	0,00	
RTP106		0,74	0,65	0,88	
RTP107		0,01	0,02	0,01	

EBV-LMP2-spezifische CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺EBV-LMP2⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,00	0,01
RTP2		0,05	0,06	0,02	
RTP3	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
RTP5		0,05	0,04	0,03	
RTP6		0,00	0,00		
RTP7	0,02	0,03	0,02		
RTP8	0,13	0,15	0,09		0,09
RTP9		0,03	0,04	0,02	0,02
RTP11					
RTP12		0,00	0,00	0,02	0,01
RTP13		0,00	0,01	0,00	0,00
RTP14		0,12	0,10		0,08
RTP15			0,02	0,03	

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP16		0,01		0,01	
RTP18		0,06	0,04		
RTP19		0,05		0,15	0,09
RTP20		0,02	0,01	0,02	
RTP21		0,00	0,01	0,00	
RTP23		0,01			
RTP24					
RTP25		0,02	0,02	0,03	0,01
RTP101		0,01	0,01	0,02	
RTP103		0,17	0,15	0,22	
RTP104		0,01	0,02	0,02	
RTP105		0,03	0,04	0,02	
RTP106		0,09	0,09	0,10	
RTP107		0,04	0,02	0,03	

Lebende EBV-LMP2-spezifische CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺EBV-LMP2⁺ Annexin VPI)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2		96,70			
RTP3					
RTP5		81,50	71,00	83,30	
RTP6					
RTP7					
RTP8	93,60	95,10	82,80		92,60
RTP9					
RTP11					
RTP12					
RTP13					
RTP14		90,00	92,30		80,00
RTP15					
RTP16					
RTP18		97,40	91,30		
RTP19		39,10		42,30	34,60
RTP20		90,70		94,60	
RTP21					
RTP23					
RTP24					
RTP25					
RTP101					
RTP103		91,40	81,60	91,30	
RTP104				81,60	
RTP105					
RTP106		92,90	88,00	84,90	
RTP107		94,30		83,80	

Apoptotische EBV-LMP2-spezifische CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺EBV-LMP2⁺Annexin V⁺PI⁻)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2		3,33			
RTP3					
RTP5		18,50	27,40	14,30	
RTP6					
RTP7					
RTP8	5,32	4,29	3,45		1,85
RTP9					
RTP11					
RTP12					
RTP13					
RTP14		9,00	6,15		20,00
RTP15					
RTP16					
RTP18		2,56	4,35		
RTP19		39,10		31,00	23,10
RTP20		5,56		0,00	
RTP21					
RTP23					
RTP24					
RTP25					
RTP101					
RTP103		5,52	10,50	5,33	
RTP104				2,63	
RTP105					
RTP106		4,42	6,67	11,80	
RTP107		3,77		13,50	

Nekrotische EBV-LMP2-spezifische CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺EBV-LMP2⁺Annexin V⁺PI⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2		0,00			
RTP3					
RTP5		1,09	3,23	2,38	
RTP6					
RTP7					
RTP8	1,06	0,61	13,75		5,55
RTP9					
RTP11					
RTP12					
RTP13					
RTP14		1,00	1,54		2,50

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP15					
RTP16					
RTP18		0,00	4,35		
RTP19		21,70		26,81	42,40
RTP20		3,70		5,41	
RTP21					
RTP23					
RTP24					
RTP25					
RTP101					
RTP103		3,06	7,90	3,33	
RTP104				15,83	
RTP105					
RTP106		2,65	5,34	3,23	
RTP107		1,89		2,70	

EBV-LMP2-spezifische Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺ Annexin V⁺PI⁻EBV-LMP2⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,00	0,01
RTP2		0,05	0,06	0,03	
RTP3	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01
RTP5		0,05	0,04	0,04	
RTP6		0,00	0,00		
RTP7	0,02	0,03	0,02		
RTP8	0,13	0,15	0,08		0,08
RTP9		0,02	0,04	0,01	0,02
RTP11					
RTP12		0,01	0,00	0,02	0,01
RTP13		0,00	0,00	0,00	0,00
RTP14		0,12	0,11		0,08
RTP15			0,03	0,05	
RTP16		0,01		0,00	
RTP18		0,07	0,05		
RTP19		0,02		0,07	0,05
RTP20		0,02	0,01	0,02	
RTP21		0,00	0,01	0,00	
RTP23		0,01			
RTP24					
RTP25		0,01	0,04	0,04	0,01
RTP101		0,01	0,01	0,01	
RTP103		0,17	0,13	0,22	
RTP104		0,01	0,01	0,02	
RTP105		0,03	0,03	0,02	
RTP106		0,10	0,10	0,10	
RTP107		0,04	0,02	0,03	

Inf-Mat-spezifische CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺Inf-Mat⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,05	0,03
RTP2		0,03	0,03	0,02	
RTP3	5,57	5,06	4,21	2,98	3,40
RTP5		0,01	0,01	0,01	
RTP6		0,06	0,11		
RTP7	0,00	0,00	0,00		
RTP8	0,00	0,00	0,03		
RTP9		0,02	0,00	0,03	0,04
RTP11					
RTP12		0,00	0,01	0,00	0,00
RTP13		0,00	0,00	0,00	0,00
RTP14		0,00	0,01		0,01
RTP15			0,17	0,18	
RTP16		0,02		0,02	
RTP18		0,00	0,01		
RTP19		0,01		0,02	0,04
RTP20		0,00	0,01	0,01	
RTP21		0,01	0,01	0,00	
RTP23		0,01			
RTP24					
RTP25		0,02	0,04	0,05	0,01
RTP101		0,03	0,03	0,03	
RTP103		0,04	0,03	0,05	
RTP104		0,03	0,03	0,02	
RTP105		0,00	0,01	0,00	
RTP106		0,02	0,01	0,03	
RTP107		0,00	0,02	0,01	

Lebende Inf-Mat-spezifische CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺Inf-Mat⁺Annexin V⁻PI⁻)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2					
RTP3	50,90	60,00	63,50	70,40	75,20
RTP5					
RTP6			94,10		
RTP7					
RTP8					
RTP9					
RTP11					
RTP12					
RTP13					
RTP14					
RTP15			90,00		

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP16					
RTP18					
RTP19					66,70
RTP20					
RTP21					
RTP23					
RTP24					
RTP25				62,20	
RTP101				90,00	
RTP103		92,50		86,50	
RTP104		71,00		76,70	
RTP105					
RTP106					
RTP107					

Apoptotische Inf-Mat-spezifische CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺Inf-Mat⁺ Annexin V⁺PI⁻)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2					
RTP3	46,70	40,00	35,10	29,00	22,80
RTP5					
RTP6			5,88		
RTP7					
RTP8					
RTP9					
RTP11					
RTP12					
RTP13					
RTP14					
RTP15			3,33		
RTP16					
RTP18					
RTP19					13,90
RTP20					
RTP21					
RTP23					
RTP24					
RTP25				16,20	
RTP101				2,50	
RTP103		2,50		10,80	
RTP104		19,40		2,33	
RTP105					
RTP106					
RTP107					

*Nekrotische Inf-Mat-spezifische CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺Inf-Mat⁺
Annexin V^{+/+}PI⁺)*

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2					
RTP3	2,39	0,00	1,35	0,61	1,93
RTP5					
RTP6			0,00		
RTP7					
RTP8					
RTP9					
RTP11					
RTP12					
RTP13					
RTP14					
RTP15			6,67		
RTP16					
RTP18					
RTP19					19,43
RTP20					
RTP21					
RTP23					
RTP24					
RTP25				21,60	
RTP101				7,50	
RTP103		5,00		2,70	
RTP104		9,68		20,98	
RTP105					
RTP106					
RTP107					

*Inf-Mat-spezifische Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺
Annexin V⁻PI⁻Inf-Mat⁺)*

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,06	0,04
RTP2		0,03	0,02	0,02	
RTP3	4,65	4,41	3,21	2,40	3,05
RTP5		0,00	0,01	0,00	
RTP6		0,05	0,12		
RTP7	0,00	0,00	0,00		
RTP8	0,00	0,00	0,01		0,02
RTP9		0,02	0,00	0,03	0,04
RTP11					
RTP12		0,00	0,00	0,00	0,00
RTP13		0,00	0,00	0,00	0,00
RTP14		0,00	0,01		0,01

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP15			0,17	0,18	
RTP16		0,02		0,02	
RTP18		0,01	0,01		
RTP19		0,01		0,02	0,04
RTP20		0,00	0,00	0,01	
RTP21		0,01	0,01	0,00	
RTP23		0,02			
RTP24					
RTP25		0,02	0,02	0,04	0,01
RTP101		0,01	0,03	0,03	
RTP103		0,04	0,03	0,05	
RTP104		0,02	0,02	0,02	
RTP105		0,00	0,00	0,00	
RTP106		0,02	0,01	0,03	
RTP107		0,00	0,01	0,01	

IV.iv. Färbeprotokoll 3

Naive Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻CD45RA⁺CD28⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1		14,00	9,88	10,40	9,08
RTP2	11,20	12,90	17,10	5,53	10,10
RTP3	13,90	22,00	11,40	7,97	8,95
RTP5		6,19	4,70	3,69	16,30
RTP6		16,40	25,80	6,33	
RTP7	32,40	30,60	37,50		
RTP8	28,70	21,20	16,10		17,30
RTP9		17,70		14,50	15,80
RTP11		9,34	9,15	2,33	
RTP12		20,00	14,90	11,20	2,16
RTP13		29,60	23,00	13,90	7,65
RTP14		27,30	26,50		8,76
RTP15		17,40	28,50	10,60	
RTP16		58,50	51,90	37,00	
RTP18		26,00	13,10	4,90	5,93
RTP19		18,50	9,50	16,60	5,16
RTP20		6,12	4,40	4,57	2,23
RTP21		42,40	50,00	36,30	
RTP23		10,90	5,48	6,49	
RTP24		26,30	19,80		
RTP25		13,30	11,90	5,18	13,50
RTP101		30,30	42,10	35,90	
RTP103		8,99	9,29	9,88	
RTP104		11,40	6,96	12,50	
RTP105		19,60	11,80	21,40	
RTP106		14,10	17,00	14,70	

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP107		13,40	22,10	24,80	

Differenzierte Effektoren von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻CD45RA⁺CD28⁻)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1		0,23	0,45	2,74	2,58
RTP2	1,27	0,92	1,34	2,21	0,81
RTP3	1,62	1,10	3,67	4,28	2,54
RTP5		3,56	2,89	3,39	9,02
RTP6		7,44	12,60	12,70	
RTP7	3,18	3,55	4,02		
RTP8	4,59	7,30	7,71		7,51
RTP9		3,07		4,59	2,91
RTP11		8,96	8,94	5,01	
RTP12		2,52	3,55	5,22	2,87
RTP13		3,38	4,36	4,77	8,59
RTP14		1,25	3,09		2,17
RTP15		1,88	2,72	5,31	
RTP16		1,42	3,67	4,57	
RTP18		23,70	27,20	42,70	22,80
RTP19		1,37	0,62	1,87	1,09
RTP20		1,42	2,95	3,46	2,71
RTP21		2,51	1,71	4,60	
RTP23		2,54	3,06	5,27	
RTP24		4,87	6,86		
RTP25		1,32	3,03	2,05	1,01
RTP101		1,12	1,23	0,75	
RTP103		0,94	2,60	1,17	
RTP104		5,96	10,10	4,12	
RTP105		1,61	5,37	4,41	
RTP106		2,93	4,87	4,05	
RTP107		1,03	1,20	1,42	

Antigenerfahrene Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten I (CD4⁺CD8⁻CD45RA⁻CD28⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1		85,10	87,80	81,30	84,50
RTP2	86,80	85,70	80,90	90,80	88,60
RTP3	80,80	74,90	81,90	84,10	83,40
RTP5		83,00	86,80	86,20	68,50
RTP6		68,50	51,40	74,10	
RTP7	47,80	48,70	43,20		
RTP8	64,40	67,90	72,50		71,30
RTP9		77,10		79,00	79,70

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP11		54,20	58,60	77,60	
RTP12		71,50	74,20	72,60	82,90
RTP13		60,90	65,70	74,20	63,40
RTP14		71,00	69,40		87,80
RTP15		80,30	67,50	81,20	
RTP16		39,90	43,40	57,20	
RTP18		47,00	55,30	44,60	66,70
RTP19		76,60	88,90	79,00	89,80
RTP20		89,80	85,40	86,60	87,80
RTP21		52,60	47,10	55,70	
RTP23		83,00	85,70	79,90	
RTP24		59,70	52,30		
RTP25		83,60	81,90	90,60	84,50
RTP101		67,30	55,40	62,50	
RTP103		70,80	76,60	71,10	
RTP104		69,70	62,40	73,50	
RTP105		78,00	72,50	73,10	
RTP106		73,50	67,30	72,40	
RTP107		84,70	76,40	73,40	

Antigenerfahrene Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten II (CD4⁺CD8⁻CD45RA⁻CD28⁻)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1		0,75	1,89	5,56	3,87
RTP2	0,76	0,51	0,60	1,41	0,48
RTP3	3,69	1,98	3,08	3,63	5,15
RTP5		7,23	5,59	6,71	6,24
RTP6		7,64	10,30	6,80	
RTP7	16,70	17,10	15,30		
RTP8	2,31	3,61	3,70		3,89
RTP9		2,21		1,90	1,59
RTP11		27,50	23,30	15,10	
RTP12		5,95	7,42	11,00	12,10
RTP13		6,08	6,85	7,16	20,30
RTP14		0,42	1,03		1,22
RTP15		0,49	1,28	2,94	
RTP16		0,23	1,08	1,24	
RTP18		3,21	4,46	7,83	4,62
RTP19		3,60	0,96	2,57	3,95
RTP20		2,64	7,23	5,40	7,23
RTP21		2,58	1,15	3,41	
RTP23		3,62	5,72	8,77	
RTP24		9,11	21,00		
RTP25		1,76	3,16	2,13	0,92
RTP101		1,28	1,20	0,83	
RTP103		19,30	11,50	17,90	

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP104		12,90	20,60	9,86	
RTP105		1,10	10,30	0,93	
RTP106		9,38	10,80	8,90	
RTP107		0,89	0,31	0,39	

Naive Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺CD45RA⁺CD28⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1		16,70	15,40	15,80	12,20
RTP2	12,30	14,00	14,30	12,00	11,80
RTP3	8,51	9,01	5,62	5,38	7,47
RTP5		3,72	3,65	3,23	6,13
RTP6		8,47	11,20	7,39	
RTP7	10,10	9,84	12,20		
RTP8	12,60	10,90	12,20		16,50
RTP9		11,40		17,70	18,50
RTP11					
RTP12		6,37	4,42	5,13	5,04
RTP13		9,65	8,06	7,02	3,22
RTP14		32,30	30,40		19,50
RTP15		15,70	16,70	16,40	
RTP16		33,90	40,40	29,40	
RTP18		21,00	17,10	17,50	15,70
RTP19		7,40	7,81	7,22	4,71
RTP20		9,81	7,32	8,23	4,80
RTP21		9,04	11,70	10,90	
RTP23		8,32	6,34	7,86	
RTP24					
RTP25		17,90	17,40	16,00	20,10
RTP101		14,50	18,70	18,00	
RTP103		11,50	14,60	13,70	
RTP104		7,74	4,67	9,37	
RTP105		8,30	5,96	6,24	
RTP106		18,20	20,10	16,10	
RTP107		10,90	17,90	20,50	

Differenzierte Effektoren von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺CD45RA⁺CD28⁻)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1		24,70	25,30	27,00	36,30
RTP2	45,10	37,50	47,70	31,40	45,40
RTP3	53,50	64,40	71,20	72,20	60,60
RTP5		60,20	60,60	51,70	69,20
RTP6		17,80	19,70	20,80	
RTP7	42,00	42,20	45,50		
RTP8	62,60	61,70	51,60		43,30

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP9		15,20		11,90	12,10
RTP11					
RTP12		60,10	60,30	54,80	52,00
RTP13		63,90	61,50	58,00	59,70
RTP14		9,96	8,31		7,13
RTP15		34,60	18,40	14,40	
RTP16		55,70	45,60	60,50	
RTP18		64,10	63,80	69,10	60,30
RTP19		48,90	14,60	39,10	24,20
RTP20		25,00	21,70	24,20	37,30
RTP21		52,70	55,70	40,10	
RTP23		24,00	30,60	23,30	
RTP24					
RTP25		26,50	35,40	19,10	41,30
RTP101		27,90	29,70	19,40	
RTP103		57,10	46,10	52,90	
RTP104		73,50	77,50	65,70	
RTP105		44,40	45,30	53,10	
RTP106		26,40	30,40	28,50	
RTP107		12,30	15,80	13,70	

(Zentrale) Gedächtniszellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺CD45RA⁻CD28⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1		47,00	50,10	47,10	41,00
RTP2	37,90	44,00	33,40	49,00	37,50
RTP3	31,90	21,90	19,40	19,10	27,50
RTP5		17,00	16,20	20,50	12,20
RTP6		35,70	34,70	47,40	
RTP7	28,50	28,70	23,10		
RTP8	22,20	24,10	33,10		37,40
RTP9		63,00		63,80	64,20
RTP11					
RTP12		13,10	10,90	14,70	18,00
RTP13		14,50	16,50	20,10	16,10
RTP14		52,80	55,70		67,70
RTP15		37,60	43,50	54,50	
RTP16		10,20	13,50	9,77	
RTP18		12,40	14,50	9,13	19,00
RTP19		22,20	62,10	24,40	45,40
RTP20		54,70	60,10	56,70	43,00
RTP21		19,10	12,50	26,50	
RTP23		51,70	44,20	46,20	
RTP24					
RTP25		52,00	43,00	60,50	35,20
RTP101		52,50	47,00	59,60	

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP103		22,30	27,50	24,20	
RTP104		14,50	10,90	19,60	
RTP105		31,70	31,60	26,70	
RTP106		45,70	40,80	46,50	
RTP107		66,20	57,10	56,80	

Effektor-Gedächtniszellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺CD45RA⁻CD28⁻)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1		11,70	9,26	10,10	10,40
RTP2	4,76	4,53	4,63	7,49	5,33
RTP3	6,07	4,72	3,74	3,30	4,38
RTP5		19,10	19,50	24,60	12,50
RTP6		38,00	34,40	24,50	
RTP7	19,30	19,20	19,20		
RTP8	2,60	3,33	3,06		2,87
RTP9		10,40		6,49	5,20
RTP11					
RTP12		20,40	24,40	25,30	25,00
RTP13		11,90	14,00	14,90	21,00
RTP14		4,93	5,67		5,70
RTP15		12,20	21,40	14,70	
RTP16		0,32	0,50	0,32	
RTP18		2,49	4,57	4,27	4,99
RTP19		21,70	15,70	29,50	25,80
RTP20		10,60	10,90	10,90	14,90
RTP21		19,20	20,20	22,40	
RTP23		15,90	18,90	21,50	
RTP24					
RTP25		3,58	4,29	4,40	3,41
RTP101		5,03	4,58	3,05	
RTP103		9,08	11,80	9,09	
RTP104		4,58	6,93	5,35	
RTP105		15,40	17,50	14,00	
RTP106		9,70	8,66	8,91	
RTP107		10,60	9,16	9,03	

CMV-pp65-spezifische Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺CMV-pp65⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1		0,02	0,04	0,02	0,02
RTP2	0,65	0,64	0,54	0,72	0,81
RTP3	0,03	0,02	0,02	0,02	0,03
RTP5		6,77	4,88	5,04	9,07

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP6		0,65	0,72	0,90	
RTP7	0,13	0,12	0,08		
RTP8	0,01	0,01	0,02		0,01
RTP9		0,01		0,01	0,00
RTP11					
RTP12		1,61	1,91	1,60	1,34
RTP13		0,01	0,01	0,01	0,02
RTP14		0,01	0,00		0,03
RTP15		0,00	0,01	0,05	
RTP16		0,01	0,02	0,01	
RTP18		9,68	6,23	8,02	3,76
RTP19		1,66	1,02	1,17	1,68
RTP20		0,70	0,59	0,65	0,91
RTP21		0,01	0,01	0,00	
RTP23		0,04	0,22	0,19	
RTP24					
RTP25		0,04	0,00	0,04	0,03
RTP101		0,00	0,00	0,01	
RTP103		5,43	5,15	5,25	
RTP104		0,05	0,05	0,05	
RTP105		0,00	0,01	0,00	
RTP106		4,04	4,23	4,63	
RTP107		0,03	0,03	0,01	

Naive Zellen von lebenden CMV-pp65-spezifischen Lymphozyten (CD4⁺CD8⁺CMVpp65⁺CD45RA⁺CD28⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2	15,40	13,40	15,90	11,50	14,10
RTP3					
RTP5		10,40	11,10	8,92	15,60
RTP6		17,60	19,10	20,40	
RTP7	9,35	8,97	16,70		
RTP8					
RTP9					
RTP11					
RTP12		2,76	3,41	2,64	1,69
RTP13					
RTP14					
RTP15					
RTP16					
RTP18		22,30	24,30	19,40	16,10
RTP19		2,75	3,70	3,12	2,19
RTP20		8,45	8,05	11,70	10,30
RTP21					
RTP23					

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP24					
RTP25					
RTP101					
RTP103		4,47	7,42	5,17	
RTP104		4,00		9,21	
RTP105					
RTP106		2,49	2,34	3,83	
RTP107					

*Differenzierte Effektoren von lebenden CMV-pp65-spezifischen Lymphozyten
(CD4⁺CD8⁺CMV-pp65⁺CD45RA⁺CD28⁻)*

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2	11,30	12,00	13,90	12,30	15,10
RTP3					
RTP5		41,30	49,60	38,90	51,40
RTP6		28,10	31,10	25,70	
RTP7	36,40	38,50	37,50		
RTP8					
RTP9					
RTP11					
RTP12		41,30	39,90	40,90	43,70
RTP13					
RTP14					
RTP15					
RTP16					
RTP18		74,70	70,50	75,80	74,30
RTP19		6,86	2,47	7,42	7,17
RTP20		8,86	10,80	11,70	12,90
RTP21					
RTP23					
RTP24					
RTP25					
RTP101					
RTP103		65,00	59,60	65,10	
RTP104		8,00		14,50	
RTP105					
RTP106		23,70	27,30	26,70	
RTP107					

(Zentrale) Gedächtniszellen von lebenden CMV-pp65-spezifischen Lymphozyten ($CD4^+ CD8^+ CMV-pp65^+ CD45RA^- CD28^+$)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2	59,60	62,90	57,40	64,30	56,20
RTP3					
RTP5		33,90	25,60	31,80	21,20
RTP6		35,90	33,20	33,60	
RTP7	38,30	28,20	31,20		
RTP8					
RTP9					
RTP11					
RTP12		3,61	4,15	7,04	3,60
RTP13					
RTP14					
RTP15					
RTP16					
RTP18		1,50	2,75	1,94	5,39
RTP19		57,50	64,20	50,80	56,60
RTP20		59,20	45,20	48,90	36,20
RTP21					
RTP23					
RTP24					
RTP25					
RTP101					
RTP103		14,20	14,80	13,90	
RTP104		70,00		68,40	
RTP105					
RTP106		7,67	7,34	9,65	
RTP107					

Effektor-Gedächtniszellen von lebenden CMV-pp65-spezifischen Lymphozyten ($CD4^+ CD8^+ CMV-pp65^+ CD45RA^- CD28^-$)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2	13,60	11,60	12,80	11,90	14,60
RTP3					
RTP5		14,50	13,70	20,40	11,80
RTP6		18,30	16,70	20,40	
RTP7	15,90	24,40	14,60		
RTP8					
RTP9					
RTP11					
RTP12		52,30	52,50	49,50	51,10
RTP13					
RTP14					

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP15					
RTP16					
RTP18		1,51	2,46	2,83	4,20
RTP19		32,90	29,60	38,90	34,10
RTP20		23,50	36,20	27,70	40,50
RTP21					
RTP23					
RTP24					
RTP25					
RTP101					
RTP103		16,40	18,30	15,70	
RTP104		18,00		7,89	
RTP105					
RTP106		66,20	63,00	59,80	
RTP107					

*Proliferierende Zellen von lebenden CMV-pp65-spezifischen Lymphozyten
(CD4⁻CD8⁺CMV-pp65⁺Ki67⁺)*

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2	2,06	1,37	3,38	5,95	2,41
RTP3					
RTP5		2,45	6,95	9,91	0,83
RTP6		1,31	1,04	26,50	
RTP7	3,74	2,56	8,33		
RTP8					
RTP9					
RTP11					
RTP12		3,31	4,80	3,79	0,85
RTP13					
RTP14					
RTP15					
RTP16					
RTP18		2,05	3,45	4,85	2,39
RTP19		1,18	6,17	4,17	0,20
RTP20		3,94	14,60	6,81	0,86
RTP21					
RTP23					
RTP24					
RTP25					
RTP101					
RTP103		3,18	3,49	1,92	
RTP104		2,00		5,26	
RTP105					
RTP106		2,77	1,79	1,53	
RTP107					

EBV-BMLF1-spezifische Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺EBV-BMLF1⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1		0,03	0,04	0,06	0,03
RTP2	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02
RTP3	0,25	0,21	0,12	0,12	0,16
RTP5		0,05	0,03	0,05	0,03
RTP6		0,48	0,48	1,27	
RTP7	0,10	0,10	0,07		
RTP8	0,13	0,13	0,06		0,07
RTP9		0,24		0,09	0,11
RTP11					
RTP12		0,06	0,05	0,07	0,07
RTP13		0,07	0,12	0,12	0,10
RTP14		4,00	2,77		2,29
RTP15		0,01	0,02	0,05	
RTP16		0,13	0,15	0,14	
RTP18		0,32	0,27	0,40	0,34
RTP19		0,07	0,03	0,06	0,05
RTP20		0,55	0,23	0,10	0,08
RTP21		1,28	1,63	1,60	
RTP23		1,74	1,80	1,61	
RTP24					
RTP25		0,92	1,31	0,84	0,87
RTP101		0,06	0,08	0,07	
RTP103		0,03	0,03	0,05	
RTP104		0,24	0,25	0,36	
RTP105		0,18	0,22	0,08	
RTP106		1,40	1,41	1,51	
RTP107		0,03	0,02	0,03	

Naive Zellen von lebenden EBV-BMLF1-spezifischen Lymphozyten (CD4⁺CD8⁺EBV-BMLF1⁺CD45RA⁺CD28⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2					
RTP3	21,50	38,80	25,90	38,70	26,20
RTP5		1,05	0,00	0,00	
RTP6		0,00	1,18	1,25	
RTP7	2,56	4,35	2,44		
RTP8	19,40	9,84	10,30		
RTP9		0,00		3,23	3,12
RTP11					
RTP12		28,00	21,20	13,20	29,90
RTP13		0,00	2,86	7,53	
RTP14		58,60	56,70		58,50

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP15					
RTP16		86,10	75,00		
RTP18		23,20	26,00	21,40	23,60
RTP19		0,00		0,00	
RTP20		5,01	8,94	8,06	
RTP21		16,20	14,90	15,40	
RTP23		0,00	0,00		
RTP24					
RTP25		34,70	39,20	33,00	40,50
RTP101				28,60	
RTP103					
RTP104		4,98	4,41	6,84	
RTP105			10,00		
RTP106		37,40	41,90	40,80	
RTP107					

*Differenzierte Effektoren von lebenden EBV-BMLF1-spezifischen Lymphozyten
(CD4⁺CD8⁺EBV-BMLF1⁺CD45RA⁺CD28⁻)*

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2					
RTP3	25,20	16,30	28,40	22,70	21,30
RTP5		9,47	8,89	14,30	
RTP6		6,14	7,87	3,75	
RTP7	24,40	27,50	24,40		
RTP8	26,20	32,80	41,00		
RTP9		22,40		3,23	9,38
RTP11					
RTP12		34,70	30,80	23,50	24,70
RTP13		22,60	8,57	11,80	
RTP14		14,20	15,60		16,30
RTP15					
RTP16		8,33	16,70		
RTP18		40,80	28,40	33,90	22,40
RTP19		17,10		4,88	
RTP20		8,66	11,40	14,50	
RTP21		56,50	50,20	30,80	
RTP23		1,97	6,06		
RTP24					
RTP25		13,40	22,80	25,30	20,80
RTP101				11,40	
RTP103					
RTP104		2,07	5,88	2,09	
RTP105			23,30		
RTP106		7,65	7,35	6,38	
RTP107					

(Zentrale) Gedächtniszellen von lebenden EBV-BMLF1-spezifischen
Lymphozyten ($CD4^+CD8^+EBV-BMLF1^+CD45RA^-CD28^+$)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2					
RTP3	41,10	36,10	25,90	24,00	36,10
RTP5		45,30	40,00	65,70	
RTP6		43,90	52,00	41,90	
RTP7	33,30	27,50	36,60		
RTP8	46,60	45,90	28,20		
RTP9		67,20		77,40	87,50
RTP11					
RTP12		32,00	26,90	48,50	36,40
RTP13		38,70	62,90	59,10	
RTP14		25,30	25,00		23,30
RTP15					
RTP16		2,78	4,17		
RTP18		25,30	31,40	20,80	31,70
RTP19		26,80		51,20	
RTP20		64,90	54,40	50,00	
RTP21		16,80	18,10	21,20	
RTP23		85,70	72,70		
RTP24					
RTP25		47,70	26,60	34,80	32,70
RTP101				57,10	
RTP103					
RTP104		88,00	86,80	84,80	
RTP105			53,30		
RTP106		51,40	48,70	50,70	
RTP107					

Effektor-Gedächtniszellen von lebenden EBV-BMLF1-spezifischen
Lymphozyten ($CD4^+CD8^+EBV-BMLF1^+CD45RA^-CD28^-$)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2					
RTP3	12,10	8,84	19,80	14,70	16,40
RTP5		44,20	51,10	20,00	
RTP6		50,00	39,00	53,10	
RTP7	39,70	40,60	36,60		
RTP8	7,77	11,50	20,50		
RTP9		10,40		16,10	0,00
RTP11					
RTP12		5,33	21,20	14,70	9,09
RTP13		38,70	25,70	21,50	
RTP14		1,99	2,74		1,93

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP15					
RTP16		2,78	4,17		
RTP18		10,70	14,20	23,80	22,40
RTP19		56,10		43,90	
RTP20		21,40	25,20	27,40	
RTP21		10,50	16,80	32,70	
RTP23		12,50	21,20		
RTP24					
RTP25		3,96	11,40	6,79	5,95
RTP101				2,86	
RTP103					
RTP104		4,98	2,94	6,27	
RTP105			10,00		
RTP106		3,48	1,98	2,09	
RTP107					

*Proliferierende Zellen von lebenden EBV-BMLF1-spezifischen Lymphozyten
(CD4⁺CD8⁺EBV-BMLF1⁺Ki67⁺)*

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2					
RTP3	6,54	1,36	0,00	2,67	8,20
RTP5		6,32	13,30	17,10	
RTP6		1,75	3,54	15,00	
RTP7	2,56	2,90	12,20		
RTP8	0,97	0,82	10,30		
RTP9		4,48		6,45	0,00
RTP11					
RTP12		8,00	11,50	8,82	3,90
RTP13		6,45	11,40	8,60	
RTP14		2,65	2,45		3,54
RTP15					
RTP16		0,00	2,08		
RTP18		2,77	6,51	13,10	1,24
RTP19		0,00		4,88	
RTP20		2,40	4,88	8,06	
RTP21		13,60	7,72	21,20	
RTP23		2,13	3,03		
RTP24					
RTP25		0,88	12,70	3,17	0,60
RTP101				8,57	
RTP103					
RTP104		1,66	1,47	0,19	
RTP105			30,00		
RTP106		0,50	0,88	1,79	
RTP107					

EBV-LMP2-spezifische Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺ EBV-LMP2⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1		0,02	0,04	0,04	0,03
RTP2	0,02	0,03	0,03	0,02	0,03
RTP3	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02
RTP5		0,04	0,04	0,03	0,04
RTP6		0,03	0,03	0,03	
RTP7	0,03	0,02	0,02		
RTP8	0,12	0,17	0,08		0,09
RTP9		0,04		0,03	0,02
RTP11					
RTP12		0,01	0,00	0,03	0,02
RTP13		0,01	0,02	0,01	0,00
RTP14		0,16	0,21		0,13
RTP15		0,09	0,07	0,10	
RTP16		0,01	0,02	0,01	
RTP18		0,10	0,07	0,04	0,07
RTP19		0,03	0,21	0,14	0,06
RTP20		0,03	0,02	0,01	0,02
RTP21		0,02	0,02	0,06	
RTP23		0,01	0,22	0,06	
RTP24					
RTP25		0,04	0,00	0,06	0,06
RTP101		0,02	0,02	0,02	
RTP103		0,16	0,15	0,23	
RTP104		0,01	0,01	0,02	
RTP105		0,01	0,04	0,02	
RTP106		0,13	0,08	0,10	
RTP107		0,04	0,04	0,03	

Naive Zellen von lebenden EBV-LMP2-spezifischen Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺ EBV-LMP2⁺CD45RA⁺CD28⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2		0,00			
RTP3					
RTP5		0,00	0,00		
RTP6					
RTP7					
RTP8	1,04	0,60	1,92		
RTP9					
RTP11					
RTP12					
RTP13					
RTP14		0,00	0,00		0,00

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP15					
RTP16					
RTP18		0,00	0,00		0,00
RTP19				0,00	
RTP20		4,08			
RTP21					
RTP23					
RTP24					
RTP25					
RTP101					
RTP103		0,00	8,82	5,56	
RTP104					
RTP105					
RTP106		10,40	25,00	8,96	
RTP107					

*Differenzierte Effektoren von lebenden EBV-LMP2-spezifischen Lymphozyten
(CD4⁺CD8⁺EBV-LMP2⁺CD45RA⁺CD28⁻)*

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2		0,00			
RTP3					
RTP5		1,09	0,00		
RTP6					
RTP7					
RTP8	3,12	2,41	7,69		
RTP9					
RTP11					
RTP12					
RTP13					
RTP14		7,58	1,27		0,00
RTP15					
RTP16					
RTP18		9,30	12,20		15,20
RTP19				1,09	
RTP20		30,60			
RTP21					
RTP23					
RTP24					
RTP25					
RTP101					
RTP103		7,55	8,82	11,10	
RTP104					
RTP105					
RTP106		2,08	3,85	7,46	
RTP107					

(Zentrale) Gedächtniszellen von lebenden EBV-LMP2-spezifischen Lymphozyten ($CD4^+ CD8^+ EBV-LMP2^+ CD45RA^- CD28^+$)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2		93,50			
RTP3					
RTP5		78,30	80,40		
RTP6					
RTP7					
RTP8	94,80	94,00	76,90		
RTP9					
RTP11					
RTP12					
RTP13					
RTP14		89,40	96,20		91,20
RTP15					
RTP16					
RTP18		74,40	63,40		57,60
RTP19				97,80	
RTP20		32,70			
RTP21					
RTP23					
RTP24					
RTP25					
RTP101					
RTP103		90,60	82,40	80,60	
RTP104					
RTP105					
RTP106		82,30	69,20	80,60	
RTP107					

Effektor-Gedächtniszellen von lebenden EBV-LMP2-spezifischen Lymphozyten ($CD4^+ CD8^+ EBV-LMP2^+ CD45RA^- CD28^-$)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2		6,45			
RTP3					
RTP5		20,70	19,60		
RTP6					
RTP7					
RTP8	1,04	3,01	13,50		
RTP9					
RTP11					
RTP12					
RTP13					
RTP14		3,03	2,53		8,82

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP15					
RTP16					
RTP18		16,30	24,40		27,30
RTP19				1,09	
RTP20		32,70			
RTP21					
RTP23					
RTP24					
RTP25					
RTP101					
RTP103		1,89	0,00	2,78	
RTP104					
RTP105					
RTP106		5,21	1,92	2,99	
RTP107					

*Proliferierende Zellen von lebenden EBV-LMP2-spezifischen Lymphozyten
(CD4⁻CD8⁺EBV-LMP2⁺Ki67⁺)*

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2		6,45			
RTP3					
RTP5		2,17	9,80		
RTP6					
RTP7					
RTP8	2,08	3,01	17,30		
RTP9					
RTP11					
RTP12					
RTP13					
RTP14		1,52	2,45		0,00
RTP15					
RTP16					
RTP18		5,81	7,32		15,20
RTP19				3,26	
RTP20		2,04			
RTP21					
RTP23					
RTP24					
RTP25					
RTP101					
RTP103		3,77	0,00	2,78	
RTP104					
RTP105					
RTP106		1,04	3,85	1,49	
RTP107					

Inf-Mat-spezifische Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺Inf-Mat⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1		0,03	0,08	0,05	0,02
RTP2	0,03	0,02	0,01	0,02	0,03
RTP3	4,89	3,89	2,54	1,55	2,18
RTP5		0,01	0,01	0,03	0,01
RTP6		0,11	0,15	0,06	
RTP7	0,02	0,01	0,00		
RTP8	0,01	0,01	0,02		0,02
RTP9		0,03		0,07	0,01
RTP11					
RTP12		0,00	0,00	0,01	0,00
RTP13		0,00	0,01	0,00	0,00
RTP14		0,03	0,02		0,00
RTP15		0,00	0,26	0,25	
RTP16		0,01	0,02	0,01	
RTP18		0,01	0,01	0,01	0,01
RTP19		0,04	0,10	0,04	0,10
RTP20		0,00	0,01	0,00	0,00
RTP21		0,01	0,01	0,00	
RTP23		0,01	0,11	0,00	
RTP24					
RTP25		0,03	0,05	0,04	0,02
RTP101		0,05	0,03	0,04	
RTP103		0,09	0,04	0,04	
RTP104		0,03	0,01	0,03	
RTP105		0,08	0,08	0,04	
RTP106		0,03	0,02	0,02	
RTP107		0,01	0,03	0,03	

Naive Zellen von lebenden Inf-Mat-spezifischen Lymphozyten (CD4⁺CD8⁺Inf-Mat⁺CD45RA⁺CD28⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2					
RTP3	5,01	5,48	6,70	7,09	8,42
RTP5					
RTP6			3,75		
RTP7					
RTP8					
RTP9					
RTP11					
RTP12					
RTP13					
RTP14					

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP15					
RTP16					
RTP18					
RTP19					6,67
RTP20					
RTP21					
RTP23					
RTP24					
RTP25					
RTP101					
RTP103		6,45			
RTP104				12,80	
RTP105					
RTP106					
RTP107					

Differenzierte Effektoren von lebenden Inf-Mat-spezifischen Lymphozyten (CD4⁺CD8⁺Inf-Mat⁺CD45RA⁺CD28⁻)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2					
RTP3	75,30	81,60	78,60	79,70	75,10
RTP5					
RTP6			50,00		
RTP7					
RTP8					
RTP9					
RTP11					
RTP12					
RTP13					
RTP14					
RTP15					
RTP16					
RTP18					
RTP19					0,00
RTP20					
RTP21					
RTP23					
RTP24					
RTP25					
RTP101					
RTP103		9,68			
RTP104				5,13	
RTP105					
RTP106					
RTP107					

(Zentrale) Gedächtniszellen von lebenden Inf-Mat-spezifischen Lymphozyten
($CD4^+CD8^+Inf-Mat^+CD45RA^-CD28^+$)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2					
RTP3	6,05	4,13	6,19	7,39	7,34
RTP5					
RTP6			15,00		
RTP7					
RTP8					
RTP9					
RTP11					
RTP12					
RTP13					
RTP14					
RTP15					
RTP16					
RTP18					
RTP19					90,00
RTP20					
RTP21					
RTP23					
RTP24					
RTP25					
RTP101					
RTP103		80,60			
RTP104				74,40	
RTP105					
RTP106					
RTP107					

Effektor-Gedächtniszellen von lebenden Inf-Mat-spezifischen Lymphozyten
($CD4^+CD8^+Inf-Mat^+CD45RA^-CD28^-$)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2					
RTP3	13,70	8,83	8,54	5,79	9,15
RTP5					
RTP6			31,20		
RTP7					
RTP8					
RTP9					
RTP11					
RTP12					
RTP13					
RTP14					

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP15					
RTP16					
RTP18					
RTP19					3,33
RTP20					
RTP21					
RTP23					
RTP24					
RTP25					
RTP101					
RTP103		3,23			
RTP104				7,69	
RTP105					
RTP106					
RTP107					

Proliferierende Zellen von lebenden Inf-Mat-spezifischen Lymphozyten (CD4⁻ CD8⁺ Inf-Mat⁺ Ki67⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1					
RTP2					
RTP3	3,97	1,47	1,26	4,39	2,77
RTP5					
RTP6			2,50		
RTP7					
RTP8					
RTP9					
RTP11					
RTP12					
RTP13					
RTP14					
RTP15					
RTP16					
RTP18					
RTP19					3,33
RTP20					
RTP21					
RTP23					
RTP24					
RTP25					
RTP101					
RTP103		0,00			
RTP104				2,56	
RTP105					
RTP106					
RTP107					

IV.v. Durchgeführte Tests in Färbeprotokoll 4 (ICS)

Stimulans	HIV	SEB	CMV-pp65	EBV-BMLF1	EBV-LMP2	Inf-Mat
RTP1	ja	ja	nein	nein	nein	ja
RTP2	ja	ja	ja	nein	nein	nein
RTP3	ja	ja	nein	ja	nein	ja
RTP5	ja	ja	ja	nein	ja	nein
RTP6	ja	ja	ja	nein	nein	nein
RTP7	ja	ja	nein	nein	nein	nein
RTP8	ja	ja	nein	ja	ja	nein
RTP9	nein	nein	nein	nein	nein	nein
RTP11	ja	ja	nein	ja	nein	nein
RTP12	ja	ja	ja	nein	nein	nein
RTP13	ja	ja	nein	ja	nein	nein
RTP14	nein	nein	nein	nein	nein	nein
RTP15	nein	nein	nein	nein	nein	nein
RTP16	nein	nein	nein	nein	nein	nein
RTP18	ja	ja	ja	ja	nein	nein
RTP19	ja	ja	ja	nein	nein	nein
RTP20	ja	ja	ja	ja	nein	nein
RTP21	ja	ja	nein	ja	nein	nein
RTP23	ja	ja	nein	ja	nein	nein
RTP24	ja	ja	nein	ja	nein	nein
RTP25	ja	ja	nein	ja	nein	nein
RTP101	ja	ja	nein	ja	nein	nein
RTP103	ja	ja	ja	nein	nein	nein
RTP104	ja	ja	nein	ja	nein	nein
RTP105	nein	nein	nein	nein	nein	nein
RTP106	ja	ja	ja	ja	nein	nein
RTP107	ja	ja	nein	nein	ja	nein

In den unter IV.vi. bis IV.xi. folgenden Tabellen werden lediglich die Probanden gezeigt, für die mindestens ein Test im Färbeprotokoll 4 durchgeführt wurde.

IV.vi. ICS (Färbeprotokoll 4) nach Stimulation mit einem HIV-Peptid

IL-2-produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IL-2⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,02	0,04
RTP2	0,08	0,02	0,04		0,02
RTP3	0,02	0,02	0,02		0,02
RTP5		0,02		0,04	0,05
RTP6					
RTP7	0,06	0,21	0,58		
RTP8	0,03	0,04			0,11
RTP11		0,16	0,02	0,08	
RTP12		0,02	0,02	0,02	0,03

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP13		0,02	0,02	0,02	
RTP18		0,05	0,07		
RTP19		0,02		0,04	0,09
RTP20		0,09		0,06	
RTP21		0,01	0,02		
RTP23		0,02	0,02		
RTP24		0,02	0,03		
RTP25		0,03		0,04	0,06
RTP101		0,01	0,02	0,01	
RTP103		0,01	0,01		
RTP104		0,60	0,82	0,65	
RTP106		0,06	0,07	0,09	
RTP107		0,02	0,02		

IL-5-produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IL-5⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,09	0,15
RTP2	0,17	0,11	0,12		0,08
RTP3	0,08	0,11	0,06		0,09
RTP5		0,21		0,20	0,23
RTP6					
RTP7	0,07	0,08	0,07		
RTP8	0,07	0,08			0,06
RTP11		0,06	0,06	0,07	
RTP12		0,08	0,06	0,07	0,07
RTP13		0,05	0,05	0,06	
RTP18		0,22	0,17		
RTP19		0,12		0,13	0,12
RTP20		0,23		0,18	
RTP21		0,10	0,07		
RTP23		0,10	0,17		
RTP24		0,09	0,07		
RTP25		0,11		0,17	0,17
RTP101		0,02	0,01	0,02	
RTP103		0,04	0,04		
RTP104		0,01	0,03	0,03	
RTP106		0,02	0,03	0,03	
RTP107		0,01	0,02		

IL-10-produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IL-10⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,02	0,02
RTP2	0,07	0,04	0,09		0,03
RTP3	0,02	0,02	0,01		0,03

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP5		0,06		0,07	0,04
RTP6					
RTP7	0,02	0,04	0,03		
RTP8	0,02	0,03			0,02
RTP11		0,03	0,02	0,03	
RTP12		0,05	0,04	0,06	0,05
RTP13		0,04	0,03	0,03	
RTP18		0,01	0,01		
RTP19		0,03		0,04	0,05
RTP20		0,04		0,02	
RTP21		0,06	0,02		
RTP23		0,03	0,02		
RTP24		0,03	0,01		
RTP25		0,05		0,04	0,06
RTP101		0,09	0,07	0,07	
RTP103		0,03	0,04		
RTP104		0,04	0,07	0,06	
RTP106		0,19	0,19	0,25	
RTP107		0,08	0,08		

IL-17-produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IL-17⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,00	0,00
RTP2	0,03	0,03	0,07		0,02
RTP3	0,00	0,00	0,00		0,00
RTP5		0,05		0,05	0,05
RTP6					
RTP7	0,00	0,00	0,00		
RTP8	0,00	0,00			0,00
RTP11		0,00	0,00	0,00	
RTP12		0,04	0,03	0,03	0,04
RTP13		0,00	0,00	0,00	
RTP18		0,00	0,00		
RTP19		0,04		0,04	0,04
RTP20		0,00		0,00	
RTP21		0,00	0,00		
RTP23		0,01	0,02		
RTP24		0,00	0,00		
RTP25		0,01		0,03	0,02
RTP101		0,03	0,04	0,03	
RTP103		0,03	0,03		
RTP104		0,01	0,02	0,02	
RTP106		0,02	0,03	0,04	
RTP107		0,05	0,05		

IFN- γ -produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IFN- γ ⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,07	0,09
RTP2	0,08	0,05	0,03		0,03
RTP3	0,07	0,07	0,05		0,03
RTP5		0,07		0,05	0,09
RTP6					
RTP7	0,04	0,05	0,06		
RTP8	0,04	0,06			0,05
RTP11		0,10	0,06	0,08	
RTP12		0,04	0,04	0,05	0,04
RTP13		0,04	0,04	0,06	
RTP18		0,17	0,13		
RTP19		0,08		0,13	0,09
RTP20		0,16		0,14	
RTP21		0,00	0,04		
RTP23		0,05	0,08		
RTP24		0,07	0,06		
RTP25		0,08		0,11	0,09
RTP101		0,01	0,01	0,00	
RTP103		0,04	0,03		
RTP104		0,05	0,07	0,01	
RTP106		0,02	0,04	0,03	
RTP107		0,00	0,01		

TNF- α -produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻TNF- α ⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,09	0,14
RTP2	0,14	0,21	0,23		0,13
RTP3	0,08	0,09	0,08		0,09
RTP5		0,11		0,15	0,15
RTP6					
RTP7	0,12	0,22	0,55		
RTP8	0,09	0,14			0,18
RTP11		0,28	0,11	0,39	
RTP12		0,15	0,14	0,14	0,18
RTP13		0,12	0,11	0,13	
RTP18		0,15	0,17		
RTP19		0,13		0,20	0,21
RTP20		0,18		0,17	
RTP21		0,11	0,09		
RTP23		0,07	0,09		
RTP24		0,10	0,11		
RTP25		0,13		0,17	0,12

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP101		0,07	0,04	0,04	
RTP103		0,12	0,11		
RTP104		0,10	0,16	0,12	
RTP106		0,04	0,03	0,03	
RTP107		0,06	0,06		

IL-2-produzierende Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺IL-2⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,01	0,01
RTP2	0,01	0,01	0,01		0,02
RTP3	0,00	0,00	0,00		0,00
RTP5		0,01		0,00	0,01
RTP6					
RTP7	0,00	0,01	0,01		
RTP8	0,01	0,02			0,01
RTP11		0,01	0,00	0,05	
RTP12		0,00	0,01	0,02	0,01
RTP13		0,01	0,00	0,01	
RTP18		0,01	0,01		
RTP19		0,01		0,03	0,02
RTP20		0,01		0,01	
RTP21		0,00	0,01		
RTP23		0,02	0,00		
RTP24		0,00	0,00		
RTP25		0,01		0,03	0,02
RTP101		0,01	0,02	0,01	
RTP103		0,02	0,02		
RTP104		0,46	0,76	0,63	
RTP106		0,08	0,07	0,08	
RTP107		0,02	0,01		

IL-10-produzierende Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺IL-10⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,01	0,02
RTP2	0,09	0,05	0,10		0,01
RTP3	0,01	0,00	0,01		0,03
RTP5		0,06		0,08	0,04
RTP6					
RTP7	0,03	0,04	0,04		
RTP8	0,03	0,03			0,02
RTP11		0,03	0,03	0,00	
RTP12		0,05	0,04	0,08	0,05
RTP13		0,04	0,03	0,03	
RTP18		0,01	0,01		

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP19		0,04		0,04	0,07
RTP20		0,02		0,01	
RTP21		0,03	0,01		
RTP23		0,02	0,04		
RTP24		0,02	0,01		
RTP25		0,05		0,07	0,06
RTP101		0,10	0,06	0,09	
RTP103		0,06	0,05		
RTP104		0,05	0,06	0,06	
RTP106		0,14	0,07	0,11	
RTP107		0,08	0,07		

IFN- γ -produzierende Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺IFN- γ ⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,00	0,01
RTP2	0,17	0,10	0,05		0,21
RTP3	0,02	0,02	0,05		0,01
RTP5		0,19		0,10	0,05
RTP6					
RTP7	0,05	0,03	0,14		
RTP8	0,14	0,42			0,17
RTP11		0,43	0,49	1,12	
RTP12		0,11	0,03	0,05	0,07
RTP13		0,25	0,23	0,15	
RTP18		0,16	0,10		
RTP19		0,10		0,15	0,16
RTP20		0,01		0,01	
RTP21		0,02	0,05		
RTP23		0,04	0,21		
RTP24		0,04	0,14		
RTP25		0,02		0,03	0,01
RTP101		0,06	0,13	0,01	
RTP103		0,10	0,10		
RTP104		0,11	0,09	0,00	
RTP106		1,77	0,16	0,19	
RTP107		0,01	0,01		

TNF- α -produzierende Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺TNF- α ⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,14	0,21
RTP2	0,38	0,28	0,58		0,43
RTP3	0,13	0,15	0,22		0,14

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP5		1,37		1,20	0,74
RTP6					
RTP7	0,18	0,15	0,31		
RTP8	0,69	1,76			0,77
RTP11		0,93	0,92	1,87	
RTP12		0,64	0,32	0,32	0,45
RTP13		0,93	0,92	0,57	
RTP18		0,26	0,40		
RTP19		0,95		1,78	1,03
RTP20		0,13		0,11	
RTP21		0,15	0,43		
RTP23		0,14	0,33		
RTP24		0,21	0,41		
RTP25		0,13		0,11	0,12
RTP101		0,12	0,09	0,05	
RTP103		0,37	0,32		
RTP104		0,16	0,24	0,13	
RTP106		0,44	0,20	0,22	
RTP107		0,14	0,10		

Zellen mit Zytokinsekretion von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺CD107a⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,80	0,57
RTP2	1,48	0,61	1,20		2,65
RTP3	0,40	0,34	1,30		1,16
RTP5		0,96		1,87	1,04
RTP6					
RTP7	0,94	0,53	2,06		
RTP8	0,48	1,18			0,74
RTP11		0,99	2,76	4,49	
RTP12		0,45	0,40	0,64	1,30
RTP13		1,57	1,06	0,86	
RTP18		1,02	0,62		
RTP19		3,65		3,93	5,78
RTP20		0,36		0,42	
RTP21		0,12	0,65		
RTP23		0,14	0,34		
RTP24		0,39	0,73		
RTP25		0,48		0,68	0,52
RTP101		0,18	0,25	0,09	
RTP103		1,09	1,88		
RTP104		0,30	0,62	0,08	
RTP106		0,99	0,30	0,55	
RTP107		0,30	0,32		

*IFN- γ -produzierende und -sekretierende Zellen von lebenden CD8⁺-
Lymphozyten (CD4⁺CD8⁺IFN- γ ⁺CD107a⁺)*

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,00	0,00
RTP2	0,03	0,02	0,02		0,06
RTP3	0,00	0,00	0,01		0,00
RTP5		0,08		0,07	0,02
RTP6					
RTP7	0,01	0,01	0,04		
RTP8	0,01	0,09			0,03
RTP11		0,13	0,14	0,69	
RTP12		0,01	0,00	0,01	0,02
RTP13		0,17	0,11	0,07	
RTP18		0,03	0,01		
RTP19		0,05		0,06	0,05
RTP20		0,00		0,00	
RTP21		0,00	0,02		
RTP23		0,00	0,00		
RTP24		0,00	0,03		
RTP25		0,01		0,00	0,00
RTP101		0,01	0,02	0,00	
RTP103		0,03	0,03		
RTP104		0,02	0,03	0,00	
RTP106		0,21	0,03	0,05	
RTP107		0,00	0,00		

**IV.vii. ICS (Färbeprotokoll 4) nach Stimulation mit SEB und Abzug der
Basisproduktion (Stimulation mit HIV)**

IL-2-produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IL-2⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				3,20	7,11
RTP2	5,47	5,39	4,31		6,06
RTP3	6,64		6,32		7,70
RTP5		5,42		6,73	10,48
RTP6					
RTP7	7,57	6,98	8,35		
RTP8	6,67	8,59			9,01
RTP11		9,13	7,79	0,08	
RTP12		13,01	13,97	11,90	5,79
RTP13		2,39	4,57	5,76	
RTP18		5,36	6,54		
RTP19		4,39		5,53	4,98
RTP20		5,82		3,75	
RTP21		2,12	7,90		
RTP23		3,77	8,84		

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP24		6,76	5,17		
RTP25		5,37		5,77	5,07
RTP101		6,36	6,93	3,49	
RTP103		2,69	3,51		
RTP104		6,37	7,55	5,48	
RTP106		5,53	4,86		
RTP107		9,32	8,36		

IL-5-produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IL-5⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,03	0,00
RTP2	0,22	0,14	0,04		0,43
RTP3	0,03		0,08		0,03
RTP5		0,00		0,00	0,06
RTP6					
RTP7	0,00	0,01	0,00		
RTP8	0,05	0,02			0,02
RTP11		0,06	0,02	0,08	
RTP12		0,43	0,32	0,31	0,05
RTP13		0,02	0,04	0,01	
RTP18		0,00	0,09		
RTP19		0,00		0,00	0,00
RTP20		0,01		0,04	
RTP21		0,00	0,02		
RTP23		0,00	0,26		
RTP24		0,00	0,02		
RTP25		0,07		0,12	0,13
RTP101		0,00	0,03	0,00	
RTP103		0,17	0,26		
RTP104		0,03	0,02	0,00	
RTP106		0,08	0,01		
RTP107		0,08	0,06		

IL-10-produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IL-10⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,04	0,15
RTP2	0,13	0,16	0,02		0,10
RTP3	0,00		0,02		0,01
RTP5		0,10		0,08	0,33
RTP6					
RTP7	0,02	0,01	0,00		
RTP8	0,03	0,02			0,05
RTP11		0,03	0,04	0,08	
RTP12		0,09	0,10	0,06	0,00

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP13		0,03	0,04	0,03	
RTP18		0,01	0,04		
RTP19		0,06		0,04	0,03
RTP20		0,06		0,05	
RTP21		0,00	0,06		
RTP23		0,03	0,32		
RTP24		0,00	0,03		
RTP25		0,03		0,08	0,05
RTP101		0,10	0,12	0,16	
RTP103		0,07	0,10		
RTP104		0,04	0,01	0,05	
RTP106		0,24	0,04		
RTP107		0,30	0,28		

IL-17-produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IL-17⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,01	0,05
RTP2	0,12	0,09	0,04		0,08
RTP3	0,03		0,03		0,08
RTP5		0,04		0,08	0,07
RTP6					
RTP7	0,03	0,02	0,00		
RTP8	0,01	0,01			0,04
RTP11		0,00	0,01	0,08	
RTP12		0,23	0,26	0,19	0,29
RTP13		0,00	0,01	0,01	
RTP18		0,01	0,05		
RTP19		0,05		0,01	0,10
RTP20		0,03		0,02	
RTP21		0,01	0,01		
RTP23		0,13	0,16		
RTP24		0,00	0,00		
RTP25		0,06		0,08	0,08
RTP101		0,07	0,06	0,08	
RTP103		0,05	0,06		
RTP104		0,05	0,02	0,05	
RTP106		0,12	0,06		
RTP107		0,63	0,41		

IFN- γ -produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IFN- γ ⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,26	0,80
RTP2	1,25	0,96	0,84		1,42
RTP3	0,72		0,94		2,01
RTP5		1,68		1,94	2,79
RTP6					
RTP7	1,46	2,11	1,55		
RTP8	0,57	1,53			1,72
RTP11		0,10	3,52	0,08	
RTP12		1,22	1,54	1,87	1,50
RTP13		0,76	1,32	1,80	
RTP18		1,23	2,41		
RTP19		1,00		1,30	1,92
RTP20		0,90		0,49	
RTP21		0,28	0,46		
RTP23		0,64	0,91		
RTP24		0,99	0,94		
RTP25		0,93		2,11	1,25
RTP101		0,85	0,68	0,37	
RTP103		3,12	2,41		
RTP104		6,28	10,97	4,53	
RTP106		3,55	3,17		
RTP107		3,12	2,25		

TNF- α -produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻TNF- α ⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				1,41	4,02
RTP2	5,65	4,20	3,59		7,50
RTP3	6,01		5,18		6,36
RTP5		6,75		7,01	12,11
RTP6					
RTP7	6,24	6,94	6,16		
RTP8	3,79	7,84			7,00
RTP11		0,28	9,81	0,08	
RTP12		14,68	13,48	12,36	6,80
RTP13		4,19	7,91	7,56	
RTP18		5,19	6,55		
RTP19		6,70		8,64	5,75
RTP20		6,05		2,83	
RTP21		3,41	11,41		
RTP23		2,77	11,09		
RTP24		6,34	5,32		
RTP25		2,96		6,06	3,31

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP101		5,96	4,25	1,31	
RTP103		6,17	5,96		
RTP104		7,50	11,96	4,88	
RTP106		6,04	4,82		
RTP107		9,31	6,59		

IL-2-produzierende Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺IL-2⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,43	0,88
RTP2	2,30	1,54	1,13		1,62
RTP3	3,39		1,33		2,62
RTP5		3,98		4,43	2,16
RTP6					
RTP7	0,94	1,63	0,96		
RTP8	1,30	1,99			2,50
RTP11		1,31	1,80	0,08	
RTP12		2,16	1,74	2,33	1,57
RTP13		1,39	1,33	1,25	
RTP18		2,00	3,61		
RTP19		1,02		0,87	1,81
RTP20		2,62		1,77	
RTP21		1,30	1,10		
RTP23		3,16	3,80		
RTP24		0,93	1,02		
RTP25		2,95		5,19	2,84
RTP101		6,78	5,52	2,74	
RTP103		0,44	0,52		
RTP104		1,51	0,88	0,81	
RTP106		1,47	0,96		
RTP107		3,06	2,84		

IL-10-produzierende Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺IL-10⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,01	0,03
RTP2	0,01	0,03	0,00		0,07
RTP3	0,01		0,00		0,00
RTP5		0,00		0,00	0,07
RTP6					
RTP7	0,00	0,00	0,00		
RTP8	0,01	0,00			0,02
RTP11		0,00	0,02	0,08	
RTP12		0,01	0,03	0,00	0,00
RTP13		0,01	0,00	0,00	
RTP18		0,00	0,01		

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP19		0,01		0,02	0,00
RTP20		0,00		0,01	
RTP21		0,02	0,03		
RTP23		0,04	0,32		
RTP24		0,00	0,02		
RTP25		0,00		0,00	0,06
RTP101		0,14	0,17	0,15	
RTP103		0,00	0,03		
RTP104		0,05	0,01	0,03	
RTP106		0,20	0,04		
RTP107		0,15	0,14		

IFN- γ -produzierende Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺IFN- γ ⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				1,44	2,88
RTP2	3,94	2,64	2,30		2,77
RTP3	5,19		2,79		3,70
RTP5		10,69		11,87	5,63
RTP6					
RTP7	2,82	3,35	1,94		
RTP8	3,15	5,74			3,05
RTP11		35,58	31,12	0,08	
RTP12		5,26	5,07	5,80	6,25
RTP13		15,97	13,41	11,91	
RTP18		15,95	19,39		
RTP19		9,58		8,27	8,90
RTP20		2,38		1,14	
RTP21		2,19	1,78		
RTP23		3,14	4,20		
RTP24		2,08	2,02		
RTP25		2,80		4,30	4,10
RTP101		4,37	4,23	2,55	
RTP103		4,86	5,08		
RTP104		1,97	1,59	0,90	
RTP106		2,35	3,63		
RTP107		6,18	4,90		

TNF- α -produzierende Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺TNF- α ⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				1,18	2,69
RTP2	3,21	1,50	0,74		2,62
RTP3	5,71		2,69		3,59

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP5		12,04		15,65	7,61
RTP6					
RTP7	1,73	2,69	1,44		
RTP8	3,44	5,94			3,44
RTP11		27,13	25,82	0,08	
RTP12		6,15	5,73	6,98	6,60
RTP13		14,26	12,40	9,31	
RTP18		12,21	16,21		
RTP19		12,71		10,84	11,14
RTP20		2,80		1,23	
RTP21		2,62	1,93		
RTP23		3,36	7,22		
RTP24		1,28	1,63		
RTP25		1,52		5,36	2,77
RTP101		6,18	3,90	1,66	
RTP103		4,60	4,76		
RTP104		1,37	1,21	0,44	
RTP106		2,81	2,41		
RTP107		5,36	4,20		

Zellen mit Zytokinsekretion von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺CD107a⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				4,63	5,93
RTP2	10,89	6,54	5,83		9,49
RTP3	7,73		4,47		6,69
RTP5		17,68		24,82	12,13
RTP6					
RTP7	3,89	5,22	3,92		
RTP8	7,19	10,97			7,71
RTP11		39,22	38,65	0,08	
RTP12		7,36	6,96	9,13	10,97
RTP13		17,26	16,16	13,42	
RTP18		20,59	22,17		
RTP19		17,37		19,40	16,96
RTP20		4,88		3,60	
RTP21		3,15	3,32		
RTP23		8,19	11,33		
RTP24		4,66	4,71		
RTP25		6,75		9,88	9,74
RTP101		8,01	6,47	4,03	
RTP103		6,72	7,96		
RTP104		3,49	2,16	0,96	
RTP106		5,53	4,98		
RTP107		8,28	7,26		

IFN- γ -produzierende und -sekretierende Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁺IFN- γ ⁺CD107a⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,99	1,97
RTP2	3,52	1,78	1,51		2,31
RTP3	4,56		2,15		3,24
RTP5		10,22		11,23	4,23
RTP6					
RTP7	1,40	2,28	1,11		
RTP8	1,62	3,88			1,78
RTP11		31,77	28,96	0,08	
RTP12		3,97	3,79	4,85	5,43
RTP13		14,34	12,09	10,03	
RTP18		14,17	17,19		
RTP19		8,53		7,68	8,32
RTP20		1,79		0,70	
RTP21		1,73	1,14		
RTP23		2,78	4,17		
RTP24		1,40	1,39		
RTP25		2,34		3,96	3,64
RTP101		3,43	3,08	1,65	
RTP103		3,97	4,14		
RTP104		1,52	1,10	0,34	
RTP106		3,12	2,63		
RTP107		4,81	3,65		

IV.viii. ICS (Färbeprotokoll 4) nach Stimulation mit CMV-pp65 und Abzug der Basisproduktion (Stimulation mit HIV)

IL-2-produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IL-2⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP2		0,01	0,00		
RTP5		0,00		0,05	
RTP6					
RTP12		0,00	0,02		0,00
RTP18		0,00	0,01		
RTP19		0,00			
RTP20		0,00		0,02	
RTP103		0,00	0,00		
RTP106		0,00	0,00	0,00	

IL-5-produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IL-5⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP2		0,01	0,00		
RTP5		0,00		0,03	

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP6					
RTP12		0,00	0,04		0,00
RTP18		0,00	0,04		
RTP19		0,00			
RTP20		0,00		0,01	
RTP103		0,00	0,00		
RTP106		0,00	0,00	0,00	

IL-10-produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IL-10⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP2		0,00	0,00		
RTP5		0,01		0,00	
RTP6					
RTP12		0,00	0,01		0,00
RTP18		0,00	0,00		
RTP19		0,01			
RTP20		0,00		0,00	
RTP103		0,00	0,00		
RTP106		0,00	0,00	0,00	

IL-17-produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IL-17⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP2		0,00	0,00		
RTP5		0,00		0,00	
RTP6					
RTP12		0,00	0,00		0,01
RTP18		0,00	0,00		
RTP19		0,00			
RTP20		0,00		0,00	
RTP103		0,02	0,01		
RTP106		0,01	0,00	0,02	

IFN- γ -produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IFN- γ ⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP2		0,00	0,02		
RTP5		0,04		0,05	
RTP6					
RTP12		0,00	0,01		0,02
RTP18		0,00	0,07		
RTP19		0,00			

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP20		0,00		0,00	
RTP103		0,00	0,00		
RTP106		0,00	0,00	0,01	

TNF- α -produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻TNF- α ⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP2		0,00	0,00		
RTP5		0,04		0,08	
RTP6					
RTP12		0,00	0,05		0,00
RTP18		0,00	0,04		
RTP19		0,00			
RTP20		0,00		0,00	
RTP103		0,01	0,00		
RTP106		0,01	0,03	0,00	

IL-2-produzierende Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺IL-2⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP2		0,06	0,09		
RTP5		1,48		0,86	
RTP6					
RTP12		0,04	0,02		0,04
RTP18		0,18	0,42		
RTP19		0,10			
RTP20		0,01		0,01	
RTP103		0,00	0,00		
RTP106		0,16	0,03	0,13	

IL-10-produzierende Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺IL-10⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP2		0,00	0,00		
RTP5		0,02		0,00	
RTP6					
RTP12		0,00	0,02		0,00
RTP18		0,00	0,00		
RTP19		0,00			
RTP20		0,00		0,01	
RTP103		0,00	0,00		
RTP106		0,00	0,04	0,05	

IFN- γ -produzierende Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺IFN- γ ⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP2		0,21	0,27		
RTP5		3,48		1,97	
RTP6					
RTP12		0,50	0,57		0,44
RTP18		2,73	2,18		
RTP19		0,47			
RTP20		0,18		0,17	
RTP103		1,71	1,86		
RTP106		1,25	1,67	2,00	

TNF- α -produzierende Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺TNF- α ⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP2		0,04	0,00		
RTP5		3,19		1,98	
RTP6					
RTP12		0,28	0,52		0,27
RTP18		1,94	1,88		
RTP19		0,69			
RTP20		0,12		0,05	
RTP103		1,48	1,60		
RTP106		1,16	0,91	1,24	

Zellen mit Zytokinsekretion von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺CD107a⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP2		0,16	0,00		
RTP5		3,59		1,77	
RTP6					
RTP12		0,39	0,53		0,40
RTP18		2,61	2,10		
RTP19		0,80			
RTP20		0,22		0,15	
RTP103		1,73	2,30		
RTP106		1,54	1,89	2,33	

IFN- γ -produzierende und -sekretierende Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁺IFN- γ ⁺CD107a⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP2		0,15	0,21		
RTP5		3,28		1,81	
RTP6					
RTP12		0,40	0,44		0,40
RTP18		2,56	2,06		
RTP19		0,44			
RTP20		0,14		0,13	
RTP103		1,59	1,69		
RTP106		1,43	1,32	1,90	

IV.ix. ICS (Färbeprotokoll 4) nach Stimulation mit EBV-BMLF1 und Abzug der Basisproduktion (Stimulation mit HIV)

IL-2-produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IL-2⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP3	0,02	0,00			
RTP8	0,00	0,03			0,00
RTP11		0,00	0,09		
RTP13		0,00	0,00	0,00	
RTP18		0,01	0,01		
RTP20		0,00		0,00	
RTP21		0,00			
RTP23		0,00			
RTP24			0,00		
RTP25		0,00		0,04	
RTP101			0,05	0,01	
RTP104		0,36	0,00	0,13	
RTP106		0,01		0,00	

IL-5-produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IL-5⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP3	0,02	0,00			
RTP8	0,00	0,00			0,01
RTP11		0,01	0,02		
RTP13		0,01	0,01	0,00	
RTP18		0,00	0,00		
RTP20		0,00		0,02	
RTP21		0,00			
RTP23		0,02			
RTP24			0,00		
RTP25		0,00		0,00	
RTP101			0,01	0,01	

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP104		0,04	0,00	0,01	
RTP106		0,01		0,04	

IL-10-produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IL-10⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP3	0,00	0,00			
RTP8	0,01	0,00			0,01
RTP11		0,00	0,00		
RTP13		0,00	0,02	0,00	
RTP18		0,00	0,00		
RTP20		0,00		0,01	
RTP21		0,00			
RTP23		0,02			
RTP24			0,00		
RTP25		0,00		0,03	
RTP101			0,05	0,02	
RTP104		0,05	0,00	0,03	
RTP106		0,03		0,00	

IL-17-produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IL-17⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP3	0,00	0,00			
RTP8	0,00	0,00			0,00
RTP11		0,00	0,00		
RTP13		0,00	0,00	0,00	
RTP18		0,00	0,00		
RTP20		0,00		0,00	
RTP21		0,00			
RTP23		0,00			
RTP24			0,00		
RTP25		0,01		0,00	
RTP101			0,00	0,00	
RTP104		0,01	0,01	0,01	
RTP106		0,02		0,00	

IFN- γ -produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IFN- γ ⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP3	0,00	0,00			
RTP8	0,00	0,00			0,00
RTP11		0,00	0,05		

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP13		0,01	0,01	0,00	
RTP18		0,00	0,00		
RTP20		0,00		0,02	
RTP21		0,03			
RTP23		0,00			
RTP24			0,01		
RTP25		0,00		0,00	
RTP101			0,12	0,00	
RTP104		0,00	0,00	0,00	
RTP106		0,00		0,01	

TNF- α -produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻TNF- α ⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP3	0,01	0,00			
RTP8	0,03	0,00			0,00
RTP11		0,00	0,18		
RTP13		0,05	0,05	0,00	
RTP18		0,00	0,00		
RTP20		0,00		0,03	
RTP21		0,00			
RTP23		0,01			
RTP24			0,09		
RTP25		0,07		0,01	
RTP101			0,08	0,02	
RTP104		0,07	0,00	0,00	
RTP106		0,01		0,00	

IL-2-produzierende Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺IL-2⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP3	0,02	0,01			
RTP8	0,00	0,00			0,00
RTP11		0,02	0,02		
RTP13		0,00	0,02	0,00	
RTP18		0,04	0,10		
RTP20		0,03		0,00	
RTP21		0,06			
RTP23		0,01			
RTP24			0,06		
RTP25		0,07		0,21	
RTP101			0,00	0,00	
RTP104		0,47	0,09	0,19	
RTP106		0,03		0,07	

IL-10-produzierende Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺IL-10⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP3	0,02	0,04			
RTP8	0,00	0,00			0,01
RTP11		0,00	0,00		
RTP13		0,01	0,01	0,00	
RTP18		0,00	0,00		
RTP20		0,00		0,01	
RTP21		0,01			
RTP23		0,03			
RTP24			0,00		
RTP25		0,00		0,00	
RTP101			0,05	0,01	
RTP104		0,04	0,00	0,04	
RTP106		0,03		0,05	

IFN- γ -produzierende Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺IFN- γ ⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP3	0,05	0,04			
RTP8	0,00	0,00			0,00
RTP11		0,16	1,01		
RTP13		0,08	0,00	0,04	
RTP18		0,12	0,24		
RTP20		0,14		0,02	
RTP21		0,35			
RTP23		0,53			
RTP24			0,35		
RTP25		0,30		0,41	
RTP101			0,16	0,01	
RTP104		0,11	0,21	0,13	
RTP106		0,00		0,93	

TNF- α -produzierende Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺TNF- α ⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP3	0,05	0,02			
RTP8	0,00	0,00			0,00
RTP11		0,23	1,44		
RTP13		0,18	0,00	0,00	
RTP18		0,10	0,29		
RTP20		0,12		0,06	
RTP21		0,32			

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP23		0,20			
RTP24			0,12		
RTP25		0,13		0,33	
RTP101			0,07	0,02	
RTP104		0,11	0,15	0,04	
RTP106		0,00		0,68	

Zellen mit Zytokinsekretion von lebenden $CD8^+$ -Lymphozyten ($CD4^+CD8^+CD107a^+$)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP3	0,01	0,02			
RTP8	0,17	0,02			0,00
RTP11		0,21	0,00		
RTP13		0,20	0,00	0,00	
RTP18		0,26	0,25		
RTP20		0,28		0,03	
RTP21		1,35			
RTP23		0,99			
RTP24			0,65		
RTP25		0,55		0,67	
RTP101			0,07	0,02	
RTP104		0,52	0,11	0,29	
RTP106		0,24		1,32	

IFN- γ -produzierende und -sekretierende Zellen von lebenden $CD8^+$ -Lymphozyten ($CD4^+CD8^+IFN-\gamma^+CD107a^+$)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP3	0,02	0,02			
RTP8	0,04	0,02			0,01
RTP11		0,13	0,40		
RTP13		0,03	0,00	0,03	
RTP18		0,17	0,20		
RTP20		0,12		0,02	
RTP21		0,34			
RTP23		0,53			
RTP24			0,33		
RTP25		0,28		0,40	
RTP101			0,02	0,01	
RTP104		0,17	0,21	0,11	
RTP106		0,30		0,86	

IV.x. ICS (Färbeprotokoll 4) nach Stimulation mit EBV-LMP2 und Abzug der Basisproduktion (Stimulation mit HIV)

IL-2-produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IL-2⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP5		0,00		0,02	
RTP8	0,04	0,10			
RTP107		0,01	0,01		

IL-5-produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IL-5⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP5		0,00		0,00	
RTP8	0,00	0,00			
RTP107		0,01	0,00		

IL-10-produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IL-10⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP5		0,00		0,00	
RTP8	0,00	0,00			
RTP107		0,01	0,00		

IL-17-produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IL-17⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP5		0,00		0,01	
RTP8	0,00	0,00			
RTP107		0,00	0,00		

IFN- γ -produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IFN- γ ⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP5		0,00		0,01	
RTP8	0,00	0,00			
RTP107		0,00	0,00		

TNF- α -produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻TNF- α ⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP5		0,00		0,15	
RTP8	0,04	0,17			

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP107		0,04	0,00		

IL-2-produzierende Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺IL-2⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP5		0,00		0,01	
RTP8	0,04	0,03			
RTP107		0,01	0,01		

IL-10-produzierende Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺IL-10⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP5		0,00		0,00	
RTP8	0,00	0,00			
RTP107		0,02	0,00		

IFN- γ -produzierende Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺IFN- γ ⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP5		0,00		0,07	
RTP8	0,01	0,23			
RTP107		0,02	0,02		

TNF- α -produzierende Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺TNF- α ⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP5		0,00		0,04	
RTP8	0,00	0,02			
RTP107		0,04	0,04		

Zellen mit Zytokinsekretion von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺CD107a⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP5		0,07		0,00	
RTP8	0,01	0,00			
RTP107		0,05	0,00		

IFN- γ -produzierende und -sekretierende Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁺IFN- γ ⁺CD107a⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP5		0,00		0,02	
RTP8	0,04	0,08			
RTP107		0,01	0,01		

IV.xi. ICS (Färbeprotokoll 4) nach Stimulation mit Inf-Mat und Abzug der Basisproduktion (Stimulation mit HIV)

IL-2-produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IL-2⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,00	0,00
RTP3	0,01	0,01	0,00		0,00

IL-5-produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IL-5⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,02	0,00
RTP3	0,01	0,01	0,05		0,01

IL-10-produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IL-10⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,02	0,00
RTP3	0,00	0,01	0,00		0,00

IL-17-produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IL-17⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,00	0,00
RTP3	0,00	0,00	0,00		0,00

IFN- γ -produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻IFN- γ ⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,00	0,03
RTP3	0,01	0,01	0,03		0,02

TNF- α -produzierende Zellen von lebenden CD4⁺-Lymphozyten (CD4⁺CD8⁻TNF- α ⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,00	0,00
RTP3	0,02	0,04	0,03		0,00

IL-2-produzierende Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺IL-2⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,00	0,00
RTP3	0,54	0,74	0,25		0,50

IL-10-produzierende Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺IL-10⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,01	0,00
RTP3	0,00	0,03	0,00		0,00

IFN- γ -produzierende Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺IFN- γ ⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,00	0,00
RTP3	2,00	2,09	1,17		1,19

TNF- α -produzierende Zellen von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺TNF- α ⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,00	0,00
RTP3	1,75	2,01	0,95		1,07

Zellen mit Zytokinsekretion von lebenden CD8⁺-Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺CD107a⁺)

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,06	0,00
RTP3	1,79	2,00	0,60		0,97

*IFN- γ -produzierende und -sekretierende Zellen von lebenden CD8⁺-
Lymphozyten (CD4⁻CD8⁺IFN- γ ⁺CD107a⁺)*

Zeitpunkt	A	B	C	D	E
RTP1				0,00	0,00
RTP3	1,80	1,98	0,94		1,05