

Aus dem Institut für
Zelluläre und Molekulare Immunologie
(Prof. Dr. rer. nat. J. Wienands)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Prädiktive Biomarker für die Entwicklung
von *high grade acute organ toxicity* im
Rahmen der Radiochemotherapie bei
Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Laura Milena Beschel

aus

Hamburg

Göttingen 2017

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent: Prof. Dr. rer. nat. H. M. Reichardt
Korreferentin: Prof. Dr. med. C. Binder
Drittreferent: Prof. Dr. med. J. Gaedcke

Datum der mündlichen Prüfung: 28.11.2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Prädiktive Biomarker für die Entwicklung von *high grade acute organ toxicity* im Rahmen der Radiochemotherapie bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Kopf-Hals-Tumoren.....	1
1.1.1 Epidemiologie	2
1.1.2 Risikofaktoren	2
1.1.3 Tumorgenese	3
1.1.4 Diagnostik	6
1.1.5 Klassifikation	7
1.1.6 Prognose	9
1.2 Therapieoptionen bei Kopf-Hals-Tumoren.....	10
1.2.1 Chirurgische Behandlung.....	10
1.2.2 Radiotherapie	10
1.2.3 Chemotherapie	11
1.3 Nebenwirkungen der Therapie	11
1.3.1 Einteilung nach Schweregraden	12
1.3.2 Pathogenese der Nebenwirkungen der RCT.....	14
1.3.3 Relevanz der Nebenwirkungen für Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren.....	15
1.4 Tumor-Immunologie.....	16
1.4.1 Die immunologische Tumorüberwachung.....	16
1.4.2 <i>Immune-Escape</i> -Mechanismen von Tumorzellen	18
1.4.3 T-Lymphozyten	19
1.4.4 NK-Zellen.....	21
1.4.5 Monozyten und Makrophagen	22
1.4.6 Immunogenität der Kopf-Hals-Tumoren	23
1.5 Fragestellung und Zielsetzung	24
2 Patientenkollektiv, Material und Methoden	25
2.1 Ethische Grundlage.....	25
2.2 Untersuchtes Patientenkollektiv	25
2.3 Material	27
2.3.1 Verwendete Geräte	27
2.3.2 Verbrauchsmaterialien	28
2.3.3 Puffer und Lösungen.....	28

2.3.4	Chemikalien	29
2.3.5	Enzyme und Kits.....	30
2.3.6	Antikörper.....	31
2.3.7	Softwareprodukte.....	31
2.4	Methoden zur Analyse der Proben.....	32
2.4.1	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	32
2.4.2	Quantitative reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion.....	34
2.4.3	Durchflusszytometrie (FACS)	38
2.4.4	Immunhistochemische Analysen	39
2.5	Statistische Analysen	42
2.6	Diagnostische Tests.....	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Zytokinkonzentrationen im Plasma	45
3.2	Genexpression im Gesamtblut	47
3.2.1	Expression von Zytokinen und zytotoxischen Molekülen	48
3.2.2	Genexpression von <i>CD3</i>	50
3.2.3	Expression von kostimulatorischen und -inhibitorischen Molekülen	51
3.2.4	Relative Genexpression von Apoptosemarkern	54
3.3	Genexpression und Plasmakonzentration von HMGB1.....	55
3.4	Genexpressionsänderungen während des Therapieverlaufs	57
3.5	FACS-Analyse der PBMCs.....	58
3.5.1	Exemplarische Darstellung der <i>Gating</i> -Strategie.....	59
3.5.2	Analyse der relativen Zellzahlen zum Zeitpunkt 1	60
3.5.3	Analyse der absoluten Zellzahlen zum Zeitpunkt 1	69
3.5.4	Übersicht über die FACS-Ergebnisse.....	74
3.6	Immunhistochemie der Kopf-Hals-Tumoren	75
3.6.1	Strategie der immunhistochemischen Analyse	76
3.6.2	Immunhistochemische Bewertung der CD4 ⁺ -T-Zell-Infiltration	77
3.6.3	Immunhistochemische Bewertung der CD8 ⁺ -T-Zell-Infiltration	78
3.6.4	Tumorinfiltration durch T-Zellen	79
3.7	Zusammenfassung der Analyseergebnisse	80
4	Diskussion	81
4.1	Prädiktives Potential der Plasmaspiegel und Genexpression von Zytokinen und zytotoxischen Molekülen.....	82
4.2	Vorhersagekraft der Genexpression kostimulatorischer und koinhibitorischer Moleküle	85
4.3	Prädiktive Bedeutung der Genexpression von Apoptosemarkern	85
4.4	Bedeutung von HMGB1 als prädiktiver Biomarker.....	86

4.5	PBMCs als Prädiktoren für Nebenwirkungen der RCT bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren	87
4.5.1	Eine hohe Monozytenzahl korrelierte mit einer schwachen Nebenwirkungsausprägung	88
4.5.2	Lymphozyten als Biomarker für die Entwicklung starker Therapie-bedingter Organtoxizität	88
4.5.3	NK-Zellzahl als Prädiktor toxischer Begleiterscheinungen	90
4.5.4	Prädiktive Bedeutung der Zellzahlverhältnisse der PBMCs	90
4.6	Korrelation der Intensität der histologischen T-Zellinfiltration mit der Entwicklung starker Nebenwirkungen durch RCT bei HNSCC	90
4.7	Limitationen dieser Arbeit	91
4.8	Klinische Relevanz und Ausblick	92
5	Zusammenfassung	95
6	Literaturverzeichnis	97

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der „Cancer-Immunity-Cycle“	17
Abbildung 2: Der Prozess des <i>Immunoediting</i>	18
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Sandwich-ELISAs	32
Abbildung 4: Kalibrationskurve der Standardreihe.....	33
Abbildung 5: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Färbung	40
Abbildung 6: Beispiel für eine ROC-Kurve.....	43
Abbildung 7: Zeitstrahl der Probenentnahme	44
Abbildung 8: Analyse der Konzentrationen von $IFN\gamma$ und IL-6 im Plasma mittels ELISA	46
Abbildung 9: Analyse der Genexpression von <i>IFNγ</i> , <i>TGFβ</i> und <i>Granzym B</i>	49
Abbildung 10: Analyse der Genexpression von <i>CD3</i> im Gesamtblut mittels RT-qPCR	50
Abbildung 11: Analyse der Genexpression kostimulatorischer und koinhibitorischer Moleküle	52
Abbildung 12: Analyse der Genexpression von Apoptosemarkern	54
Abbildung 13: Analyse von HMGB1 bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren.....	55
Abbildung 14: Übersicht über die Veränderungen der Genexpression im Verlauf der Therapie	57
Abbildung 15: <i>Gating</i> -Strategie am Beispiel von Patient 286 zum Zeitpunkt 1.....	59
Abbildung 16: FACS-Analyse der relativen Zellzahlen zum Zeitpunkt 1	60
Abbildung 17: Relative Verhältnisse von Zellpopulationen zum Zeitpunkt 1	61
Abbildung 18: FACS-Analyse der Aktivierungsmarker von T-Zellen zum Zeitpunkt 1	62
Abbildung 19: ROC-Kurven der relativen Anzahl von T-Zellen und Monozyten.....	65
Abbildung 20: ROC-Kurve der relativen Anzahl an Monozyten	65
Abbildung 21: Prinzip der Vierfeldertafel	66
Abbildung 22: Vierfeldertafel mit <i>Cutoff</i> -Wert 55,58 % Monozyten.....	66
Abbildung 23: Vierfeldertafel mit <i>Cutoff</i> -Wert 38,41 % Monozyten.....	66
Abbildung 24: ROC-Kurve der relativen T-Zellzahl.....	67
Abbildung 25: Vierfeldertafel mit <i>Cutoff</i> -Wert 22 % T-Zellen.....	67
Abbildung 26: ROC-Kurve Mono : T-Verhältnis.....	67
Abbildung 27: Vierfeldertafel mit <i>Cutoff</i> -Wert Mono : T-Verhältnis 3,06.....	68
Abbildung 28: Vierfeldertafel mit <i>Cutoff</i> -Wert Mono : T-Verhältnis 1,8.....	68
Abbildung 29: Bestimmung der absoluten Zellzahlen mittels FACS-Analyse zum Zeitpunkt 1 ...	69
Abbildung 30: ROC-Kurven der absoluten Zellzahlen	71
Abbildung 31: ROC-Kurve der absoluten Monozytenzahl	71
Abbildung 32: Vierfeldertafel mit <i>Cutoff</i> -Wert 0,33 Mio Monozyten/ml.....	71
Abbildung 33: ROC-Kurve der absoluten T-Zellzahl	72
Abbildung 34: ROC-Kurve der absoluten Anzahl an $CD8^+$ -T-Zellen.....	72
Abbildung 35: Vierfeldertafel mit <i>Cutoff</i> -Wert 0,14 Mio T-Zellen/ml	72
Abbildung 36: Vierfeldertafel mit <i>Cutoff</i> -Wert 0,05 Mio $CD8^+$ -T-Zellen/ml	72
Abbildung 37: Vierfeldertafel mit <i>Cutoff</i> -Wert 0,25 Mio T-Zellen/ml	73

Abbildung 38: Vierfeldertafel mit <i>Cutoff</i> -Wert 0,1 Mio CD8 ⁺ -T-Zellen/ml	73
Abbildung 39: Beispiele für immunhistochemische Analyse von CK AE 1/3, CD4 und CD8	76
Abbildung 40: Repräsentative Beispiele von Tumorschnitten mit unterschiedlich starker Infiltration von CD4 ⁺ -T-Lymphozyten	77
Abbildung 41: Repräsentative Beispiele von Tumorschnitten mit unterschiedlich starker Infiltration von CD8 ⁺ -T-Zellen	78
Abbildung 42: Semi-quantitative Analyse der T-Zell-Infiltration mittels Immunhistochemie	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beispiele für Protoonkogene und Tumorsuppressorgene	4
Tabelle 2: Symptome von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren	6
Tabelle 3: TNM-Klassifikation des Mundhöhlenkarzinoms.....	7
Tabelle 4: UICC-Klassifikation des Mundhöhlenkarzinoms.....	8
Tabelle 5: Histologisches Grading	8
Tabelle 6: Grading-Kriterien	8
Tabelle 7: Systematik der CTC-Scores	12
Tabelle 8: Beschreibung der CTC-Scores der Nebenwirkungen von Kopf-Hals-Tumoren	13
Tabelle 9: Übersicht über die Patientenkohorte.....	26
Tabelle 10: Verwendete Geräte	27
Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien.....	28
Tabelle 12: Puffer und Lösungen	28
Tabelle 13: Chemikalien	29
Tabelle 14: Enzyme und Kits	30
Tabelle 15: Antikörper	31
Tabelle 16: Softwareprodukte	31
Tabelle 17: Übersicht über die cDNA-Synthese	35
Tabelle 18: Übersicht über die PCR mit Pfu-S.....	35
Tabelle 19: Ablauf der RT-qPCR	37
Tabelle 20: Aussagekraft der AUC.....	63
Tabelle 21: Übersicht über die neuen FACS-Biomarker.....	74
Tabelle 22: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse	80

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A.	<i>Arteria</i>
Abb.	Abbildung
APC	Antigen-präsentierende Zelle
AUC	<i>area under the curve</i>
BAX	<i>Bcl-2-like protein 4</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK4	<i>cyclin-dependent kinase 4</i>
CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CK	<i>cytokeratine</i>
CK AE 1/3	<i>cytokeratine AE 1/3</i>
CT	Computertomographie
ct	<i>cycle threshold</i>
CTC	<i>common toxicity criteria</i>
CTCAE	<i>common toxicity criteria for adverse events</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
d	Tag
DAB	3-3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DAMPs	<i>danger associated molecular patterns</i>
DC	dendritische Zelle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>endothelial growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence-activated-cell-sorting</i>
FasL	Fas-Ligand
FCS	<i>fetal calf serum</i>
for	<i>forward</i>
g	Grading
G	<i>G force</i>
GRZB	Granzym B

Gy	Gray
HCl	Hydrogenchlorid
HGAOT	<i>high grade acute organ toxicity</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HLA-DR	<i>human leukocyte antigen - antigen D related</i>
HMGB1	<i>high mobility group box 1</i>
HNSCC	<i>head and neck squamous cell carcinoma</i>
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase
HPV	humanes Papilloma-Virus
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
i.v.	intravenös
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
ICOS	<i>inducible T-cell COStimulator</i>
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
KOF	Körperoberfläche
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
M	Metastase
M.	<i>Musculus</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minuten
Mio/ml	Millionen pro ml
ml	Milliliter
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
N	<i>Nodus</i>
n.s.	nicht signifikant
NF-κB	nukleärer Faktor-κB
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NO	Stickstoffmonoxid
NPV	negativ prädiktiver Wert
NW	Nebenwirkungen
PAP-Test	Papanicolaou-Abstrich
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PD-L1	<i>programmed-death-ligand 1</i>
PDCD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PE	Probeexzision
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PIK3CA	<i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform</i>

PKB	<i>protein kinase B</i>
PPV	positiv prädiktiver Wert
PRE	Prävalenz
PRF1	Perforin 1
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
RO	Resektionsstatus ohne verbleibenden Tumor
RB	<i>retinoblastoma protein</i>
RCT	Radiochemotherapie
Rev	<i>reverse</i>
ROC	<i>receiver operating characteristic</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RQ	<i>relative quantification</i>
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	quantitative reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion
S.	Seite
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler
SEN	Sensitivität
SPE	Spezifität
T	Tumor
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF β	<i>transforming growth factor β</i>
T _H	T-Helferzelle
TILs	tumorinfiltrierende T-Lymphozyten
TLR4	<i>toll-like-receptor-4</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNM	Tumor/ <i>Nodus</i> /Metastase
TP53	<i>tumor protein 53</i>
T _{reg}	regulatorischer T-Lymphozyt
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>

1 Einleitung

1.1 Kopf-Hals-Tumoren

Die Entität der Kopf-Hals-Tumoren ist komplex, sowohl auf molekularer als auch auf klinischer Ebene. Histologisch betrachtet sind die Kopf-Hals-Tumoren zu über 90 % dem Plattenepithel der Schleimhäute zuzuordnen (Suh et al. 2014), weshalb lange Zeit vermutet wurde, dass sie relativ homogen seien (Leemans et al. 2011). Allerdings tritt diese Entität nicht nur in einem einzelnen Organ auf, sondern umfasst verschiedene Neoplasien der oberen Luft- und Speisewege, ausgehend von unterschiedlichen anatomischen Strukturen wie Pharynx, Larynx, Mundhöhle und Speicheldrüsen. Die Tumoren unterscheiden sich in ihrer Lokalisation, Entstehung, ihren Risikofaktoren, Symptomen sowie der Therapie und Prognose. Eine genauere Einteilung der Kopf-Hals-Tumoren erfolgt aktuell nach dem Vorliegen von DNA des humanen Papilloma-Virus (HPV) in den Tumorzellen. HPV-positive und HPV-negative Tumoren unterscheiden sich in Verlauf und Prognose maßgeblich (Leemans et al. 2011). Hierbei handelt es sich um ein strikt epitheliotropes Doppelstrang-DNA-Virus, das als Hauptrisikofaktor für die Entwicklung von Zervixkarzinomen bekannt ist. Die Prävalenz von HPV-DNA in Kopf-Hals-Tumoren liegt bei ca. 25 % (Dayyani et al. 2010), dabei gehören 86-95 % der Viren den Hochrisiko-Genotypen 16 und 18 an (Gillison et al. 2008). Patienten mit HPV-positiven Tumoren sind häufig jünger und weisen seltener einen Tabak- und Alkohola-busus auf als Patienten mit HPV-negativen Tumoren. Die Diagnose wird oft erst in späteren, bereits lymphogen-metastasierten Stadien gestellt, ihre Prognose ist jedoch besser (Leemans et al. 2011). Kopf-Hals-Tumoren sind typischerweise lokoregionale Erkrankungen, die zwar frühzeitig in die regionären Lymphknoten der Halsregion metastasieren (Tímár et al. 2005), jedoch erst in späteren Stadien und nur in seltenen Fällen (2,8-9,2 %) hämatogen in Leber, Lunge und Knochen streuen (Garavello et al. 2006; Lee et al. 2012). Die Häufigkeitsverteilung der Tumoren nach ihrer Lokalisation stellt sich folgendermaßen dar: 44 % Mundhöhle (Lippen, vordere 2/3 der Zunge, Wangenschleimhaut, Zahnfleisch, Mundboden und harter Gaumen), 31 % Larynx (Stimmklappen und Epiglottis) und 25 % Pharynx (Naso-, Oro- und Hypopharynx) (Head and Neck Tumors | Cancer Network 2016). Tumoren des Gehirns, der Augen, des Ösophagus, der Schilddrüse, Kopfhaut, Muskeln und Knochen der Kopf-Hals-Region werden hingegen anderen Tumorentitäten zugeordnet.

1.1.1 Epidemiologie

Die jährliche Inzidenz von Kopf-Hals-Tumoren beläuft sich auf mehr als 550.000 Neuerkrankungen und etwa 300.000 Todesfälle weltweit (Jemal et al. 2011). In Deutschland erkrankten im Jahr 2010 etwa 16.500 Menschen an einem Kopf-Hals-Tumor (Mundhöhle, Rachen und Kehlkopf). Männer sind deutlich häufiger betroffen und erkranken durchschnittlich in einem jüngeren Alter (61 Jahre) als Frauen (65 Jahre). Bei Männern steht die Entität der Kopf-Hals-Tumoren ihrer Häufigkeit nach an 6. Stelle hinter Prostata-, Lungen-, Darm-, Harnblasenkrebs und dem malignen Melanom der Haut, bei Frauen an 15. Stelle (Krebs in Deutschland 2013). Die Inzidenz der HPV-negativen, alkohol- und rauchinduzierten Tumoren nahm in den letzten Jahrzehnten ab, während HPV-positive Tumoren, insbesondere Zungen- und Oropharynxkarzinome, zunahmen (Leemans et al. 2011).

1.1.2 Risikofaktoren

Rauchen und Alkohol sind die schwerwiegendsten Risikofaktoren für die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren; ihnen werden ca. 75% der Tumoren zugesprochen (Suh et al. 2014). Die Wahrscheinlichkeit, einen Tumor in der Kopf-Hals-Region zu entwickeln, ist bei einem Raucher gegenüber einem Nichtraucher um das 10-Fache erhöht. (Sturgis und Cinciripini 2007). Karzinogene und Prokarzinogene (aktiviert durch Cytochrom P450-Enzyme) des Tabakrauches, wie zum Beispiel polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH), Benzopyrin und N-Nitrosoverbindungen, induzieren Transversionsmutationen (Guanin zu Thymin), Alkylierungen oder DNA-Strangvernetzungen und führen zu fehlerhafter Replikation (Fan 2001). Die Kombination von Alkohol und Rauchen steigert das Risiko mehr als multiplikativ. Dabei kann das relative Risiko bis auf das Hundertfache ansteigen (Neville und Day 2002). Die beiden synergistisch wirkenden Noxen gefährden besonders die Mundhöhle, Pharynx und Larynx (Hashibe et al. 2009). Eine Infektion mit dem humanen Papilloma-Virus (HPV), insbesondere mit dem Genotyp HPV-16, wird mittlerweile als eigenständiger Risikofaktor für die Entwicklung von Kopf-Hals-Tumoren angesehen (Syrjänen 2005). Ursächlich kommen oraler Geschlechtsverkehr und häufiger Partnerwechsel infrage (Kreimer et al. 2004), wobei besonders der Oropharynx mit den Prädilektionsstellen der palatinalen und lingualen Tonsillen betroffen ist (Hennessey et al. 2009). Auch das Epstein-Barr-Virus (EBV) scheint mit dem Auftreten vor allem von Nasopharynxkarzinomen in Verbindung zu stehen (Chua et al. 2015). Mangelnde Mundhygiene, jedoch auch die intensive Verwendung von Mundspülung, können über eine chronische Reizung der Schleimhaut

ebenfalls zu einem erhöhten Karzinomrisiko führen (Guha et al. 2007; Marur et al. 2010).

Neben den genannten Hauptrisikofaktoren sind vererbte Chromosomeninstabilitäts-Syndrome, wie die Fanconi-Anämie (Kutler et al. 2003) und das Bloom-Syndrom (Báez 2008) mit der Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren assoziiert. Eine vitaminarme Diät mit wenig Obst und Gemüse (Freedman et al. 2008), die Exposition mit Asbest (Becher et al. 2005) sowie der Abusus von rauchfreiem Tabak (Proia et al. 2006) gehen ebenfalls mit einem erhöhten Tumorrisiko einher.

In der Prävention von Kopf-Hals-Tumoren ist die Vermeidung karzinogener Substanzen, wie Alkohol und Tabak, ein wichtiger Faktor. Dies kann jedoch unzureichend sein, wenn durch die vorherige Karzinogenexposition bereits irreversible Schlüsselmutationen induziert worden sind. Eine Impfung gegen die HPV-Serotypen 16 und 18 könnte das Risiko für die Entstehung eines HPV-positiven Kopf-Hals-Tumors senken, aussagekräftige epidemiologische Studien gibt es bisher jedoch nicht (Gillison et al. 2008).

1.1.3 Tumorgenese

Die Tumorgenese ist ein komplexer, mehrstufiger Prozess, dessen einzelne Schritte entarteten Zellen einen Überlebensvorteil verschaffen (Hanahan und Weinberg 2011). Erst eine Anhäufung verschiedener genetischer Alterationen führt über Jahre und Jahrzehnte hinweg zur Entstehung eines Tumors. Die genaue Reihenfolge der Mutationen ist nach aktuellem Wissensstand noch nicht geklärt. Voraussetzungen für die Tumorentstehung sind nach Hanahan und Weinberg die 7 „*Hallmarks of Cancer*“: Wachstumssignale, Resistenz gegen Wachstumshemmung, Unterdrückung von Zelltod, replikative Immortalität, Induktion von Angiogenese und Aktivierung von Invasion und Metastasierung (Hanahan und Weinberg 2000). In jüngerer Zeit sind weitere Kennzeichen der Tumorentwicklung hinzugekommen. Hierzu zählen die Neuprogrammierung des Zellstoffwechsels, das Ausweichen gegenüber einer Immunantwort und das Tumor-Mikromilieu mit seinem Einfluss auf Tumorentstehung und -progression (Hanahan und Weinberg 2011). Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Protoonkogenen bilden dabei die Grundlage der Entartung einer normalen Zelle zu einer Krebszelle. Zu den Protoonkogenen gehören Gene, die durch eine „*gain-of-function*“-Mutation zu Onkogenen werden können und den mutierten Zellen über gesteigerte Proliferation und Hemmung der Apoptose einen Überlebensvorteil verschaffen. In diesem Fall kommt es durch die Mutation eines der beiden Allele zu einem Funktionszugewinn, die Mutation wirkt dominant. Tritt hingegen eine Mutation in einem Tumorsuppressorgen auf, so resultiert hieraus häufig eine „*loss-of-function*“-Mutation, bei der meist die Kontrolle

über den Zellzyklus und die Apoptoseinduktion verloren geht. Dabei müssen für einen proliferativen Effekt in beiden Allelen Mutationen auftreten, die Mutationen verhalten sich somit rezessiv (Lodish et al. 2000). Beide Arten von Genen sind mit Beispielen in folgender Tabelle (Tab.) 1 dargestellt:

Tabelle 1: Beispiele für Protoonkogene und Tumorsuppressorgene bei Kopf-Hals-Tumoren

Gen	Funktion	Auftreten
Protoonkogene		
<i>EGFR</i> (<i>endothelial growth factor receptor</i>)	Wachstumsrezeptor; Stimulation der Zellproliferation	Karzinogenese
<i>PIK3CA</i> <small>(<i>phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform</i>)</small>	Proteinkinase; Regulation von Zellwachstum, -teilung, -migration und -überleben	Karzinogenese
<i>PKB</i> (<i>protein kinase B</i>)	Proteinkinase; Regulation der Zellproliferation, -differenzierung und -überleben	Karzinogenese
Tumorsuppressorgene		
<i>TP53</i> (<i>tumor protein 53</i>)	„Genomwächter“; Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen oder Apoptose	„Patch“-Entstehung
<i>RB</i> (<i>retinoblastoma protein</i>)	Regulation von Zellwachstum, -teilung, -überleben und DNA-Replikation	„Field“-Entstehung
<i>CDKN2A</i> <small>(<i>cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A</i>)</small>	Hemmung des Zellzyklus durch Inaktivierung von CDK4 (<i>cyclin-dependent kinase 4</i>) und CDK6	„Field“-Entstehung
<i>TGFβ</i> (<i>transforming growth factor beta</i>)	Kontrolle von Zellwachstum, -teilung, -mobilität und -apoptose	Aneuploidie
<i>PTEN</i> (<i>phosphatase and tensin homolog</i>)	Phosphatase; induziert Zellwachstumsstopp und Apoptose	Karzinogenese

Tabelle 1 in Anlehnung an Leemans et al. 2011

Der Großteil der Kopf-Hals-Tumoren entsteht aus dem Plattenepithel der Schleimhäute. Durch Mutation mehrerer der in Tabelle 1 genannten Gene kann sich das Gewebe über Zwischenstufen von Hyperplasie über Dysplasie bis hin zum *Carcinoma in situ* sowie dem infiltrierenden und später metastasierenden Tumor entwickeln. Aufgrund der häufig späten Diagnosestellung und der hohen Rezidiv- und Sekundärtumorraten scheint ein Großteil der präneoplastischen Veränderungen für das bloße Auge nicht

sichtbar zu sein. Erklärt wird dieses Phänomen mit dem Begriff der „Feldkanzerisierung“, welcher in diesem Zusammenhang zuerst 1953 von Slaughter und Kollegen verwendet wurde (Slaughter et al. 1953). Der Begriff „Feldkanzerisierung“ beschreibt prä-neoplastische Regionen mit Genabberationen, die monoklonaler Herkunft sind, aber weder invasives noch metastatierendes Wachstum zeigen. Ursächlich kommt die Exposition der gesamten Region mit oben beschriebenen Noxen infrage, die zu multiplen genetischen Veränderungen im kompletten Bereich führen können (Sabharwal et al. 2014). Auf der Grundlage einer mutierten Stammzelle entwickelt sich zunächst eine klonale Einheit mit der gleichen Mutation, ein sogenanntes „Patch“. Durch weitere Mutationen in der Regulation des Zellzyklus kann die Zellgruppe der Wachstumshemmung entgehen und sich ausbreiten. Sie wird zu einem „Field“, welches sich seitlich ausdehnt. Diese Felder können makroskopisch unauffällig bleiben, sich aber auch in Form von Vorläuferläsionen darstellen. Zu diesen gehören Leukoplakien und Erythroplakien. Erstere sind weißlich-erscheinende Läsionen, die durch eine Hyperkeratose und Epithelhyperplasie charakterisiert sind und mit einer weltweiten Prävalenz von ca. 2 % vorliegen (van der Waal 2009). Die Wahrscheinlichkeit einer malignen Entartung unterliegt in verschiedenen Studien starken Schwankungen und liegt weltweit durchschnittlich bei ca. 3,5 % (Warnakulasuriya und Ariyawardana 2016). Erythroplakien sind rötliche, oberflächliche Schleimhautveränderungen mit epithelialer Dysplasie, die weitaus seltener auftreten (Prävalenz 0,02-0,83 %) (Reichart und Philipsen 2005). Zwischen 15-50 % von ihnen transformieren in maligne Tumoren, daher sollten sie engmaschig kontrolliert werden (Yardimci et al. 2014). Letztendlich kann durch weitere genetische Veränderungen innerhalb des Feldes ein Karzinom entstehen. Da die chirurgische Exzision primär visuell durchgeführt wird, kann das Karzinom meist komplett innerhalb des Sicherheitsabstands entfernt werden. Im verbleibenden makroskopisch unauffälligen präneoplastischen Feld können jedoch Zweittumoren entstehen.

1.1.4 Diagnostik

Die rechtzeitige Diagnose von Kopf-Hals-Tumoren stellt aufgrund der häufig erst spät auftretenden, unspezifischen und je nach Lokalisation unterschiedlichen Symptome ein erhebliches Problem dar (Epstein et al. 2015).

Tabelle 2: Symptome von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren

Allgemeine Symptome	Lokalisation	spezielle Symptome
Dysphagie, Schmerzen, Hämoptysen, Gewichtsverlust, Schwellung der Halslymphknoten	Mundhöhle	schmerzhafte, blutende Ulzera, sich lockernde Zähne, Dysarthrie
	Oropharynx	Schnarchen, obstruktive Schlafapnoe
	Hypopharynx	Dyspnoe, Otagie
	Larynx	Heiserkeit, Stridor, chronischer Husten

Eine Vorsorgeuntersuchung, wie beispielsweise die Bestimmung des Prostata-spezifisches Antigens (PSA-Wert) zur Früherkennung des Prostatakarzinoms oder der Papanicolaou-Abstrich (PAP-Test) zur Diagnose eines Zervixkarzinoms, ist für die Diagnostik der Kopf-Hals-Tumoren bislang nicht verfügbar. Daher sollten Schleimhautveränderungen und Lymphknotenschwellungen, die länger als zwei Wochen bestehen, von einem Spezialisten abgeklärt werden. Bei Verdacht auf einen Kopf-Hals-Tumor wird eine Anamnese mit besonderem Fokus auf die oben beschriebenen Risikofaktoren erhoben (siehe 1.1.2 Risikofaktoren, Seite (S.) 2). Durch Hals-Nasen-Ohrenärztliche Untersuchung sowie gegebenenfalls eine Spiegeluntersuchung und Endoskopie werden umliegende Regionen auf synchrone Zweittumoren hin untersucht.

Neben der klinischen Untersuchung gehören zur umfassenden Diagnostik bildgebende Maßnahmen wie Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) zur Beurteilung der lokoregionalen Ausdehnung, Ultraschalldiagnostik der Halslymphknoten, Röntgen- oder CT-Thorax zum Ausschluss von Lungenmetastasen, eine abdominale Ultraschalluntersuchung zum Ausschluss von Lebermetastasen sowie eine Positronen-Emissions-Tomographie (PET) als PET/CT bei spezieller Indikation. Auch der Zahnstatus sollte vor Beginn einer Radiotherapie zahnärztlich beurteilt und bei Bedarf saniert werden. Mithilfe einer Feinnadelaspirationsbiopsie aus dem Randbereich der Raumforderung kann die Diagnose bestätigt werden. Diese kann aus dem Primarius und verdächtigen Lymphknotenmetastasen entnommen werden, um eine mögliche Übereinstimmung der Metastase festzustellen.

1.1.5 Klassifikation

Die Kopf-Hals-Tumoren werden nach der Tumor/*Nodus*/Metastase(TNM)-Klassifikation eingeteilt und mithilfe des *Union for International Cancer Control*(UICC)-Schemas einem Erkrankungsstadium zugeordnet.

1.1.5.1 TNM-Klassifikation am Beispiel des Mundhöhlenkarzinoms

Im Folgenden ist die TNM-Einteilung der Kopf-Hals-Tumoren am Beispiel des Mundhöhlenkarzinoms tabellarisch dargestellt:

Tabelle 3: TNM-Klassifikation des Mundhöhlenkarzinoms:

Stadium	Beschreibung
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt für Karzinom
Tis	<i>Carcinoma in situ</i>
T1	Tumordurchmesser ≤ 2 cm
T2	Tumordurchmesser 2-4 cm
T3	Tumorausdehnung > 4 cm
T4a	Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen hindurch die äußere Muskulatur der Zunge (<i>Musculus (M.) genioglossus</i> , <i>M. hyoglossus</i> , <i>M. palatoglossus</i> , <i>M. styloglossus</i>), Kieferhöhle oder Gesichtshaut
T4b	Tumor infiltriert das <i>Spatium masticatorium</i> , <i>Processus pterygoideus</i> oder Schädelbasis oder umschließt die <i>Arteria (A.) carotis interna</i>
NX	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	≤ 3 cm große Metastase(n) in solitärem ipsilateralen Lymphknoten
N2a	3-6 cm große Metastase(n) in solitärem ipsilateralen Lymphknoten
N2b	≤ 6 cm große Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten
N2c	≤ 6 cm große Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten
N3	> 6 cm große Lymphknotenmetastase(n)
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 3 in Anlehnung an Wittekind und Meyer 2013

1.1.5.2 UICC-Klassifikation am Beispiel des Mundhöhlenkarzinoms

Die folgende Tabelle stellt eine Übersicht über die Einteilung der Kopf-Hals-Tumoren zu den jeweiligen UICC-Stadien am Beispiel des Mundhöhlenkarzinoms dar.

Tabelle 4: UICC-Klassifikation des Mundhöhlenkarzinoms:

UICC-Stadium	Tumor	Lymphknoten	Metastasen
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IVa	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
Stadium IVb	jedes T	N3	M0
	T4b	jedes N	M0
Stadium IVc	jedes T	jedes N	M1

Tabelle 4 in Anlehnung an Wittekind und Meyer 2013

1.1.5.3 Histologisches Grading

Das histologische Grading (g) der Tumoren wird anhand einer entnommenen Biopsie oder des chirurgisch entfernten Resektats beurteilt. Dabei werden gut, mäßig, schlecht, undifferenzierte Tumoren und Karzinome unterschieden, die nicht eindeutig zugeordnet werden können (siehe Tab. 5). Die an der Einteilung beteiligten Kriterien sind in der Tabelle 6 dargestellt und umfassen Merkmale der Epithelarchitektur und der Zellmorphologie.

Tabelle 5: Histologisches Grading

Grading	Beschreibung
gX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
g1	gut differenziert
g2	mäßig differenziert
g3	schlecht differenziert
g4	undifferenziert

Tabelle 5 in Anlehnung an Wittekind und Meyer 2013

Tabelle 6: Grading-Kriterien

Architektur	Zytologie
irreguläre Epithelstruktur	abnormale Variation der Zellkerngröße
Verlust der Polarität der Basalzellen	abnormale Variation der Zellkernform
Tropfen-förmige Reteleisten	abnormale Variation der Zellgröße
vermehrte Mitosefiguren	abnormale Variation der Zellform
abnormal oberflächliche Mitosen	vergrößertes Kern-Zytoplasma-Verhältnis
Dyskeratose	vergrößerte Zellkerne
Keratinperlen in Epithelzapfen	atypische Mitosefiguren
	mehr und vergrößerte Nucleoli

Tabelle 6 in Anlehnung an Gale N et al. 2005

1.1.6 Prognose

Das TNM-Stadium, also die Größe des Primarius und das Vorhandensein von (Lymphknoten-) Metastasen, stellt den wichtigsten Prognosefaktor für Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren dar (Reyes-Gibby et al. 2014). In einer Untersuchung von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren in den USA von 2004 bis 2010 lag in 31 % der Fälle bei Diagnosestellung nur der Primärtumor (Stadium I oder II), in 47 % bereits zusätzliche Lymphknotenmetastasen und entsprechend das Stadium III bis IVb vor (Siegel et al. 2015). Bei 40-50 % der Patienten in Stadium III oder IV tritt ein Tumorrezidiv nach Therapie auf, dabei zu 80 % schon in den ersten zwei Jahren. Durch die hohe Rezidivrate lässt sich die niedrige 5-Jahres-Überlebensrate von 48 % bei männlichen und 61 % bei weiblichen Patienten in Deutschland teilweise erklären (Haberland et al. 2012).

Auch die Risikofaktoren Rauchen und HPV-Infektion zeigen sich mittlerweile als starke prognostische Parameter, wobei Tabakkonsum einen negativen Effekt auf das Überleben hat, ein HPV-positiver Tumor sich hingegen als prognostisch günstig erweist. Grund hierfür ist vermutlich das häufig nicht mutierte, funktionell erhaltene TP53-Protein bei HPV-positiven Tumoren. Ein Nicht-Raucher-Status, minimaler Alkoholkonsum, guter physischer Zustand sowie eine möglichst geringe Komorbidität sind mit einer besseren Prognose vergesellschaftet (Marur et al. 2010).

Die Lebensqualität der Patienten scheint sich in den letzten Jahrzehnten durch modifizierte Therapiestrategien (organschonende Operationstechniken, präzisere und genauer dosierte Bestrahlungstechniken) und neue Konzepte, wie die Antikörperbehandlung mit Cetuximab (EGFR-spezifischer Antikörper), verbessert zu haben. Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit ist jedoch aufgrund von Rezidiven, Zweittumoren und

Metastasen, die typisch für die Kopf-Hals-Tumore sind, zwischen 1992 und 2006 nur um ca. 10 %, von 54 % auf 65 %, gestiegen (Pulte und Brenner 2010).

1.2 Therapieoptionen bei Kopf-Hals-Tumoren

Die Therapie der Kopf-Hals-Tumoren ist abhängig vom Allgemeinzustand des Patienten, dem Stadium der Erkrankung, der Lokalisation des Tumors sowie vom erwarteten Behandlungserfolg und der voraussichtlichen posttherapeutischen Morbidität. Im Rahmen eines interdisziplinären Tumorboards mit Beteiligung der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Strahlentherapie, Onkologie, Pathologie und Radiologie wird das Therapiekonzept diskutiert und festgelegt. Nach Möglichkeit wird eine kurative Therapie angestrebt. Diese kann aus alleiniger Chirurgie, alleiniger Bestrahlung, einer Radiochemotherapie (RCT) oder allen drei Therapieformen bestehen. Ziel ist eine möglichst lange lokoregionale Tumorkontrolle bei möglichst geringer Beeinträchtigung der Funktion und Ästhetik (Leitlinie Mundhöhlenkarzinom 2012).

1.2.1 Chirurgische Behandlung

In der kurativ-intendierten Therapie der Kopf-Hals-Tumoren ist das Erreichen eines R0-Resektionsstatus von größter Wichtigkeit, um auszuschließen, dass Tumorzellen im Patienten verbleiben. Dafür ist die intraoperative Schnellschnitthistologie essentiell, mit deren Hilfe das Resektat noch während der Operation durch einen Pathologen mikroskopisch untersucht wird. Der Resektionsrand sollte chirurgisch 10 mm vom tastbaren Tumorrand entfernt sein und histologisch bei 3-5 mm liegen (Leitlinie Mundhöhlenkarzinom 2012). Die Entscheidung über Resektionstechnik und Rekonstruktion hängt neben der Tumorlokalisierung in erster Linie von der Erfahrung des Chirurgen und dem Patientenwunsch ab.

1.2.2 Radiotherapie

Die Behandlung mit ionisierender Strahlung kann in kurativer Absicht zur Verbesserung der lokoregionalen Kontrolle sowie in palliativer Absicht zur Linderung tumorinduzierter Beschwerden genutzt werden. Bei kurativer Zielsetzung sollte die Therapie möglichst früh nach der Operation begonnen werden, wofür anhand bildgebender Verfahren ein individuelles Bestrahlungskonzept erstellt wird. Patienten, die in diese Studie eingeschlossen wurden, erhielten eine Radiotherapie an 5 Tagen pro Woche, bei der die Region des Primärtumors mit Einzelfractionen von 2,08 Gy bis zu einer Gesamtdosis von bis zu 62,4 Gy bestrahlt wurde. Betroffene Lymphknoten wurden mit Einzeldo-

sen von 1,92 Gy bis zu einer Gesamtdosis von 57,6 Gy bestrahlt. Die Lymphabflusswege der Halsseiten erhielten Fraktionen von 1,8 Gy bis zu einem Maximum von 54,0 Gy. Neben der perkutanen konventionell fraktionierten Bestrahlung, die hier verwendet wurde, gibt es die Option einer Brachytherapie, bei der kleinste Strahlenquellen vorübergehend in die Tumorregion eingebracht werden.

1.2.3 Chemotherapie

Eine konkomitante Chemotherapie ist bei einem Resektionsrand unter 5 mm und/oder extrakapsulärem Tumorwachstum indiziert. Dabei ist Cisplatin das bedeutendste Chemotherapeutikum in der Therapie der Kopf-Hals-Tumoren (Leitlinie Mundhöhlenkarzinom 2012). Die Patienten dieser Studie erhielten eine *low-dose*-(6 mg/m²Körperoberfläche(KOF)/Tag(d)) oder eine *high-dose*-(40 mg/m²KOF/d)-Chemotherapie intravenös (i.v.) mit antiemetischer Therapie bei Bedarf. Das 5-Jahresüberleben bei Patienten, die eine konkomitante Chemotherapie erhalten, ist signifikant höher als das von Patienten mit alleiniger Radiotherapie (Cooper et al. 2004; Blanchard et al. 2011). Allerdings sind auch die therapieassoziierten akuten toxischen Nebenwirkungen signifikant höher (Cooper et al. 2004; Zhang et al. 2012). Zusammen mit der Bestrahlung kommt alternativ oder in Kombination mit der Cisplatintherapie die Behandlung mit dem monoklonalen Anti-EGFR-Antikörper Cetuximab infrage (Leitlinie Mundhöhlenkarzinom 2012).

1.3 Nebenwirkungen der Therapie

Die Nebenwirkungen der Therapie von Kopf-Hals-Tumoren können nach dem Zeitpunkt ihres Auftretens in akute und chronische Begleiterscheinungen unterteilt werden. Akute Nebenwirkungen treten innerhalb der ersten 90 Tage der Therapie ein, chronische oder späte Nebenwirkungen erscheinen danach. Durch intensiviertere Therapiekonzepte mit stärkerer Toxizität persistieren manche akute Epithelschäden auch über den zur Orientierung gesetzten Zeitrahmen von 90 Tagen hinaus (Trotti 2000).

Zur akuten Organtoxizität (*high-grade acute organ toxicity* (HGAOT)) der RCT bei Kopf-Hals-Tumoren gehören in erster Linie Dermatitis, Dysphagie und Mukositis. Meist beginnen diese etwa 2 Wochen nach Therapiebeginn und können von Übelkeit, Erbrechen, vermindertem Geschmackempfinden und Mundtrockenheit begleitet sein. Die Radiodermatitis ist bei extrakorporaler Bestrahlung kaum zu vermeiden. Eine Dysphagie kann aufgrund von neurologischen, neuromuskulären oder strukturellen Schädigungen durch die Therapie entstehen und die Lebensqualität in großem Maße beein-

trächtigen. Das frühe Erkennen und Therapieren von Schluckbeschwerden ist für die Vermeidung von Mangelernährung und Komplikationen wie Dehydration oder Aspirationspneumonien sowie für die zeitige Einleitung einer adäquaten Therapie essentiell (Denaro et al. 2013). Des Weiteren können Blutbildveränderungen im Sinne einer Anämie, Leukopenie oder Thrombozytopenie durch den myelosuppressiven Effekt der Chemotherapie, außerdem Ototoxizität, Nephrotoxizität, periphere Neuropathie und Fatigue auftreten. Bei letzterer handelt es sich um eine tumor(therapie)assoziierte Erschöpfung mit variabler Chronizität, deren Ursache noch nicht geklärt ist (Fogh und Yom 2014).

Akute Nebenwirkungen können bei starker Ausprägung die Lebensqualität der Patienten stark einschränken und die Therapiekosten durch notwendige Schmerztherapie oder zusätzliche Krankenhausaufenthalte steigern. Besonders problematisch ist, dass jede HGAOT ein Pausieren oder Abbrechen der Therapie zur Folge haben kann. Der therapielimitierende Effekt der Nebenwirkungen zieht eine Verschlechterung der lokalen Kontrolle und der Prognose nach sich, denn das Pausieren der Therapie begünstigt die Regeneration der Tumorzellen (Tarnawski et al. 2002).

Zu den Langzeitnebenwirkungen einer RCT im Kopf-Hals-Bereich gehören Xerostomie (eine ausgeprägte Mundtrockenheit durch verminderte Speichelproduktion), Strahlenkaries, Osteonekrose und Trismus (Einschränkung der Mundöffnung).

1.3.1 Einteilung nach Schweregraden

Um Symptome und Laborveränderungen, die mit einer medizinischen Therapie assoziiert sind, bewerten und einteilen zu können, wurden die „*Common Toxicity Criteria for Adverse Events*“ (CTCAE, kurz CTC) erstellt. Das Verzeichnis beinhaltet mehr als 250 Komplikationen, wobei alle Tumortherapien (Chirurgie, RCT und Biologika) berücksichtigt werden. Die Einteilung der Schweregrade erfolgt von Grad 1 (milde Nebenwirkungen (NW)) bis Grad 5, was einem Tod durch die toxischen Begleiterscheinungen einer Therapie entspricht.

Tabelle 7: Systematik der CTC-Scores

Grad	1	2	3	4	5
Beschreibung	milde NW	moderate NW	starke NW	lebensbedrohliche NW	Tod

Die Zuordnung der HGAOT-Schweregrade zu den Patienten fand im untersuchten Patientenkollektiv dieser Arbeit während der Behandlung bis zum Abklingen der Sympto-

matik wöchentlich durch den betreuenden Arzt statt. Die in Tab. 8 dargestellten Parameter sind speziell auf die Nebenwirkungen der RCT bei Kopf-Hals-Tumoren zugeschnitten und wurden für die Bewertung des CTC-Scores zu Rate gezogen.

Tabelle 8: Beschreibung der CTC-Scores der Nebenwirkungen von Kopf-Hals-Tumoren

CTC-Score	
Grad	Beschreibung
Dermatitis	
1	leichtes Erythem / trockene Schuppung
2	moderates Erythem und Ödem, feuchte Schuppung in Körperfalten
3	feuchte Schuppung, Blutung durch inadäquates Trauma
4	Hautnekrose oder -ulzeration der gesamten Dermis, spontane Blutungen
5	Tod
Mukositis	
1	Erythem der Mukosa
2	fleckige Ulzerationen / Pseudomembranen
3	konfluierende Ulzerationen / Pseudomembranen, Blutung durch inadäquates Trauma
4	Gewebsnekrose, spontane Blutungen, lebensbedrohlichen Konsequenzen
5	Tod
Dysphagie	
1	symptomatisch, Patient verträgt reguläre Diät
2	veränderte Ess- und Schluckgewohnheiten, i.v. Flüssigkeitsgabe < 24 Stunden
3	inadäquate Flüssigkeitsaufnahme oder Kalorienzufuhr, i.v. Flüssigkeitsgabe, Magensonde oder totale parenterale Ernährung ≥ 24 Stunden
4	lebensbedrohliche Konsequenzen (Obstruktion/Perforation)
5	Tod

Tabelle 8 in Anlehnung an CTCAE v3.0 2009; CTCAE v4.0 2009

1.3.2 Pathogenese der Nebenwirkungen der RCT

Untersuchungen von Denham und Hauer-Jensen zufolge handelt es sich bei der Gewebsschädigung durch ionisierende Strahlung um eine „komplexe Wunde“, die einige Charakteristika mit normalen Verletzungen durch mechanische oder thermische Traumata teilt, aber auch viele Besonderheiten aufweist. Dies liegt unter anderem daran, dass die Schädigung repetitiv über einen langen Zeitraum auf das Gewebe einwirkt und somit verschiedene Prozesse wie Zelluntergang, Entzündung und Wundheilung zeitgleich auftreten, interagieren und den gesamten Gewebsverband modulieren. Jede erneute Exposition mit ionisierender Strahlung führt zu weiterer Freisetzung großer Mengen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), welche DNA-Schäden hervorrufen, Proteine, Fette, Kohlenhydrate sowie andere Moleküle modifizieren und bereits ablaufende Heilungsprozesse verstärken, abschwächen oder verändern können (Denham und Hauer-Jensen 2002).

Als direkte Folge der RCT kommt es zu einer rasanten Zerstörung basal-liegender Epithelzellen (Marks 1997). Die klinisch sichtbaren Veränderungen treten erst später auf und werden weitgehend durch die Immunreaktion des darunterliegenden Gewebes hervorgerufen (Denham und Hauer-Jensen 2002). Durch die Bestrahlung wird das Gerinnungssystem aktiviert. Die Gefäße dilatieren und werden permeabel, wodurch eine verstärkte Leukozyteninfiltration in das Gewebe stattfindet. Die einwandernden Immunzellen sezernieren proteolytische Enzyme und proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor alpha ($\text{TNF}\alpha$), Interleukin-1 beta ($\text{IL-1}\beta$) und Interleukin 6 (IL-6). Sie führen durch Freisetzung von ROS zu einer Verstärkung der Schädigung. Im Gegensatz zu „normalen“ Wunden kommt es durch die wiederholte Einwirkung der Bestrahlung zu einer chronischen Stimulation inflammatorischer Signalkaskaden und der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie TP53 und nukleärer Faktor- κB ($\text{NF-}\kappa\text{B}$), sodass Zytokine in der Matrix akkumulieren und dort weitere Schäden hervorrufen (Denham und Hauer-Jensen 2002; Hymes et al. 2006). Reparationsmechanismen, wie die Angiogenese, die Bildung von Granulationsgewebe oder die Reepithelialisierung offener Läsionen, werden inhibiert. Heilungsprozesse werden über Jahre nach der Therapie hinweg modifiziert, sodass aufgrund des dauernden Gewebsstresses Fibrosierung stattfindet und die damit verbundenen Langzeitnebenwirkungen wie Xerostomie und Trismus auftreten (Dirix et al. 2006).

1.3.3 Relevanz der Nebenwirkungen für Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren

Die Nebenwirkungen einer RCT können sich zum einen dosis- und therapielimitierend äußern, zum anderen weisen sie einen prognostischen Wert für das Gesamtüberleben sowie für das rezidivfreie Intervall auf. So untersuchten Wolff et al. die Korrelation therapieassoziierter Nebenwirkungen mit dem Langzeitüberleben sowie dem Auftreten von Rezidiven oder Zweittumoren anhand einer retrospektiven Studie mit 294 Patienten. In der genannten Studie ergab sich bei Patienten mit einem CTC-Score von ≥ 3 eine 5-Jahresüberlebenschance von 90 %, während das 5-Jahresüberleben bei Patienten mit einem CTC < 3 signifikant auf 24 % verringert war. Auch die rezidivfreie Zeitspanne war bei Patienten mit toxischen Nebenwirkungen deutlich größer (Wolff et al. 2011). Auftreten und Schweregrad der HGAOT variierten innerhalb der Patientengruppen mit gleichen extrinsischen Faktoren, wie Erkrankungsstadium und Therapiekonzept, stark. Die Untersuchung intrinsischer, patientenindividueller Faktoren scheint daher von Relevanz für die Entwicklung der therapieassozierten Toxizität zu sein. Die individuelle Zusammensetzung des Immunsystems stellt einen Faktor dar, der möglicherweise das Auftreten dieser Nebenwirkungen und die damit verbundene bessere Tumorkontrolle beeinflusst. Dieses Konzept bildet die Grundlage der vorliegenden Arbeit und wirft die Frage auf, ob sich die Entwicklung der Nebenwirkungen auf Basis des prätherapeutischen Immunstatus vorhersagen lässt (siehe 1.5 Fragestellung und Zielsetzung, S. 24).

1.4 Tumor-Immunologie

Das Immunsystem hat die Aufgabe, den Körper vor Pathogenen und entarteten Zellen zu schützen. Dabei läuft ein mehrstufiger Prozess, von der Antigenerkennung über die Rekrutierung von Immunzellen und die Eliminierung des Pathogens bzw. der entarteten Zellen bis hin zur Auflösung der Entzündungsreaktion, ab. Eine essentielle Grundlage für diese überlebenswichtige Aufgabe ist die Fähigkeit „fremd“ von „eigen“ zu unterscheiden und daraufhin eine schützende Immunantwort zu generieren. Dabei spielen sowohl das angeborene unspezifische, als auch das adaptive spezifische Immunsystem eine Rolle. Die Grenze zwischen den beiden Systemen ist fließend, denn beide stehen in ständiger Interaktion miteinander. Grundsätzlich werden die Granulozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) dem angeborenen System zugeordnet, während dendritische Zellen (DCs) sowie T- und B-Zellen dem erworbenen Immunsystem zugeordnet werden. Makrophagen und Monozyten nehmen eine Zwischenstellung ein und erfüllen Aufgaben in beiden Systemen.

Im Bezug auf Tumoren verhindert das Immunsystem im Wesentlichen deren Entstehung und Progression, es kann paradoxerweise jedoch auch eine tumorunterstützende Rolle spielen (Vesely et al. 2011).

1.4.1 Die immunologische Tumorüberwachung

Das Immunsystem kann die Entstehung und Proliferation von Tumorzellen durch verschiedene Mechanismen verhindern. Der Schutz vor kanzerogenen Virusinfektionen unterbindet die Bildung von Tumorzellen. Die rechtzeitige Auflösung entzündlicher Prozesse verhindert weiterhin die Entstehung eines tumorbegünstigenden Mikromilieus. Außerdem können bereits entstandene Tumorzellen durch das Immunsystem erkannt und eliminiert werden.

Das Erkennen „fremder“ entarteter Zellen ist von höchster Wichtigkeit für die Bekämpfung der Tumorzellen und wird „*Immunosurveillance*“ genannt (Ploegh 2013). Tumorzellen werden anhand tumorspezifischer, also nur von diesen Zellen gebildeter Antigene oder anhand körpereigener, aber pathologisch exprimierter Biomoleküle erkannt. Bei virusinduzierten Tumoren, wie beispielsweise EBV-positiven Nasopharynxkarzinomen, können aber auch Virusantigene als Tumorantigene dienen (Finn 2008). Diese Antigenerkennung ist essentiell für die Auslösung einer adaptiven Immunantwort, die sich spezifisch gegen die Tumorzellen richtet.

Durch die RCT werden vermehrt Tumorzellen abgetötet, wodurch die Freisetzung unterschiedlichster Tumorantigene gefördert wird. Freigesetzte Proteine sterbender Tu-

morzellen weisen *danger associated molecular patterns* (DAMPs) auf, welche immunstimulierend wirken (Fucikova et al. 2015). Dies führt zu einer verstärkten Immunreaktion und Induktion von Apoptose. Daraus folgt wiederum eine stärkere Antigenfreisetzung im Sinne eines sich wiederholenden Zyklus, des „*Cancer-Immunity-Cycles*“ (Chen und Mellman 2013).

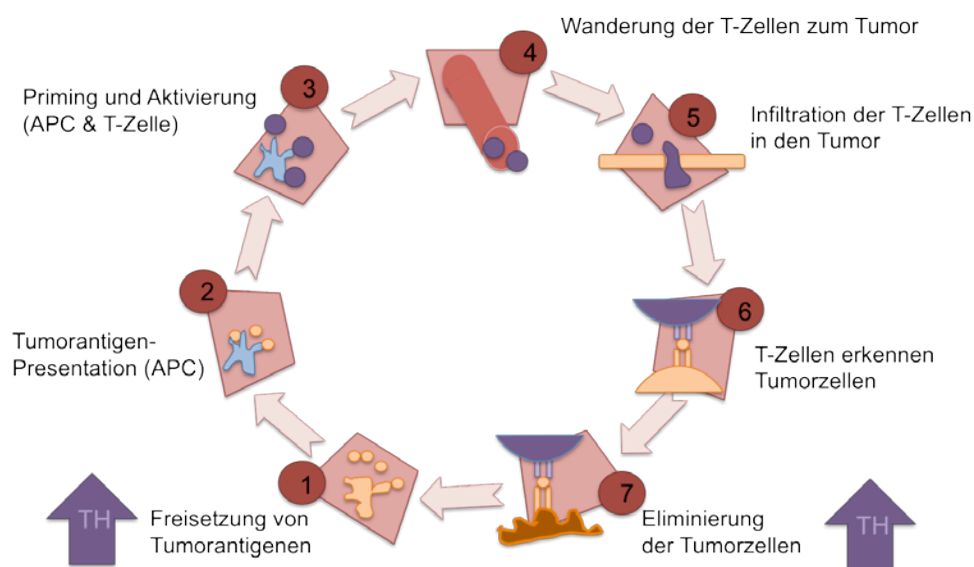


Abbildung 1: Der „Cancer-Immunity-Cycle“. Zunächst kommt es durch sterbende Tumorzellen zur Freisetzung von Tumorantigenen (1). Antigenpräsentierende Zellen (APCs) nehmen Antigene auf, prozessieren und präsentieren sie (2). Durch Interaktion von APCs und T-Zellen, welche für dasselbe Epitop spezifisch sind, werden die T-Zellen aktiviert (3). Durch Wanderung entlang des Gefäßsystems (4) und Infiltration (5) gelangen tumorspezifische T-Zellen in den Tumor. Hier erkennen sie Tumorzellen an den spezifischen Antigenen (6) und können diese Zellen lysieren (7). Dadurch kommt es erneut zu Tumorantigenfreisetzung. Die RCT erhöht durch Zerstörung von Tumorzellen direkt die Freisetzung von Tumorantigenen (Pfeil links) und somit auch indirekt die Immunantwort gegen den Tumor (Pfeil rechts). Abbildung in Anlehnung an Chen und Mellman 2013.

Auch Tumoren an sich können immunogen wirken, beispielsweise indem Mutationen in inflammatorisch relevanten Signalkaskaden stattfinden. Die Tumoren schütten als Folge Chemokine oder Zytokine aus, die Immunzellen in das Tumormikromilieu locken (Ji et al. 2006). Im Anschluss an die Erkennung der Tumorzellen folgt die entscheidende Phase der Tumorzelleliminierung. Diese findet über verschiedene Mechanismen, vor allem durch die Induktion von Apoptose statt und wird unter anderem von zytotoxischen *cluster of differentiation-8-positive* ($CD8^+$)-T-Zellen ausgeführt (Vesely et al. 2011).

1.4.2 Immune-Escape-Mechanismen von Tumorzellen

Ungeachtet der vorhandenen „*Immunosurveillance*“ kommt es auch bei einem funktionsfähigen Immunsystem zur Entstehung von Tumoren. Dies ist ein Zeichen dafür, dass das Immunsystem eine sehr komplexe Rolle in der Tumorentstehung spielt. Einen Erklärungsansatz bietet der dynamische Prozess des „*Immunoediting*“, dem zufolge die Interaktion zwischen Immunsystem und Tumor in drei Phasen eingeteilt wird, welche auf dem Weg zu einem wachsenden Tumor nacheinander ablaufen.

In der ersten Phase werden die Tumorzellen vom Immunsystem erkannt und teilweise oder komplett eliminiert, lange bevor sie klinisch apparent werden. Im Falle einer unvollständigen Tumoreliminierung kommt es zunächst zu einem temporären Gleichgewicht zwischen dem wachsendem Tumor und dem Immunsystem. Im Laufe dieser Phase treten weitere Mutationen in Tumorzellen auf und es findet ein Selektionsvorgang statt, der letztlich dazu führt, dass einzelne Zellvarianten gegenüber den Immunmechanismen resistent werden. Das System tritt dadurch in die „*Escape*“-Phase ein, in welcher der Tumor sich der Kontrolle des Immunsystems entzieht und ungehindert zu proliferieren beginnt (Dunn et al. 2004; Swann und Smyth 2007; Finn 2008).

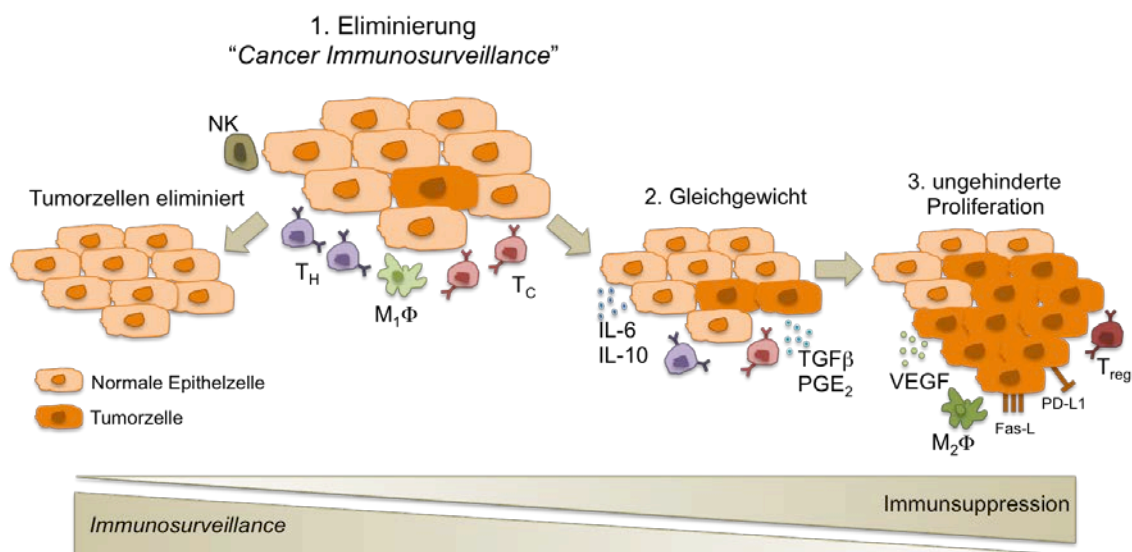


Abbildung 2: Der Prozess des Immunoediting. In der ersten Phase werden entstehende Tumorzellen aufgrund ihrer hohen Immunogenität und der fehlenden Immunsuppression rasch durch das Immunsystem eliminiert (1) und der physiologische Zellverbund wieder hergestellt (ganz links). Falls die Tumorzellen nicht komplett eliminiert werden, kommt es zu einem Gleichgewicht zwischen dem Immunsystem und dem Tumor (2). Der Tumor kann Zytokine und Mediatoren wie Interleukin-6 (IL-6), IL-10 und *transforming growth factor β* (TGFβ) oder Prostaglandin E₂ (PGE₂) ausschütten. In der Folge können durch Selektionsvorgänge Zellvarianten entstehen, die einen Überlebensvorteil haben, dem Immunsystem entgehen oder es aktiv supprimieren können. Durch diese Mechanismen kann der Tumor ungehindert proliferieren (3). Abbildung in Anlehnung an Duray et al. 2011 und Vesely et al. 2011.

Lokal können Tumoren die gegen sie gerichtete Immunantwort durch Inaktivierung von T-Effektorzellen, Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen, Expression von *programmed-death-ligand 1* (PD-L1) und Fas-Ligand (Fas-L) oder Herunterregulierung von *major histocompatibility complex*-(MHC)-Klasse-1-Molekülen und somit verringerter Antigenpräsentation unterdrücken (Gastman et al. 1999; Rabinovich et al. 2007; Duray et al. 2011). Als systemisch wirksame Mechanismen können Tumorzellen durch Sekretion immunsuppressiver Moleküle, wie TGF- β , IL-6 und IL-10, PGE₂ oder löslichen Fas-Ligand, das körpereigene Immunsystem modulieren (Duray et al. 2011; Burkholder et al. 2014).

1.4.3 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten sind durch die Oberflächenexpression von CD3 gekennzeichnet und spielen eine herausragende Rolle in der Immunantwort gegen Tumorzellen. Sie werden im Knochenmark gebildet und wandern von dort in den Thymus. Wenn eine T-Zelle ihre Entwicklung im Thymus abgeschlossen hat und entweder CD4 oder CD8 auf ihrer Oberfläche trägt, tritt sie in den Blutstrom ein und rezirkuliert solange als naive T-Zelle zwischen Blut und Lymphsystem bis ihr spezifisches Antigen von einer APC in Form eines Peptid-MHC-Komplexes präsentiert wird. Zur anschließenden Aktivierung der naiven T-Zelle werden zwei weitere Signale benötigt: ein kostimulatorisches Signal durch Interaktion eines Oberflächenrezeptors der T-Zelle, beispielsweise CD28 oder *inducible T-cell COStimulator* (ICOS), mit dem B7-Rezeptor auf der APC, und die Ausschüttung von Zytokinen (IL-2, IL-4, IL-6, IL-12 oder TGF- β). Hierdurch wird die Differenzierung in eine spezifische T-Zell-Subpopulation und ihre Effektorantwort beeinflusst.

Aufgrund ihrer außerordentlichen Bedeutung für die Immunantwort gegen Tumorzellen wurden in den letzten Jahren insbesondere die tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten (TIL) erforscht (Hadrup et al. 2013). Zum Zeitpunkt ihrer Entdeckung in den 1860er Jahren postulierte Rudolph Virchow, dass die TILs ein Entzündungsmilieu für die Entstehung von Tumoren schaffen. Erst später entstand die Idee, dass die Entzündung auch tumorsupprimierend wirken kann und in der Tumorthherapie instrumentalisiert werden könnte (Coussens und Werb 2002).

1.4.3.1 CD8⁺-T-Zellen

CD8⁺-T-Zellen differenzieren nach Aktivierung durch APCs zu zytotoxischen T-Zellen, die in ihren Zielzellen Apoptose induzieren können. Um aktiviert zu werden, benötigen sie ein höheres Maß an Kostimulation als CD4⁺-T-Zellen, sodass die Aktivierung durch die APC häufig nicht ausreicht und die zusätzliche Sekretion von IL-2 durch T-Helferzellen stattfinden muss. Damit sie ihre zytotoxische Funktion ausüben kann, bindet die CD8⁺-T-Zelle zunächst über *lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1) an *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) oder -2 auf der Zielzelle, um diese nach passenden Peptid-MHC-Klasse-I-Komplexen absuchen zu können. Bei passendem Antigen wird dieses über den T-Zell-Rezeptor (TCR) gebunden, der Zell-Zell-Kontakt wird stabilisiert und verlängert. Abschließend sezerniert die T-Zelle ihre Effektormoleküle über die entstandene immunologische Synapse. Die Substanzen setzen sich aus in Granula gespeicherten Zytotoxinen (Perforin, Granzym (GRZB), Granulysin), Zytokinen (Interferon gamma (IFN γ), TNF α) und membranassoziierten Molekülen (Fas-L) zusammen und werden in einem regulierten Prozess freigesetzt. Hierdurch attackierte Zellen werden durch programmierten Zelltod in Form von Apoptose oder Autophagie eliminiert und durch Phagozyten abgebaut.

Das Vorhandensein infiltrierender CD8⁺-T-Zellen scheint im Großteil der Tumorentitäten mit einer positiven Prognose verbunden zu sein (Fridman et al. 2012; Hadrup et al. 2013). Viele dieser tumorinfiltrierenden CD8⁺-T-Zellen erweisen sich jedoch als „erschöpft“, was sich in der Expression koinhibitorischer Oberflächenrezeptoren wie *programmed cell death protein 1* (PDCD-1) oder *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4) manifestiert. Daraus folgt, dass die zytotoxischen T-Zellen hyporeaktiv werden und weniger Zytokine und Zytotoxine ausschütten. Somit können sie nur eine eingeschränkte Antitumorantwort generieren. Ihr tumorsupprimierender Effekt wird durch das Tumormikromilieu unterdrückt (Jiang Y et al. 2015).

1.4.3.2 CD4⁺-T-Zellen

CD4⁺-T-Zellen haben im Gegensatz zu den CD8⁺-T-Zellen mehrere Möglichkeiten der Differenzierung. Die wichtigsten bislang bekannten Subpopulationen sind die T-Helferzellen T_H1-, T_H2-, T_H17- und T_{reg}-Zellen (regulatorische T-Lymphozyten). Sie werden hauptsächlich durch die von ihnen sezernierten Zytokine unterschieden, und ihre Differenzierung wird ebenfalls durch unterschiedliche Zytokine induziert. Die Ausschüttung von TGF β und IL-6 durch APCs führt zur Differenzierung in T_H17-Zellen, IL-12 und IFN γ induzieren die Bildung von T_H1-Zellen und IL-4 fördert die Entwicklung zu T_H2-Zellen. Die T_H1-, T_H2- und T_H17-Zellen interagieren mit anderen Immunzellen wie Mak-

rophagen, B-Zellen oder neutrophilen Granulozyten und tragen so dazu bei, Pathogene zu eliminieren. Dabei binden sie nach Erkennung von Peptid : MHC-Klasse-II-Komplexe an ihre Zielzellen und produzieren daraufhin spezifische Zytokine und Membranproteine.

Die Studienlage zum prognostischen Wert von tumorinfiltrierenden CD4⁺-T-Zellen ist nicht so eindeutig wie die der CD8⁺-T-Zellen. Dies lässt sich unter Umständen durch ihren modulierbaren Charakter erklärbar. CD4⁺-T-Zellen können sich von „*anti-tumor*“ zu „*pro-tumor*“ wandeln (Liu et al. 2007). Da die meisten soliden Tumoren keine MHC-Klasse-II-Moleküle exprimieren, können CD4⁺-T-Zellen die Tumorzellen oft nicht selbst erkennen, wodurch ihre Tumorimmunantwort eingeschränkt ist. Sie können jedoch, wie oben beschrieben, die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und deren Effekt auf die Tumorzellen unterstützen (Hadrup et al. 2013).

1.4.3.3 Regulatorische T-Zellen (T_{reg})

T_{reg}-Zellen gehören ebenfalls zu den CD4⁺-T-Zellen, wobei ihre Bildung durch TGFβ und IL-6 induziert wird. Im Gegensatz zu den anderen CD4⁺-T-Zellen wirken sie immunsuppressiv und -modulatorisch. Dies bedeutet, dass sie überschießende T-Zell-Antworten limitieren und Autoimmunprozesse verhindern können. Auch in der Tumormikroumgebung zeigen sie ein bipolares Aktivitätsprofil: Zum einen unterdrücken sie die nützliche Immunantwort der T-Zellen, NK-Zellen und klassischen Makrophagen, zum anderen können sie die durch IL-6, IL-1β oder TNFα die entzündlich-geprägte Tumorumgebung reprimieren und so den Tumorprogress behindern (Gallimore und Simon 2008).

1.4.4 NK-Zellen

Die natürlichen Killerzellen gehören zu den ersten Zelltypen, denen die Fähigkeit zur Tumorzellelimination zugeschrieben wurde. Da sie keine antigen-spezifischen Rezeptoren besitzen, erfolgt die Erkennung entarteter Zellen nach dem „*missing-self*“-Modell. Bei virusinfizierten Zellen und Tumoren sind die MHC-Klasse-I-Moleküle häufig herunterreguliert um der Erkennung durch T-Lymphozyten zu entgehen. Gemäß des „*missing-self*“-Modells werden Zellen, die eine verminderte Anzahl an MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche exprimieren, durch NK-Zellen abgetötet (Fruci et al. 2012). Ihre Zelleliminierungsmechanismen ähneln dabei denen der CD8⁺-T-Zellen, bestehend aus dem Aufbau einer immunologischen Synapse, der Expression von Fas-Ligand oder der Sekretion von Granzym- und Perforingranula und schließlich die Induktion von Zelltod.

1.4.5 Monozyten und Makrophagen

Unter dem Begriff „Monozyten“ wird eine heterogene Gruppe mononukleärer Zellen mit zahlreichen Subpopulationen zusammengefasst, die sich in ihrer Funktionalität unterscheiden. Als eine Gemeinsamkeit tragen sie das Protein CD14 auf der Oberfläche und machen zusammengenommen 5-10 % der peripheren Leukozyten aus (Gordon und Taylor 2005).

Eine Einteilung der Monozyten in zwei Hauptgruppen erfolgt beim Menschen auf Basis der Expression von CD16. Die $CD14^{high}CD16^{-}$ -Monozyten werden auch „klassische“ Monozyten genannt und machen beim gesunden Menschen 90-95 % der Monozyten aus. Die „nicht-klassischen“ $CD14^{+}CD16^{+}$ -Monozyten expandieren bei entzündlichen Prozessen, produzieren nach Stimulation mit *toll-like-receptor-4*(TLR4)-Agonisten verstärkt $TNF\alpha$ und weisen eine höhere Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen und somit eine verbesserte Antigenpräsentationsfähigkeit auf (Ziegler-Heitbrock 2007). Sie machen beim gesunden Menschen 5-10 % aller Monozyten aus (Strauss-Ayali et al. 2007), wobei ihr Anteil bei systemischen Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis (Kawanaka et al. 2002), bakteriellen Sepsis (Fingerle et al. 1993) und HIV-Infektion (Thieblemont et al. 1995) aber auch bei Tumorerkrankungen wie Brustkrebs ansteigt (Feng et al. 2011).

Monozyten haben die Fähigkeit, im Rahmen einer Immunantwort in das Gewebe einzuwandern und sich dort zu Makrophagen zu differenzieren. Diese können in proinflammatorische M1- und antiinflammatorische M2-Makrophagen unterteilt werden. Erstere schützen den Organismus vor Bakterien, Protozoen und Viren und sind an der Antitumorantwort beteiligt, indem sie ROS, Stickstoffmonoxid (NO) und Zytokine sezernieren und die T_H1 -Polarisierung stimulieren. Der M2-Typ hingegen kann bei Entzündungsgeschehen die Wundheilung fördern (Murray und Wynn 2011). Eine hohe Anzahl an Tumor-infiltrierenden Makrophagen mit M1-Dominanz ist prognostisch günstiger als ein Überwiegen des M2-Phänotyps (Richards et al. 2013).

1.4.6 Immunogenität der Kopf-Hals-Tumoren

Die Kopf-Hals-Region ist aufgrund ihrer anatomischen Lage und Funktion eine bevorzugte Eintrittspforte für zahlreiche Krankheitserreger und daher immunologisch gesehen von großer Wichtigkeit. Durch das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe des Waldeyer'schen Rachenringes (*Tonsillae pharyngealis, tubaria, palatina* und *lingualis*) kommen Pathogene und Immunzellen früh miteinander in Kontakt, sodass eine erste Immunreaktion bereits vor Eintritt in den Gastrointestinal- bzw. den Respirationstrakt stattfindet. Durch die Akkumulation von Schäden durch mechanische, chemische, entzündliche Beanspruchung, infektiöse Pathogene (über 400 Bakterienspezies in der Mundhöhle (Sugawara et al. 2002)) und immunologischer Vorgänge, nimmt das Immunsystem der Kopf-Hals-Region eine herausragende Position ein. Dies spiegelt sich auch in der Entstehung, Progression und Therapie der Kopf-Hals-Tumoren wider.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Die Therapie der Kopf-Hals-Tumoren ist aufgrund der hohen assoziierten Morbidität eine der großen klinischen Herausforderungen dieser Zeit. Aufgrund einer geringen lokoregionalen Kontrolle (häufige Tumorrezidive und Lymphknotenmetastasen) ist eine radikale Therapie zur Überlebensverlängerung für die Patienten in vielen Fällen unumgänglich. Häufig treten dabei toxische Begleiterscheinungen auf und indizieren nach neuesten Erkenntnissen eine positive Prognose (Wolff et al. 2011).

Die starke Immunreaktion, welche den Tumor, aber auch das umliegende gesunde Gewebe schädigt und so für die Nebenwirkungen mitverantwortlich ist, stellt möglicherweise einen wichtigen Mediator des Therapieeffektes dar. Diese Verknüpfung könnte das signifikant längere rezidivfreie Überleben von Patienten mit stärkeren Therapie Nebenwirkungen erklären.

Ausgehend von der Hypothese, dass die individuelle Zusammensetzung und Potenz des Immunsystems die Stärke der *acute organ toxicity* sowie der Antitumorantwort bestimmen, stellt sich die Frage nach möglichen prädiktiven immunologischen Biomarkern für die Entstehung der Nebenwirkungen noch vor Start der Therapie.

Die Bestimmung des individuellen Risikos für die Entwicklung schwerer toxischer Nebenwirkungen durch biologische Prädiktoren könnte eine optimierte personalisierte Behandlung ermöglichen und direkten Einfluss auf die Therapie und das *Outcome* von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren haben.

Patienten, bei denen aufgrund prädiktiver Biomarker stark ausgeprägte Nebenwirkungen zu erwarten sind, könnten weiterhin von der bisherigen Therapie profitieren und durch eine intensive multimodale Supportivtherapie unterstützt werden. Patienten mit einer geringen Nebenwirkungstendenz hingegen, könnten von einer exazerbierten Therapie und dem dadurch verstärkt immunmodulierenden Effekt profitieren, ohne unter einer zu starken Toxizität zu leiden.

Zur Testung dieser Hypothese wurden durch Untersuchung von PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*), Vollblut- und Plasmaproben sowie Tumorgewebe von 48 Kopf-Hals-Tumor-Patienten mögliche immunologische Parameter identifiziert und durch statistische Analysen in Form von möglichen klinischen Tests aufbereitet.

2 Patientenkollektiv, Material und Methoden

2.1 Ethische Grundlage

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden im Einklang mit den ethischen Standards nach der Deklaration von Helsinki sowie (inter-) nationalen Richtlinien durchgeführt und wurden vom Ethikkomitee der Universitätsmedizin Göttingen bewilligt (Antragsnr: DOK_231_2015; Votumnr. 9/12/10). Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde von jedem Patienten vor der Entnahme von Blut oder Tumormaterial eingeholt.

2.2 Untersuchtes Patientenkollektiv

Im Rahmen der Fragestellung dieser Dissertation wurden 48 Patienten in die Untersuchung eingeschlossen, die eine R0-Resektion eines Tumors der Kopf-Hals-Region und eine anschließende RCT in der Abteilung für Strahlentherapie der Universitätsmedizin Göttingen erhalten haben. Die Patientenkohorte war im Median 63 Jahre alt (+/- 9,8 J Standardfehler (SEM)). 40 der 48 Patienten waren männlich. Der Tumor war bei 17 Patienten im Oropharynx, bei 12 Patienten in der Mundhöhle, bei 11 Patienten im Hypopharynx und bei 7 Patienten im Larynx lokalisiert. Bei einem Patienten erstreckte sich die Neoplasie über Oro- und Hypopharynx (siehe Tab. 9, S. 26). Histologisch entsprachen 47 der 48 Tumoren einem Plattenepithelkarzinom, ein Tumor war lymphoepithelialen Ursprungs. Alle eingeschlossenen Patienten erhielten eine kurative R0-Resektion und eine Neck-Dissektion, falls indiziert. An die Operation schloss sich eine sechswöchige Radiotherapie an 5 Tagen pro Woche an, bei der die Region des Primärtumors mit Einzelfraktionen von 2,08 Gy bis zu einer Gesamtdosis von bis zu 62,4 Gy bestrahlt wurde. Betroffene Lymphknoten wurden mit Einzeldosen von 1,92 Gy bis zu einer Gesamtdosis von 57,6 Gy bestrahlt und die Lymphabflusswege der Halsseiten erhielten Fraktionen von 1,8 Gy bis zu einem Maximum von 54,0 Gy. Der Großteil der Patienten (37 von 48) erhielt eine konkomitante niedrig- (6 mg/m²KOF/d i.v.) oder hochdosierte (40 mg/m²KOF/d i.v.) Chemotherapie mit Cisplatin. 11 Patienten erhielten ausschließlich eine Radiotherapie. Bei Bedarf wurden Antiemetika verabreicht. Der Grad an Toxizität wurde bis zum Abklingen der Symptomatik anhand der „*Common Toxicity Criteria for Adverse Effects*“ wöchentlich ermittelt. Aufgrund der starken Beeinträchtigung wurden Patienten mit einem CTC-Score von ≥ 3 in einem der drei Parameter (Dermatitis, Mukositis oder Dysphagie) in die Kohorte mit HGAOT eingeordnet.

27 der untersuchten Patienten entwickelten einen CTC-Score von ≥ 3 und 21 Patienten einen Score von < 3 . Die zusätzliche Behandlung mit Cisplatin hatte, im Vergleich zur alleinigen Strahlentherapie, keinen Effekt auf das Auftreten der HGAOT.

Tabelle 9: Übersicht über die Patientenkohorte

Eigenschaft	Patientenkohorte n = 48	
	CTC ≥ 3 n = 27 (56,25 %)	CTC < 3 n = 21 (43,75 %)
Alter, Jahre (Median +/- SEM)	63 +/- 9	63 +/- 11
männlich, Anzahl (%)	23 (85,2 %)	17 (81,0 %)
weiblich, Anzahl (%)	4 (14,8 %)	4 (19,0 %)
Lokalisation Primarius, Anzahl (%)		
Oropharynx	8* (29,6 %)	10 (47,6 %)
Mundhöhle	10 (37,0 %)	2 (9,5 %)
Hypopharynx	7* (25,9 %)	5 (23,8 %)
Larynx	3 (11,1 %)	4 (19,0 %)
T-Stadium, Anzahl (%)		
1	3 (11,1 %)	1 (4,8 %)
2	8 (29,6 %)	4 (19,0 %)
3	8 (29,6 %)	11 (52,4 %)
4	8 (29,6 %)	5 (23,8 %)
N-Stadium, Anzahl (%)		
0	3 (11,1 %)	5 (23,8 %)
1	4 (14,8 %)	5 (23,8 %)
2	18 (66,7 %)	11 (52,4 %)
3	2 (7,4 %)	0 (0 %)
Histologisches Grading, Anzahl (%)		
1	1 (3,7 %)	0 (0 %)
2	19 (70,4 %)	19 (90,5 %)
3	7 (25,9 %)	2 (9,5 %)
UICC-Stadium, Anzahl (%)		
I	0 (0 %)	0 (0 %)
II	1 (3,7 %)	1 (4,8 %)
III	5 (18,5 %)	8 (38,1 %)
IV	21 (77,8 %)	12 (57,1 %)

*Tumor erstreckte sich über Oro- und Hypopharynx (zweifach gezählt); Tab. modifiziert nach Beschel et al. 2016, S. 65904.

2.3 Material

2.3.1 Verwendete Geräte

Tabelle 10: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
7500 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Arium 611 Reinstwassersystem	Sartorius, Göttingen, Deutschland
BD FACS Canto™ II Flow Cytometer	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Electrophoresis Power Supply EPS 301	GE Healthcare Life Science, Chalfont St. Giles, England
Elektrophoresekammern	Peqlab Biotechnology, Erlangen, Deutschland
Gel Imager	Intas, Göttingen, Deutschland
Lab Thermometer IP 65 LT-101	TFA Dostmann, Mannheim, Deutschland
Mikroskop Primostar	Zeiss, Jena, Deutschland
Mikrotom HM 430	Thermo Scientific, Rockford, USA
Multipipette Transferpette S-12 (20-200µl)	Brand, Wertheim, Deutschland
Nanodrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Scientific, Rockford, USA
Neubauer-Zählkammer, 0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm ²	Precicolor HBG Germany, Giessen-Lützellinden, Deutschland
Olympus BX51 Mikroskop	Olympus, Hamburg, Deutschland
PCR MasterCycler ep gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Photometer PowerWave	BioTek, Winooski, USA
Pipetten (5 Milliliter (ml), 10 ml, 20 ml)	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Pipettierhilfe PipetBoy Multipipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
RT-PCR Cycler	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Schüttler GFL-3006	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Sterilbank Herasafe	Kendro, Langenbold, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex- Genie 2	Bender und Hopstein, Zürich, Schweiz
Wasserbad W 12	Störk-Tronic, Stuttgart, Deutschland
Zentrifuge 5417 R und 5804 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
96-Well-ELISA-Mikrotiterplatten	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
96-Well-PCR-Platten	Applied Biosystems, Foster City, USA
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, San Jose, USA
Falcons (15ml, 50ml)	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Menzel-Deckgläser	Thermo Scientific, Rockford, USA
Mikrotomklingen Typ A35	Feather, Osaka, Japan
Parafilm	Pechiney Plastics Packaging, Chicago, USA
PCR-Verschussfolie	Applied Biosystems, Foster City, USA
Pipettenspitzen	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Reaktionsgefäße (1,5ml, 2ml)	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Superfrost Plus Objektträger	Thermo Scientific, Rockford, USA

2.3.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 12: Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)-TMB-Substrat-Lösung (ELISA MAX™)	100 µl TMB/DMSO + 10 ml Substratpuffer + 20 µl H ₂ O ₂ (3,5 %)
1 % Agarosegel	1 % Agarose in TAE-(TRIS-Acetat-EDTA)-Puffer; 0,1 µg/ml
3-3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid-(DAB)-Entwicklerlösung	1 ml DAB-Lösung (2 g auf 80 ml bidest. Wasser) auf 49 ml PBS + 20 µl H ₂ O ₂
Assay Diluent	PBS (<i>phosphate buffered saline</i>) mit 10 % FCS (<i>fetal calf serum</i>), 5 ml FCS auf 45 ml PBS
Avidin-HRP-Enzym-Lösung (ELISA MAX™)	5 µl Avidin-HRP in 5 ml Assay Diluent
Citrat-Puffer	2,1 g/l Zitronensäure-Monohydrat, pH-Wert mit 10M NaOH auf 6,0 einstellen
Coating Buffer	0,1 M Natriumkarbonat (Na ₂ CO ₃); pH 9,5
Diethylcarbonat-(DEPC)-Wasser	0,1 % DEPC
Ethylendiamintetraacetat-(EDTA)-Lösung	1,21 g Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) auf 1 l bidest. Wasser

	mit 1 M EDTA (pH 8)
Fluorescence-activated-cell-sorting- (FACS)-Puffer	PBS pH 7,2 + 0,1 % BSA (<i>Bovine serum albumin</i>) + 0,01 % NaN ₃
Hydrogenchlorid-(HCl)-Ethanol-Lösung	3 %ige Salzsäure in 70 %igem Ethanol
Orange G	100 mg Orange G in 30 % Glycerin
PBS	0,8 % NaCl; 0,02 % KCl; 0,29 % Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O; 0,02 % KH ₂ PO ₄
PBS/Tween	PBS; 1 % Tween
Stopp-Lösung (1N H ₂ SO ₄)	236 ml H ₂ O + 13,9 ml H ₂ SO ₄
Substratpuffer	21 g Zitronensäure, 35,4 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O in 1 l H ₂ O dest.
TAE	40 mM Tris-Acetat + 1 mM EDTA bei pH 8,0
TAE-Puffer	200 ml 50x TAE auf 10 l Millipore-Wasser
TMB/DMSO (Dimethylsulfoxid)	1 mg TMB in 100 µl DMSO

2.3.4 Chemikalien

Tabelle 13: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
3-3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Agarose	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Biocoll Separating Solution	Biochrome, Berlin, Deutschland
BSA	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
DEPC	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Finzymes, Espoo, Finnland
DPX Eindeckmedium	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
EDTA	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eosin 1 % wässrig	Süsse Labortechnik, Gudensberg, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eukitt Eindeckmedium	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
FCS	Invitrogen, Carlsbad, USA

Glycerin	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
H ₂ O ₂	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
H ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxin sauer nach Mayer	Süsse Labortechnik, Gudensberg, Deutschland
KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCO ₃	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
NaOH	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Orange G	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
RPMI 1640 Medium	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Tris	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Süsse Labortechnik, Gudensberg, Deutschland

2.3.5 Enzyme und Kits

Tabelle 14: Enzyme und Kits

Bezeichnung	Hersteller
ELISA HMGB1 Kit	IBL International, Hamburg, Deutschland
ELISA MAX TM IL-2	BioLegend, San Diego, USA
ELISA MAX TM IL-6	BioLegend, San Diego, USA
ELISA MAX TM TNF α	BioLegend, San Diego, USA
ELISA MAX TM IFN γ	BioLegend, San Diego, USA
iScript TM cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, Hercules, USA
PAXgene Blood RNA Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
PfuS DNA-Polymerase	Eigene Herstellung des Labors
Power SYBR-Green Mastermix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Puffer HF	New England BioLabs, Ipswich, UK
Quick-RNA TM Mini Prep	Zymo-Research, Orange, USA

2.3.6 Antikörper

Tabelle 15: Antikörper

FACS				
Epitop	Klon	Spezifität	Farbstoff	Hersteller
CD3 ϵ	HIT3a	human	APC	BioLegend, San Diego, USA
CD4	OKT4	human	FITC	BioLegend, San Diego, USA
CD8 α	HIT8a	human	PE	BioLegend, San Diego, USA
CD14	HCD14	human	PE/Cy7	BioLegend, San Diego, USA
CD16	3G8	human	APC/Cy7	BioLegend, San Diego, USA
CD19	HIB19	human	PE/Cy5	BioLegend, San Diego, USA
CD56	HCD56	human	PE	BioLegend, San Diego, USA
CD69	FN50	human	PE/Cy7	BioLegend, San Diego, USA
CD154	24-30	human	APC/Cy7	BioLegend, San Diego, USA
HLA-DR	L243	Human	Alexa488	BioLegend, San Diego, USA
Immunhistochemie				
Epitop	Klon	Spezifität	Ursprung	Hersteller
CD4	SP35	human	Hase	Zytomed, Berlin, Deutschland
CD8	C8/144B	human	Maus	Dako, Glostrup, Dänemark
CK AE 1/3	CK AE 1/3	human	Maus	Dako, Glostrup, Dänemark
Sekundär-AK Hase	-	rabbit	Esel	Jackson Immunoresearch, Westgrove, USA
Sekundär-AK Maus	-	murin	Schaf	GE Healthcare, Little Chalfont, UK

2.3.7 Softwareprodukte

Tabelle 16: Softwareprodukte

Produkt	Hersteller
7500 System SDS Software	Applied Biosystems, Foster City, USA
FlowJo 8.8.6	Tree Star Inc., Ashland, USA
Gen 5 1.09 Software	BioTek, Winooski, USA
GraphPad Prism	GraphPad Software, La Jolla, USA

2.4 Methoden zur Analyse der Proben

2.4.1 *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. In dieser Arbeit wurde der Sandwich-ELISA angewandt, bei der das nachzuweisende Antigen durch einen *Capture*-Antikörper an einer Mikrotiterplatte fixiert wird. Ein Detektionsantikörper bindet an ein anderes Epitop des Zielantigens und durch Kopplung mit einem Reporterenzym und Zugabe des passenden Substrats, wird eine mit der Antigenmenge korrelierende Farbentwicklung hervorgerufen.

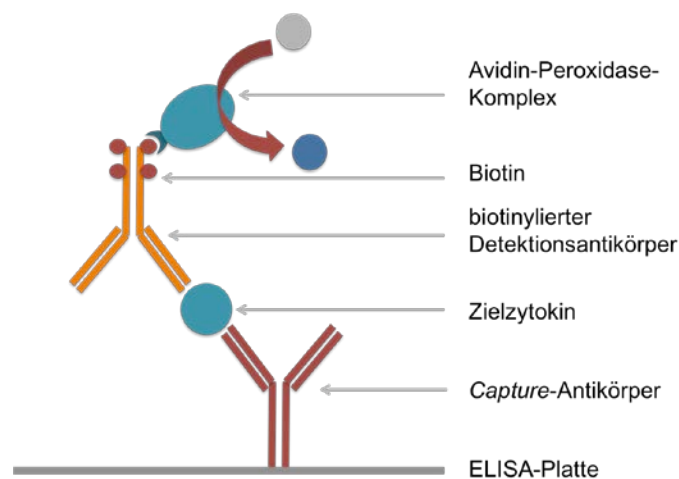


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Sandwich-ELISAs

Eine 96-Loch-Platte wurde mit 100 μ l verdünntem *Capture*-Antikörper je Loch bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Platte vierfach mit PBS/Tween gewaschen und die freien Bindungsstellen der Platte wurden mit 200 μ l Assay Diluent pro Loch mittels Inkubation auf dem Schüttler blockiert (1 Std, Raumtemperatur (RT)). Nach erneutem Waschen wurde sowohl die verdünnte Standardreihe des Zielzytokins (von 125 pg/ml bis 1,95 pg/ml) als auch das zu untersuchende Plasma aus venösem EDTA-Vollblut in einer Menge von je 100 μ l auf die Platte pipettiert und auf dem Schüttler inkubiert (2 Std, RT). Anschließend wurde die Platte erneut gewaschen, und in jedes Loch wurden 100 μ l des biotinylierten Detektionsantikörpers eingebracht. Am Ende der Inkubationszeit (1 Std, RT) auf dem Schüttler wurden ungebundene Antikörper durch waschen wieder von der Platte entfernt. Daraufhin wurden 100 μ l Avidin-*horseradish peroxidase*(HRP)-Enzym-Lösung auf die Platte pipettiert und für 30 Minuten (min) inkubiert. Durch die hohe Affinität von Avidin zu Biotin haftet der Avidin-

HRP-Komplex an den vorhandenen biotinylierten Detektionsantikörpern. Anschließend wurde die Platte fünffach gewaschen und mit 100 µl TMB-Substrat-Lösung für 20 min bei Dunkelheit inkubiert. Die Farbreaktion wurde mithilfe von 100 µl Stopp-Lösung beendet und im ELISA-Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm und 570 nm gemessen.

Die Daten wurden mittels Excel unter Verwendung einer Kalibrationskurve aus den Werten der Standardreihe ausgewertet (siehe Abbildung (Abb.) 5). Dafür wurde zunächst der Mittelwert (MW) der Negativkontrolle von den Messwerten der Standardreihe bei 450 und 570 nm abgezogen. Daraufhin wurden die Messwerte bei 570 nm (Hintergrund) von denen bei 450 nm subtrahiert und anschließend logarithmiert. Hierdurch wurde der eigentlich sigmoid-verlaufende Graph der Standardkurve linearisiert. Anhand der Regressionsgeraden konnten die unbekannt Konzentrationen der einzelnen Messwerte errechnet werden. Die im Patientenblut gemessenen Photometriedaten wurden dafür in die Regressionsformel eingesetzt. Um die Zytokinkonzentration der einzelnen Seren zu erhalten, wurde das Ergebnis nach Umformung und Auflösung der Formel entlogarithmiert und die Verdünnung herausgerechnet.

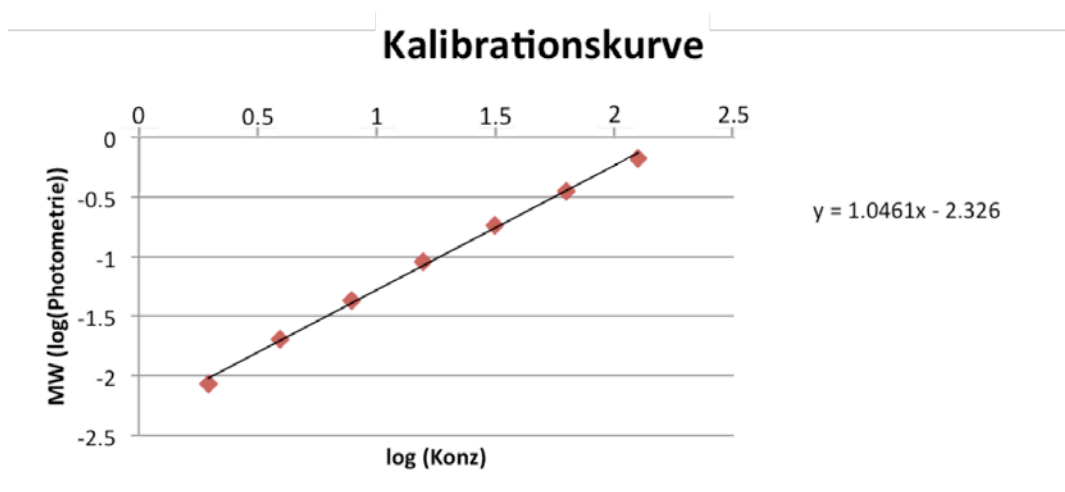


Abbildung 4: Kalibrationskurve der Standardreihe. Auf der Abszisse sind die logarithmierten Konzentrationen der Standardreihe (125 pg/ml bis 1,95 pg/ml) und auf der Ordinate die dazugehörigen Mittelwerte der Differenz zwischen den Absorptionswerten bei 450 nm und 570 nm logarithmisch aufgetragen. Der dargestellte Graph mit der Funktion „ $y = 1,0461x - 2,326$ “ ermöglicht es, aus den photometrisch gemessenen Werten die jeweilige Zytokinkonzentration auszurechnen. Dabei ist y der Photometriewert einer Probe und x die dazugehörige Konzentration, beide angegeben in logarithmischen Werten. Durch Umformung und Auflösung nach „ $x = (y + 2,326) / 1,0461$ “ sowie anschließende Entlogarithmierung und Verrechnung mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor erhält man die vorliegende Konzentration.

2.4.2 Quantitative reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion

Die quantitative reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-qPCR) ist eine Methode, mit der die relative Expression eines Gens anhand der vorliegenden mRNA bestimmt werden kann. Dabei wird die mRNA zunächst durch eine reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und anschließend mithilfe des Real-time PCR-Cyclers vervielfältigt. Das Prinzip dieser Methode liegt darin, dass in jedem Zyklus während der *Annealing*-Phase durch Einlagerung und Anregung eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR-Green) mittels Lasers ein Lichtsignal produziert wird. Die entstehende Farbintensität wird gemessen und korreliert direkt mit der Menge der cDNA. Damit kann eine Aussage über die quantitative Expression einer bestimmten Ziel-mRNA getroffen werden. Um die Expression zwischen verschiedenen Probanden vergleichen zu können, wird die Expression des Zielgens mit der einer endogenen Kontrolle der gleichen Probe ins Verhältnis gesetzt. Diese sollte in allen untersuchten Proben gleichermaßen exprimiert sein, weshalb Gene, die unabhängig von Stoffwechsellage und Zustand des Organismus exprimiert werden, besonders geeignet sind. In dieser Arbeit wurde Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) als endogene Kontrolle (*Housekeeping-Gene*) genutzt. HPRT ist entscheidend an der Wiederverwertung von Purinen beteiligt, liegt selbst nur in geringen Kopiezahlen vor und ist daher besonders für hochsensible RT-PCRs geeignet, bei denen auch das Zielgen nur in geringer Kopiezahl vorliegt.

2.4.2.1 RNA-Aufreinigung und cDNA-Synthese

Die mRNA wurde aus dem peripheren Gesamtblut der Patienten mithilfe von zwei alternativen Verfahren isoliert. Ein Großteil der in dieser Arbeit analysierten Proben wurden vom Institut für Pharmakologie des Universitätsklinikums Göttingen mithilfe des PAXgene Blood RNA Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufbereitet und zur Verfügung gestellt. Alternativ wurde die RNA mithilfe des Quick-RNA MiniPrepTM Kits (Zymo Research, Irvine, CA, USA) im Institut für Zelluläre und Molekulare Immunologie Göttingen isoliert. Dafür wurden die Zellsuspensionen aufgetaut und für 8 min bei 500 G (*G force*) zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Zellpellet mit 400 µl RNA-Lyse-Puffer resuspendiert. Nach Zentrifugation (1 min, 10.000 G) und Überführung des Überstandes durch einen Spin-AwayTM Filter in ein Sammelröhrchen wurde erneut zentrifugiert (1 min, 10.000 G) und die Säule anschließend verworfen. Das Filtrat wurde mit 400 µl Ethanol (95 %) 1 : 1 gemischt, durch eine Zymo-SpinTM IICG-Säule in ein Sammelröhrchen überführt und für 30 Sekunden (sec) bei 10.000 G zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, 400 µl RNA Prep-Puffer wurden auf die Säule gegeben und für 30 sec zentrifugiert. Dann wurde die Säule zunächst mit 700 µl Waschpuf-

fer für 30 sec und daraufhin mit 400 µl Waschpuffer für 2 min erneut zentrifugiert. Nach einminütiger Inkubation mit 30 µl DNase/RNase-freiem Wasser und anschließender Zentrifugation in ein Reaktionsgefäß (30 sec, maximale Geschwindigkeit) wurde die Konzentration der gereinigten RNA im Nanodrop gemessen. Zur Kontrolle der RNA-Isolation wurde eine Gelelektrophorese mit 1 µg RNA auf einem 1 % Agarosegel mit Ethidiumbromid durchgeführt (120 mV, 230 mA, 20 min). Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurde das iScript™ cDNA Synthesis Kit von BIO-RAD (München, Deutschland) verwendet (Übersicht siehe Tabelle 17). Je Ansatz wurden 1 µg RNA, 4 µl 5x iScriptMix, 0,25 µl reverse Transkriptase und DEPC-Wasser in einem Gesamtvolumen von 20 µl in das Reaktionsgefäß pipettiert. Zunächst wurden die Proben für 5 min bei 25 °C im Thermomixer inkubiert, um die Anlagerung der Primer zu ermöglichen. Während der anschließenden Inkubation (30 min, 42 °C) wurde die reverse Transkriptase aktiviert und die cDNA synthetisiert. Durch fünfminütige Einwirkung von 85 °C wurde die Reaktion abgestoppt und die cDNA-Proben konnten eingefroren, bei -20 °C aufbewahrt und in einer PCR mit PfuS getestet werden (siehe Tabelle 18).

Tabelle 17: Übersicht über die cDNA-Synthese

cDNA-Synthese	Abschnitt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1 µg RNA	Annealing	25	5
4 µl iScriptMix	Elongation	42	30
0,25 µl reverse Transkriptase	Denaturation	85	5
Auffüllen auf 20 µl mit DEPC-Wasser			

Tabelle 18: Übersicht über PCR mit Pfu-S

PCR mit PfuS	Abschnitt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1 µl cDNA	Annealing	25	5
1 µl Primermix	Elongation (35x)	42	30
1 µl dNTPs (5mMol)	Denaturation	85	5
4 µl Puffer HF			
0,3 µl PfuS			
12,7 µl DEPC-Wasser			

2.4.2.2 Primer für die RT-qPCR

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion (Planegg, Deutschland) bezogen, „for“ steht für *forward* und „rev“ für *reverse*.

Gen	Sequenz
HPRT	for: 5' CCT GGC GTC GTG ATT AGT GA '3
	rev: 5' CGA GCA AGA CGT TCA GTC CT '3
IFNG	for: 5' CTG TTA CTG CCA GGA CCC AT '3
	rev: 5' TCT GTC ACT CTC CTC TTT CCA '3
GRZB	for: 5' GAT GCA GGG GAG ATC ATC GG '3
	rev: 5' CTC GTA TCA GGA AGC CAC CG '3
BCL2	for: 5' AGA TTG ATG GGA TCG TTG CCT '3
	rev: 5' AGT CTA CTT CCT CTG TGA TGT TGT '3
BAX	for: 5' GCC CTT TTG CTT CAG GGT TTC '3
	rev: 5' TGA GAC ACT CGC TCA GCT TC '3
CD28	for: 5' GCG TCT TTC AGT TCC CCT CA '3
	rev: 5' GCT TCA CCA AAA TCT TGT TTC CTG T '3
ICOS	for: 5' TTG AAC ACT GAA CGC GAG GA '3
	rev: 5' GCA GAA CCA TTG ATT TCT CCT GT '3
TGFβ1	for: 5' GGA AAT TGA GGG CTT TCG CC '3
	rev: 5' CCG GTA GTG AAC CCG TTG AT '3
CD3E	for: 5' GCA GGC AAA GGG GAC AAA AC '3
	rev: 5' GCA GTG TTC TCC AGA GGG TC '3
HMGB1	for: 5' AGA GCG GAG AGA GTG AGG AG '3
	rev: 5' ATG TTT AGT TAT TTT TCC TCA GCG A '3
PRF1	for: 5' AGT GAT GTG AGT GGT GGC TG '3
	rev: 5' GGC ACT TGG GCT CTG GAA T '3
PDCD1	for: 5' CAG TTC CAA ACC CTG GTG GT '3
	rev: 5' GGC TCC TAT TGT CCC TCG TG '3
CTLA4	for: 5' TAC CCA CCG CCA TAC TAC CT '3
	rev: 5' GGC ACG GTT CTG GAT CAA TTA '3

2.4.2.3 Durchführung der RT-qPCR

Zur Quantifizierung der cDNA mithilfe der RT-qPCR wurden zunächst pro Loch der PCR-Platte 11 µl destilliertes (dest.) Wasser, 12,5 µl SYBR-Green Powermix, 0,5 µl Primer-mix des Zielgens (10 µl Primer for + 10 µl Primer rev + 80 µl Aqua dest.) und 1 µl cDNA pipettiert. Die Platte wurde mit PCR-Verschlussfolie abgeklebt, kurz bei 405 G zentrifugiert und in das PCR-Gerät gelegt.

In der 7500 System SDS Software wurde das Probenvolumen auf 25 µl, die Phase der Vervielfältigung auf 50 Zyklen eingestellt und eine Dissoziationsphase hinzugefügt.

Zunächst wurde das Gerät für 2 min auf 50 °C vorgeheizt. Daraufhin wurde die Temperatur für 10 min auf 95 °C angehoben, um die DNA zu denaturieren und die DNA-Polymerase zu aktivieren. Durch anschließende Senkung der Temperatur auf 60 °C wurde die Anlagerung der Primer an die Einzelstränge sowie die Vervielfältigung durch die DNA-Polymerase ermöglicht. Der Vervielfältigungszyklus von Trennung der DNA-Doppelstränge, Anlagerung der Primer und Verlängerung der DNA-Stränge wurde 50-fach mit je 15 sec bei 95 °C und 1 min bei 60 °C wiederholt. Nach Abschluss der Vervielfältigungsphase schloss sich eine Dissoziationsphase an, bei der die Temperatur erneut auf 95 °C angehoben wurde. Durch Verfolgen des Fluoreszenzsignals, das nur in Doppelstrangkonfiguration entsteht, kann beobachtet werden, bei welcher Temperatur das Produkt diese auflöst. Da diese Temperatur von der Länge des Produktes und seinen Wasserstoffbrückenbindungen abhängt, kann festgestellt werden, ob bei der Amplifizierung nur das Zielprodukt oder mehrere unterschiedlich lange Produkte entstanden sind.

Tabelle 19: Ablauf der RT-qPCR

Abschnitt	Temperatur [°C]	Zeit
Geräteerwärmung	50	2 min
Trennung Doppelstränge, Aktivierung DNA-Polymerase	95	10 min
Denaturierung	95	15 sec
Annealing und Verlängerung	60	60 sec
Dissoziationsphase	95	15 sec
	60	60 sec
	95	15 sec

2.4.3 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie oder *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) ist eine Methode zur Analyse von Zellsuspensionen basierend auf der differentiellen Expression von Oberflächenproteinen der Zellen. Dabei fließen die Zellen einzeln in hoher Geschwindigkeit an verschiedenen Lasern vorbei und können, je nach Streuung des Lichts sowie der Emission eines Fluoreszenzsignals durch vorherige Markierung mit Antikörpern, verschiedenen Zellpopulationen zugeordnet werden. Die Vorwärtsstreuung (*Forward Scatter*) ist abhängig vom Volumen der Zelle und korreliert somit mit ihrer Größe. Die Seitwärtsstreuung (*Side Scatter*) wird durch die intrazellulär vorhandenen Granula und den Zellkern beeinflusst. Mittels Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern, die gegen zellspezifische Oberflächenproteine gerichtet sind, können die einzelnen Zellen noch gezielter unterschiedlichen Populationen zugeordnet werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch die verschiedenen Laser angeregt und ihre Emission wird mithilfe von Spiegeln abgeleitet, aufgefangen und in elektronische Signale umgewandelt. Das in dieser Studie verwendete FACS-Gerät besitzt 2 Laser, wodurch eine Detektion von maximal 6 verschiedenen Fluorochromen zeitgleich möglich war. Zur Analyse der 10 Antikörper wurden somit 2 Färbungen und Durchläufe je Patientenprobe untersucht.

2.4.3.1 Präparation der Proben

Die PBMCs wurden aus 14 ml venösem Heparinblut durch Zentrifugieren in Biocoll Separating Solution bei 4 °C isoliert. Das Pellet wurde einmalig mit PBS gewaschen und nach dem Zählen für 24 Stunden bei einer Konzentration von 1×10^6 PBMCs/ml in RPMI 1640 Medium und 10 % FCS inkubiert. Die Aufbewahrung fand in flüssigem Stickstoff in RPMI 1640 Medium mit 50 % FCS und 10 % DMSO statt.

Die gefrorenen Proben der peripheren mononukleären Zellen wurden für die Analyse im Wasserbad bei 37 °C vorsichtig aufgetaut und in 10 ml steriles PBS überführt. Durch Zentrifugieren (350 G, 7 min, 4 °C) gelangten die Zellen als Pellet an den Boden des Gefäßes und der Überstand konnte mit einer Pipette verworfen werden. Die in FACS-Puffer resuspendierten Zellen wurden unter dem Mikroskop ausgezählt, um die Zellzahlen der verschiedenen Proben auf 1 Millionen normieren zu können. Hierzu wurden die Zellen in vier Großquadranten der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und die Summe durch vier geteilt, um den Mittelwert pro Eckquadrat (entspricht 0,1 μ l) zu erhalten. Um die Zellzahl pro ml zu errechnen, musste der gemittelte Zählwert mit dem Kammerfaktor 10^4 und der Verdünnung (1 : 100) verrechnet werden:

$$[\text{gezählte Zellen}] \times 10^4 (\text{Kammerfaktor}) \times 100 (\text{Verdünnung}) = \text{Zellzahl/ml}$$

Um die Zellen möglichst spezifisch in einzelne Populationen zu unterteilen, wurden 10 verschiedene fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet (CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD56, CD69, CD154 und *human leukocyte antigen - antigen D related* (HLA-DR)).

Pro Färbung wurden 1 Millionen Zellen (bei weniger Zellen wurde die Zellsuspension gleichmäßig aufgeteilt) mit 2 µl der jeweiligen Antikörper inkubiert (20 min, 4° C). Durch Waschen mit FACS-Puffer, Zentrifugation (405 G, 5 min, RT) und Abgießen des Überstandes wurden die ungebundenen Antikörper entfernt und die Proben konnten in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und mittels Durchflusszytometer analysiert werden. Zur Messung der Proben wurde ein BD FACS Canto II verwendet und die Daten wurden mit der FlowJo Software ausgewertet.

Die vom Durchflusszytometer analysierten Zellen erscheinen als Punkte sortiert nach den Parametern der X- und Y-Achse im Diagramm. Durch sogenannte *Gates* können einzelne Populationen ausgewählt und in Subdiagrammen detaillierter auf die Expression weiterer Antikörper hin untersucht werden.

2.4.4 Immunhistochemische Analysen

Die Immunhistochemie ist eine Methode, mit deren Hilfe ausgewählte Antigene in Gewebeschnitten durch spezifische Anfärbung mittels Antikörpern sichtbar gemacht werden können. Hilfreich ist diese Methode, um beispielsweise Zellen innerhalb eines Zellverbandes zu identifizieren, welche die antikörperspezifischen Antigensequenzen (Epitope) exprimieren. In dieser Arbeit wurde eine indirekte immunhistochemische Analyse (Avidin-Biotin-Komplex-Methode) mit den Zielantigenen CD4, CD8 und Zytokeratin AE 1/3 (CK AE 1/3) durchgeführt. CD4 wird hauptsächlich von T-Helferzellen auf ihrer Oberflächen exprimiert, CD8 hingegen von zytotoxischen T-Lymphozyten. CK AE 1/3 wird spezifisch von Epithelzellen gebildet und ist somit gut geeignet, um das Plattenepithelkarzinom in den Schnitten vom umliegenden Bindegewebe zu unterscheiden (Khan et al. 2014). Diese Färbung diente als Orientierungshilfe in den Schnitten, um Tumorgrenzen abschätzen zu können und zu bestimmen ob die T-Lymphozyten im Tumorparenchym oder dem umliegenden Stroma liegen.

Bei der Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) wird die starke Affinität von Avidin zu Biotin genutzt, wie zuvor beim ELISA beschrieben (siehe S. 32). Zunächst wird das Zielepitop (CD4, CD8, CK AE 1/3) mithilfe eines unkonjugierten Primärantikörpers markiert. In einem zweiten Schritt bindet ein biotinylierter Sekundärantikörper an den Primärantikörper. Daraufhin wird das an Avidin gekoppelte Enzym Peroxidase zugegeben, sodass dieses mit den biotinylierten Sekundärantikörpern assoziiert. Die Visualisierung findet im letzten Schritt durch Hinzugabe des Chromogens 3-3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) sowie Wasserstoffperoxid statt. Durch die Oxidation des Substrats findet eine farbliche Umwandlung (ins Bräunliche) statt. Der Ablauf ist in Abb. 5 schematisch dargestellt.

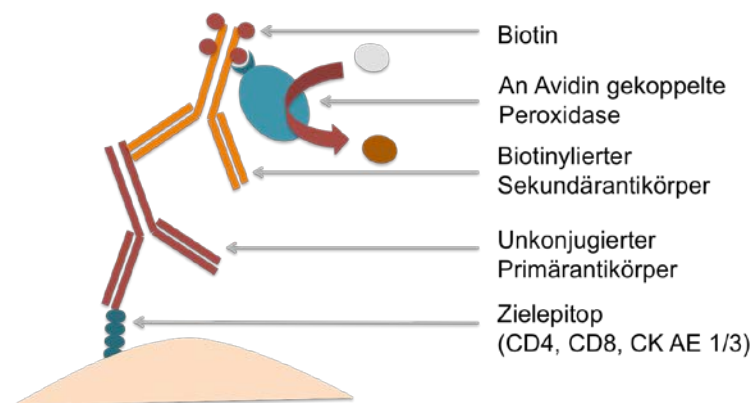


Abbildung 5: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Färbung

2.4.4.1 Schnittanfertigung

Zur Herstellung der Schnitte wurden die in Paraformaldehyd fixierten, in Paraffin gebetteten Gewebelöcke über Nacht im Kühlschrank gelagert, damit sie sich präziser schneiden ließen. Mithilfe des Mikrotoms wurden die gekühlten Blöcke 2 µm dick geschnitten. Die Schnitte wurden mit der glatten Seite nach unten in ein kaltes Wasserbad überführt, damit sie sich entfalten konnten. Anschließend wurden die Schnitte mit einem Objektträger aufgenommen und in ein heißes Wasserbad (48 °C) überführt, wodurch die Paraffinschnitte sich streckten. Beim langsamen Herausziehen des Objektträgers legten sie sich dadurch flach an diesen an. Die Objektträger wurden beschriftet und über Nacht zum Trocknen bei 37 °C im Wärmeschrank gelagert.

2.4.4.2 Färbeprotokoll

Vor der immunhistochemischen Färbung wurden die Paraffinschnitte entparaffiniert. Sie wurden über Nacht im Brutschrank bei 60 °C gelagert, damit das Paraffin anschmelzen konnte. Am folgenden Tag wurden die Schnitte zunächst für jeweils 10 min in vier verschiedene Gefäße mit Xylol gestellt, um das Paraffin von den Schnitten zu lösen. Daraufhin wurden die Schnitte jeweils für 5 min in einem 1 : 1 Xylol-Isopropanol-Gemisch inkubiert und durchliefen anschließend eine absteigende Alkoholreihe (2 x 100 % Alkohol, je 1 x 90 %, 70 %, und 50 % Alkohol), bevor sie in einer Plastikkuvette dreimalig mit bidestilliertem Wasser gespült wurden. Im darauffolgenden Schritt wurde die Küvette mit den darin enthaltenen Schnitten insgesamt fünffach abwechselnd mit Citratpuffer (CD8- und CK AE 1/3-Färbung) oder EDTA-Lösung (CD4-Färbung) und bidestilliertem Wasser aufgefüllt und jeweils für 3 min bei maximaler Temperatur in der Mikrowelle aufgeköcht. Zum Abkühlen wurde die Küvette mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt und dreimalig gespült. Daraufhin wurden die Schnitte mit 3 % H₂O₂ in PBS (45 ml PBS, 5 ml 30 % H₂O₂) inkubiert (20 min, 4 °C) und fünffach mit PBS gespült. Im nächsten Behandlungsschritt wurden die Objektträger für 20 min mit 10 % FCS (1 ml FCS auf 9 ml PBS) und anschließend mit 80 µl des 1 : 50 (bei CD4 1 : 100) in 10 % PBS-FCS-Lösung verdünnten ersten Antikörpers über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der CD8-Antikörper wurde für 2 Nächte inkubiert, da die Farbentwicklung hier zunächst sehr schwach war. Am zweiten Tag der Färbung (bzw. dritten Tag bei CD8) wurden die Schnitte dreifach mit PBS gewaschen und mit 100 µl des 1 : 200 in 10 % PBS-FCS-Lösung verdünnten zweiten biotinylierten Antikörper inkubiert (1 Std, RT). Danach wurden die Objektträger erneut dreimalig mit PBS gewaschen und mit Avidin-Peroxidaselösung (1 : 1000) inkubiert (1 Std, RT). Ein weiterer dreifacher Waschschrift mit PBS schloss sich an, bevor die Schnitte unter mikroskopische Kontrolle mit DAB und H₂O₂ gefärbt wurden. Bei ausreichender Farbentwicklung wurde die Reaktion durch Spülen mit bidestilliertem Wasser beendet.

Zuletzt wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Eosin zur Kontrastverstärkung durchgeführt. Dafür wurden die Schnitte für 35 sec in eine Meyer's Hämalaun-Lösung (1 : 2 mit bidestilliertem Wasser verdünnt) gehalten, danach zweimal in bidestilliertes Wasser und dreimal in HCl-Ethanol-Lösung getaucht. Im letzten Schritt wurden die Schnitte für 10 min unter laufendem Leitungswasser gebläut.

Zur Fixierung wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholkonzentrationsreihe (je 5 min in 50 %, 70 %, 90 %, 2 x 100 % Alkohol) geführt, für 5 min in Xylol-Alkohol-Lösung und zweimal 5 min in reiner Xylollösung inkubiert und zuletzt mit Eindeckmedium (Eukitt) und einem Deckplättchen gedeckelt.

Die Färbungen wurden mit Unterstützung der medizinisch-technischen Assistenten der Abteilung für Neuropathologie des Universitätsklinikums Göttingen durchgeführt.

2.4.4.3 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die T-Lymphozyten-Infiltration der Tumorgrenzen wurde durch semiquantitative Einschätzung der Dichte an CD4⁺- beziehungsweise CD8⁺-T-Zellen beurteilt. Aufgrund der fehlenden oder minimal ausgeprägten Infiltration des Tumors selbst, wurde die T-Zelldichte des peritumoralen Stromas evaluiert. Dieses wurde auf Basis der Zytokeratinfärbung konsekutiver Schnitte ermittelt (siehe Abb. 39a, S. 76). Dabei wurden Bildausschnitte ohne oder mit nur vereinzelt T-Lymphozyten als 0 bewertet, eine moderate Anzahl an angefärbten Zellen mit 1, gehäuft vorkommende T-Zellen mit 2 und sehr stark angefärbte Schnitte mit 3 (siehe Abb. 40 und 41, S. 77 und 78, respektive). Pro Schnitt wurden 3 stichprobenartig ausgewählte Ausschnitte bei 200-facher Vergrößerung bewertet. Alle Ausschnitte wurden unabhängig und verblindet von drei Untersuchern bewertet, bei Heterogenität wurden die Bewertungen gemittelt.

2.5 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung wurde mit der GraphPad Prism Software durchgeführt. Für die Untersuchung der ELISA-, RT-qPCR- und Immunhistochemie-Ergebnisse wurde der Mann-Whitney-U-Tests verwendet. Die FACS-Untersuchung wurde mithilfe des t-Tests analysiert und die Stärke der Korrelation zwischen dem CD4- und CD8-Score der immunhistochemisch gefärbten Tumorschnitte wurde mit dem Spearman-R-Koeffizienten untersucht.

P-Werte $\geq 0,05$ wurde als nicht signifikant (n.s.) eingestuft. Signifikante Unterschiede wurden mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) und **** ($p < 0,0001$) markiert.

2.6 Diagnostische Tests

Um die beiden Patientenkohorten mithilfe der diagnostischen Tests unterteilen zu können, wurden *receiver operating characteristic*(ROC)-Kurven der FACS-Analysen angefertigt. Mit ihrer Hilfe konnte der jeweils optimale *Cutoff*-Wert festgelegt werden, der als Trennwert zwischen den Gruppen dient. Dieser soll die meisten Patienten der jeweils richtigen Gruppe zuordnen und kann gewichtet werden, um entweder eine möglichst hohe Sensitivität (SEN) oder Spezifität (SPE) zu erreichen, auf Kosten der jeweils anderen Größe (siehe Abb. 6).

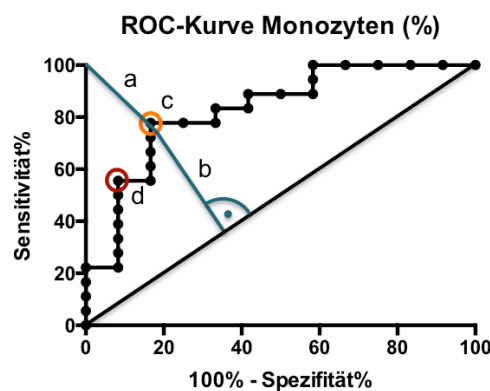


Abbildung 6: Beispiel für eine ROC-Kurve (hier: prozentualer Anteil an Monozyten im Blut). Der optimale *Cutoff*-Wert (c) kann über den kürzesten Abstand zwischen dem Graphen und der linken oberen Ecke der Abbildung (a) oder über die längste Senkrechte zwischen dem Graphen und der Diagonalen (b) ermittelt werden. Dieser Punkt (c) auf der Funktion entspricht dem Punkt mit dem höchsten Youden-Index, der auch mathematisch errechnet werden kann: $\text{Youden-Index} = \text{Sensitivität} + \text{Spezifität} - 1$. Im dargestellten Beispiel entspricht der Youden-Index an Punkt c einer Sensitivität von 77,78 % und einer Spezifität von 90,91 % und kann einem *Cutoff*-Wert von 55,58 % Monozyten zugeordnet werden. Demzufolge teilt der Test die meisten Patienten korrekt ein, wenn die Grenze bei 55,58 % Monozyten gelegt wird. Wenn man die Spezifität stärker gewichtet, würde Punkt (d) einen geeigneteren *Cutoff*-Wert ergeben, mit der Folge, dass die Sensitivität sinkt.

3 Ergebnisse

Die Therapie von Kopf-Hals-Tumoren geht mit teils schweren Nebenwirkungen und einer damit verbundenen Einschränkung der Lebensqualität einher. Dem gegenüber steht jedoch ein Überlebensvorteil (Wolff et al. 2011), der möglicherweise ebenso wie die Nebenwirkungen durch den patientenindividuellen immunmodulierten Therapieeffekt zustande kommen könnte. Aus diesem Grund könnten Biomarker, die es erlauben die akute Organtoxizität von Patienten vorherzusagen, eventuell dafür genutzt werden das Behandlungsschema individuell an das jeweilige Nebenwirkungsprofil des Patienten anzupassen.

Auf der Suche nach prädiktiven immunologischen Biomarkern wurden im Rahmen dieser Arbeit Plasma, mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut und cDNA aus dem Vollblut sowie Tumormaterial von Kopf-Hals-Tumor-Patienten untersucht. Die Entnahmezeitpunkte der jeweiligen Proben sind in Abb. 7 dargestellt:

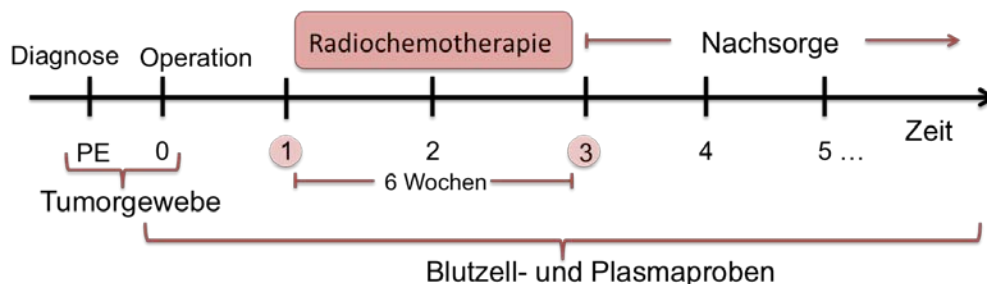


Abbildung 7: Zeitstrahl der Probenentnahme. Zur histologischen Untersuchung wurde entweder die zur Diagnosestellung benötigte Probeexzision (PE) oder der zum Zeitpunkt 0 bei der Operation exzidierte Tumor verwendet. Der Zeitpunkt 1 markiert den Beginn, Zeitpunkt 2 die Mitte und Zeitpunkt 3 das Ende der RCT mit einer Laufzeit von 6 Wochen. Vom Zeitpunkt 0 bis zum Ende der Nachsorge wurden Blutentnahmen durchgeführt.

In Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurden die Zeitpunkte 1 (vor RCT) und 3 (nach RCT) als besonders aussagekräftig bezüglich des Einflusses der Therapie auf immunologische Biomarker identifiziert. Daher wurden in dieser Arbeit die Blutproben dieser beiden Zeitpunkte untersucht und der Zeitpunkt 1 für die Ermittlung möglicher prädiktiver Marker verwendet.

3.1 Zytokinkonzentrationen im Plasma

Der Nachweis veränderter Zytokinkonzentrationen im Plasma ist eine weit verbreitete Methode, um entzündliche und andere immunologische Veränderungen bei Patienten zu identifizieren (Leng et al. 2008). Blutentnahmen gehören zu den standardisierten Voruntersuchungen der Patienten, die eine RCT erhalten und stellen somit keine zusätzliche Intervention dar. Die Isolation des Plasmas ist im klinischen Alltag einfach durchführbar, die Untersuchung mittels ELISA ist schnell und vergleichsweise kostengünstig und wäre somit gut als klinischer Test geeignet. Zytokine können systemisch wirken und einen modulierenden Einfluss auf die Immunogenität von Tumoren sowie die Antitumorantwort des Immunsystems ausüben. Kopf-Hals-Tumorzellen haben lokal einen starken Einfluss auf das Tumormikromilieu, indem sie immunsupprimierende Zytokine produzieren und entzündungshemmende Rezeptoren exprimieren (Chen et al. 1999; Curry et al. 2014).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Plasmakonzentration von $\text{IFN}\gamma$, IL-6, $\text{TNF}\alpha$ und IL-2 von bis zu 48 Kopf-Hals-Tumor-Patienten untersucht. $\text{IFN}\gamma$ übt eine proinflammatorische Wirkung aus und verstärkt die zytotoxische T-Zellantwort (Conti-Freitas et al. 2012). IL-2 fördert die T-Zell-Proliferation und weist dadurch ebenfalls einen starken Antitumoreffekt auf (Rapidis und Wolf 2009). IL-6 erfüllt viele Funktionen im Kontext von Tumorerkrankungen. Zum einen wirkt es wachstumsfördernd auf den Tumor, zum anderen scheint es die Immunantwort zu unterstützen, indem es die Aktivierung und Proliferation von Leukozyten verstärkt (Fisher et al. 2014). Auch $\text{TNF}\alpha$ ist ein Zytokin sowohl mit tumorfördernden als auch -hemmenden Eigenschaften. Es begünstigt die Tumorentstehung und -progression, stimuliert jedoch auch die Aktivierung von Immunzellen (Wajant 2009; Bertazza und Mocellin 2010).

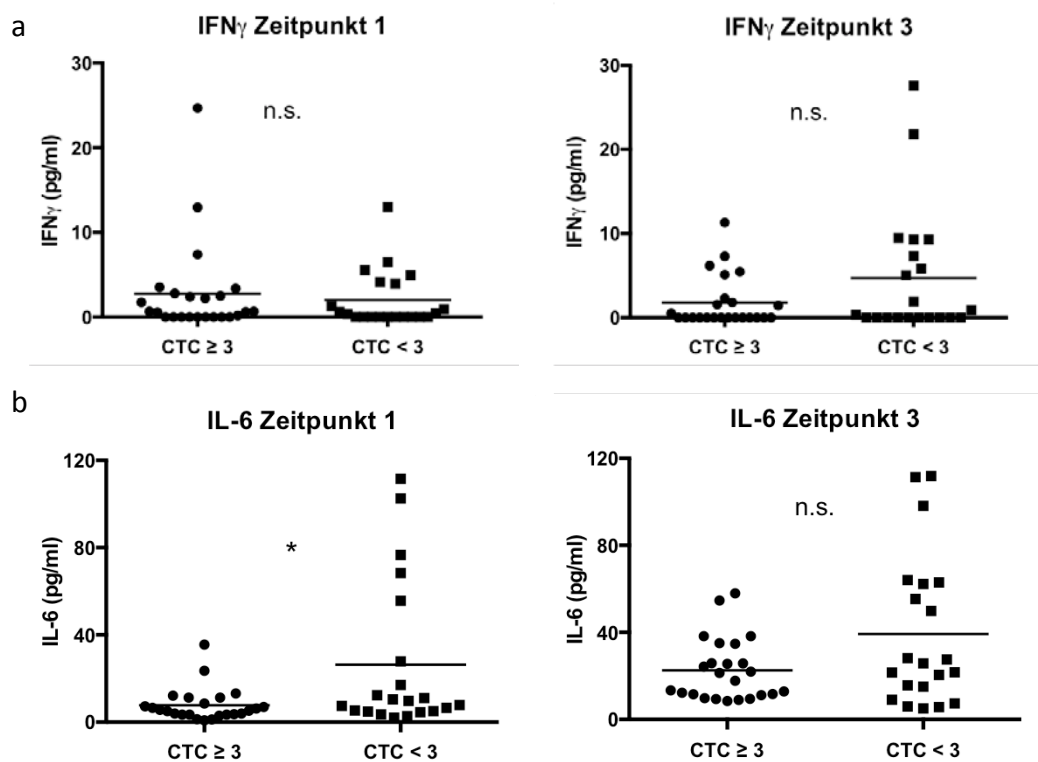


Abbildung 8: Analyse der Konzentrationen von IFN γ und IL-6 im Plasma mittels ELISA. Darstellung der Zytokinkonzentrationen von IFN γ (a) und IL-6 (b) im Plasma von Kopf-Hals-Tumor-Patienten zum Zeitpunkt 1 (vor RCT) und Zeitpunkt 3 (nach RCT). Die Patienten wurden entsprechend ihren Nebenwirkungen in zwei Kohorten, eine mit CTC ≥ 3 (starke NW) und eine mit CTC < 3 (schwache NW), eingeteilt. Die Ergebnisse wurden mithilfe des Mann-Whitney-Tests analysiert. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0,05$) gekennzeichnet. P-Werte $\geq 0,05$ wurden als nicht signifikant (n.s.) bewertet. Jeder abgebildete Punkt repräsentiert den Messwert eines Patienten ($n = 45$), die horizontale Linie markiert den Mittelwert. Modifiziert nach Beschel et al. 2016, S. 65909.

Die Messungen der Plasmakonzentrationen von IFN γ wiesen insgesamt viele nicht detektierbare Werte und eine starke Streuung auf. In beiden Gruppen lag die Konzentration zum Zeitpunkt 1 im Mittel bei 2,4 pg/ml (Abb. 8a₁). In der Kohorte mit schwachen Nebenwirkungen stieg sie zum Zeitpunkt 3 nicht signifikant auf einen Mittelwert von ca. 4,7 pg/ml. In der Kohorte mit hohem CTC-Score verringerte sich der Konzentration nicht signifikant auf durchschnittlich 1,8 pg/ml. Auch zum Zeitpunkt 3 wies die IFN γ -Konzentration keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen auf (Abb. 8a₃).

Die Konzentration von IL-6 lag zum Zeitpunkt 1 bei der Patientengruppe mit CTC < 3 signifikant höher (MW: 26 pg/ml) als in der Kohorte mit starken Nebenwirkungen (MW: 7 pg/ml) ($p = 0,021$, Abb. 8b₁). Zum Zeitpunkt 3 lagen die Messwerte beider Gruppen auf höherem Niveau, der Unterschied zwischen den Kohorten war jedoch statistisch nicht signifikant. Der Mittelwert der Patientengruppe mit HGAOT lag nach

der Therapie bei 23 pg/ml, während er bei Patienten ohne HGAOT bei 40 pg/ml lag (Abb. 8b₃). Der Anstieg der IL-6-Konzentration erwies sich in beiden Kohorten als signifikant (CTC \geq 3 ($p < 0,0001$), CTC $<$ 3 ($p = 0,047$); Daten nicht dargestellt).

Die prätherapeutischen IFN γ -Konzentrationen im Patientenplasma der beiden Kohorten zeigten einen hohen Anteil an nicht detektierbaren Werten und ein sehr ähnliches Konzentrationsniveau. Die IL-6-Konzentrationen wiesen vor Therapiebeginn eine signifikante Differenz zwischen den Patientengruppen auf, die Werte waren jedoch stark gestreut.

Die Messwerte der ELISA-Untersuchung von TNF α und IL-2 lagen auf dem Niveau der Negativkontrolle, weshalb sie nicht graphisch dargestellt wurden.

3.2 Genexpression im Gesamtblut

Die Untersuchung der Genexpression ist ein gängiges Verfahren, um die Eigenschaften der kerntragenden Blutzellen und ihre Bedeutung im Kontext von Erkrankungen besser verstehen zu können (Livak und Schmittgen 2001). Ihre Ergebnisse könnten potentiell bereits als Biomarker dienen, wenn einzelne Tumorzellen vom Immunsystem erkannt werden, weit bevor die Tumoren klinisch nachweisbar sind (Baine et al. 2013). Die Probengewinnung ist durch eine Blutentnahme und die Isolation der zu untersuchenden Zellen im klinischen Alltag leicht umsetzbar und die Durchführung einer PCR-Analyse ist eine schnelle und sensitive Methode für die Quantifizierung der Genexpression (Garibyan und Avashia 2013).

In der Vorbereitung der Proben wurde RNA aus dem Gesamtblut von 24 Patienten isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die cDNA im Rahmen dieser Arbeit durch relative Quantifizierung mithilfe der RT-qPCR im Hinblick auf verschiedene entzündungsassoziierte Moleküle untersucht.

Die gemessenen *cycle threshold*(ct)-Werte wurden nach der $\Delta\Delta$ ct-Methode wie folgt in normierte *relative quantification*(RQ)-Werte umgerechnet, um Werte der beiden Analysegruppen miteinander vergleichen zu können:

$$\Delta\text{ct} = \text{ct}_{\text{Zielgen}} - \text{ct}_{\text{endogene Kontrolle}}$$

$$\text{RQ} = 2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$$

$$\Delta\Delta\text{ct} = \Delta\text{ct} - \text{Mittelwert}(\Delta\text{ct})$$

$$\text{RQ}_{\text{norm}} = \text{RQ} / \text{Mittelwert}(\text{RQ})$$

Die Normierung wurde dadurch erreicht, dass der Mittelwert beider Kohorten und beider Zeitpunkte eines untersuchten Gens (Patienten mit CTC-Score ≥ 3 und < 3 sowie Zeitpunkte 1 und 3) gleich 1 gesetzt wurde.

Zunächst wurde eine Kohorte von 13 Patienten bezüglich der Expression von 11 verschiedenen Genen untersucht. Nach Auswertung der Ergebnisse wurde eine Auswahl von 7 Genen in einer zweiten Kohorte von 11 weiteren Patienten getestet, um die in der ersten Analyse beobachteten Tendenzen entweder zu bestätigen oder zu verwerfen. Dadurch kommen die unterschiedlichen n-Zahlen in den folgenden Abbildungen zustande.

3.2.1 Expression von Zytokinen und zytotoxischen Molekülen

Als Kandidaten für proinflammatorische Zytokine wurden $IFN\gamma$ und $TGF\beta$ ausgewählt. $IFN\gamma$ wird insbesondere von NK-Zellen und $CD8^+$ -T-Zellen produziert (Schoenborn und Wilson 2007) und geht mit einer verstärkten zytotoxischen T-Zellantwort einher (Conti-Freitas et al. 2012). $TGF\beta$ wirkt antiproliferativ auf normale Epithelzellen und die frühe Onkogenese (Hill et al. 2009), unterdrückt jedoch auch die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen (Gorelik und Flavell 2002) sowie den Antitumoreffekt von T-Zellen, NK-Zellen, neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen (Bierie und Moses 2010) und fördert so die Tumorprogression. Weiterhin hat die Fähigkeit von T-Zellen, Effektormoleküle zu produzieren, einen starken Einfluss auf ihre Zytotoxizität. Granzym B ist ein wichtiger Effektor zytotoxischer T-Zellen, um fremde oder infizierte Zellen zu eliminieren (Rousaleva und Krepela 2010; Voskoboinik et al. 2015). Die genetische Expression von *Granzym B* und anderen zytotoxischen Molekülen scheint bei Kopf-Hals-Tumor-Patienten eingeschränkt zu sein (Bose et al. 2008).

Die Ergebnisse der qRT-PCR von $IFN\gamma$, $TGF\beta$ und *Granzym B* sind auf der folgenden Seite in Abb. 9 dargestellt:

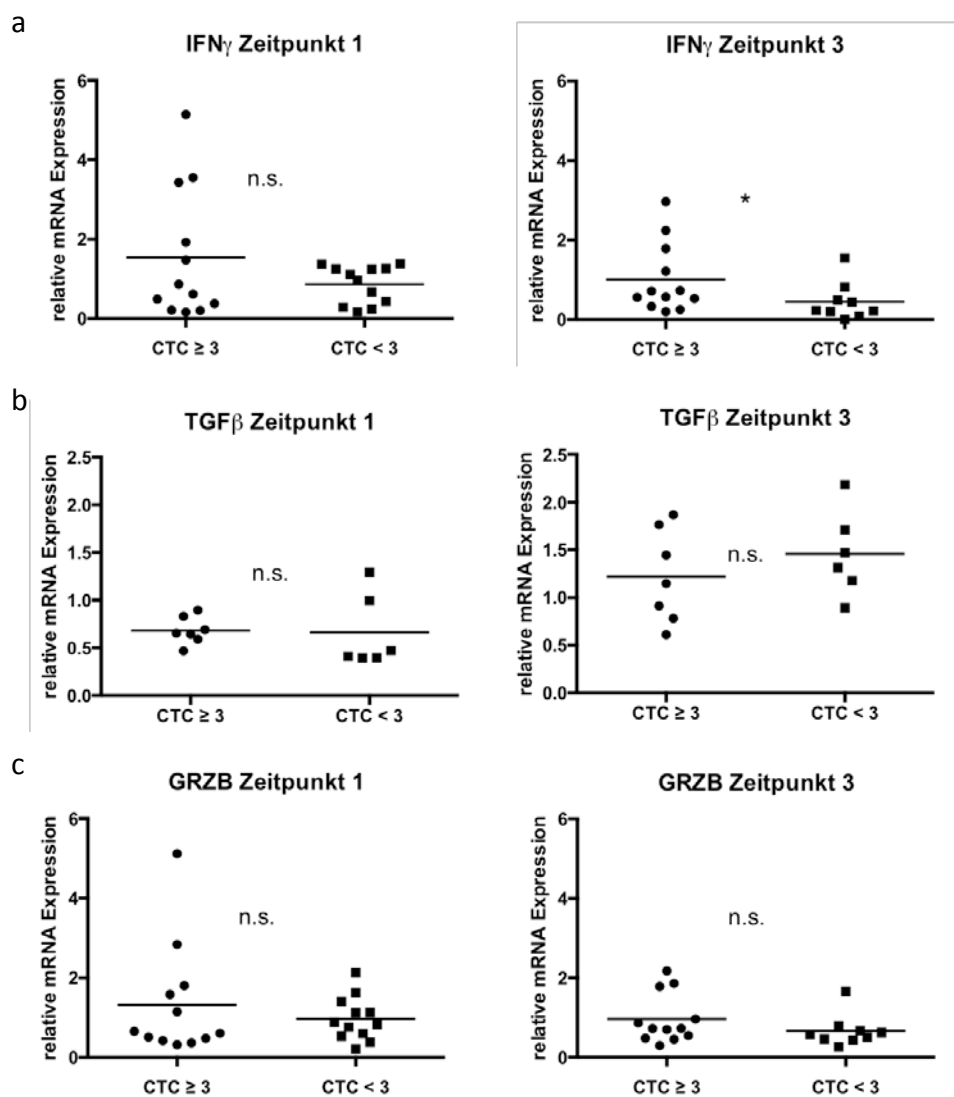


Abbildung 9: Analyse der Genexpression von *IFN γ* , *TGF β* und *Granzym B* im Gesamtblut mittels RT-qPCR. Darstellung der relativen mRNA-Expression von *IFN γ* , *TGF β* und *Granzym B* im Vollblut von Kopf-Hals-Tumor-Patienten zu Zeitpunkt 1 (vor RCT) und Zeitpunkt 3 (nach RCT). Die Patienten wurden entsprechend ihren Nebenwirkungen in zwei Kohorten, eine mit CTC \geq 3 (starke NW) und eine mit CTC < 3 (schwache NW), eingeteilt. Die RT-qPCR-Ergebnisse wurden mithilfe des Mann-Whitney-Tests analysiert. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0,05$) gekennzeichnet. P-Werte $\geq 0,05$ wurden als nicht signifikant (n.s.) bewertet. Jeder abgebildete Punkt repräsentiert den Messwert eines Patienten ($n_{a1} = 24$; $n_{a3} = 21$; $n_b = 13$, $n_{c1} = 24$; $n_{c3} = 21$), die horizontale Linie markiert den Mittelwert. Modifiziert nach Beschel et al. 2016, S. 65909.

Die relative Genexpression von *IFN γ* unterschied sich zum Zeitpunkt 1 nicht signifikant zwischen den Kohorten, lag jedoch in der Gruppe mit schwachen Nebenwirkungen marginal niedriger (MW: 0,9) als bei den Patienten mit starken Nebenwirkungen (MW: 1,5) (Abb. 9a₁). Zum Zeitpunkt 3 lag die relative Expression von *IFN γ* in beiden Kohorten auf statistisch nicht signifikant niedrigerem Niveau (siehe Abb. 14 a und b auf S. 57) und war in der Kohorte mit einem CTC \geq 3 signifikant höher (MW: 1) als in der Gruppe mit einem CTC < 3 (MW: 0,5) ($p = 0,048$, Abb. 9a₃). Die relative *TGF β* -Expression lag

zum Zeitpunkt 1 in beiden Kohorten auf gleichem Niveau (MW: 0,7) (Abb. 9b₁) und stieg in beiden Kohorten im Verlauf der Therapie signifikant an (siehe Abb. 14 a und b auf S. 57). Nach der RCT lag die relative Genexpression in der Kohorte mit hohem CTC-Score im Mittel bei 1,2 und in der Kohorte mit niedrigem CTC-Score bei ca. 1,4. Dieser Unterschied zeigte keine Signifikanz (Abb. 9b₃). Die relative Expression von *Granzym B* lag bei den Patienten mit HGAOT vor der RCT nicht signifikant höher als die der Patienten mit schwachen Nebenwirkungen (MW: 1,3 und 1, respektive) (Abb. 9c₁). Zum Zeitpunkt 3 verhielten sich die Gruppen auf etwas niedrigerem Niveau ähnlich zueinander (MW: 1 respektive 0,7) ($p \geq 0,05$, Abb. 9c₃). Weder zwischen den Kohorten noch zwischen den Zeitpunkten zeigte sich diesbezüglich ein signifikanter Unterschied. Keines der drei Gene *IFN γ* , *TGF β* und *GRZB* wies vor Beginn der Therapie eine signifikante Differenz zwischen den beiden untersuchten Kohorten auf.

3.2.2 Genexpression von CD3

CD3 ist ein Protein, das auf der Oberfläche von T-Zellen vorkommt. Diese sind maßgeblich an der Immunantwort gegen Tumorzellen beteiligt. Die Genexpression von *CD3* sollte daher mit der Zahl an T-Zellen im Blut korrelieren, auch wenn mittels der RT-qPCR nicht unterschieden werden kann, ob die gemessene Genexpression auf lebende oder bereits apoptotische Zellen zurückzuführen ist.

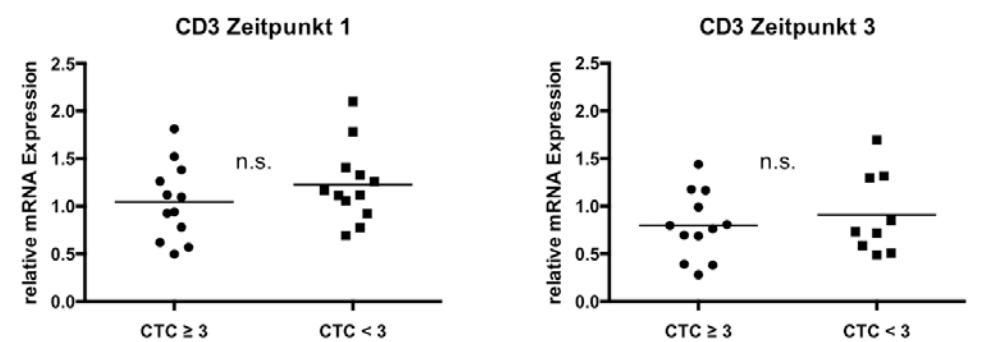


Abbildung 10: Analyse der Genexpression von CD3 im Gesamtblut mittels RT-qPCR. Darstellung der relativen mRNA-Expression von *CD3* im Vollblut von Kopf-Hals-Tumor-Patienten zu Zeitpunkt 1 (vor RCT) und Zeitpunkt 3 (nach RCT). Die Patienten wurden entsprechend ihren Nebenwirkungen in zwei Kohorten, eine mit CTC ≥ 3 (starke NW) und eine mit CTC < 3 (schwache NW), eingeteilt. Die RT-qPCR-Ergebnisse wurden mithilfe des Mann-Whitney-Tests analysiert. P-Werte $\geq 0,05$ wurden als nicht signifikant (n.s.) bewertet. Jeder abgebildete Punkt repräsentiert den Messwert eines Patienten ($n_1 = 24$; $n_3 = 21$), die horizontale Linie markiert den Mittelwert.

Die relative Genexpression von *CD3* lag in der Kohorte mit starken Nebenwirkungen zum Zeitpunkt 1 minimal tiefer als in der Gruppe mit schwachen Nebenwirkungen (MW: 1 und 1,2, respektive) ($p \geq 0,05$, Abb. 10₁). Nach der RCT lag das Niveau in beiden Gruppe leicht tiefer (MW_{CTC \geq 3}: 0,8, MW_{CTC $<$ 3}: 0,9) ($p \geq 0,05$, Abb. 10₃).

Die beiden Kohorten wiesen zu beiden Zeitpunkten keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Expression von *CD3* auf.

3.2.3 Expression von kostimulatorischen und -inhibitorischen Molekülen

Da sich die Kohorten hinsichtlich des T-Zell-Markers *CD3* nicht unterschieden, könnte angesichts des vermuteten Zusammenhangs zwischen T-Lymphozyten und Nebenwirkungen der Therapie ein unterschiedlicher Grad an T-Zell-Aktivierung oder -Effektivität vermutet werden. Tumoren können einen hohen Anteil an erschöpften infiltrierenden T-Zellen aufweisen, die verstärkt inhibitorische Marker exprimieren (Jiang Y et al. 2015). Aus diesem Grund wurde die Expression der kostimulatorischen Moleküle *CD28* und *ICOS* sowie der koinhibitorischen Moleküle *PDCD1* und *CTLA-4*, im Vollblut der Patienten untersucht. Die Ergebnisse dieser Analyse sind auf der folgenden Seite in Abb. 11 dargestellt:

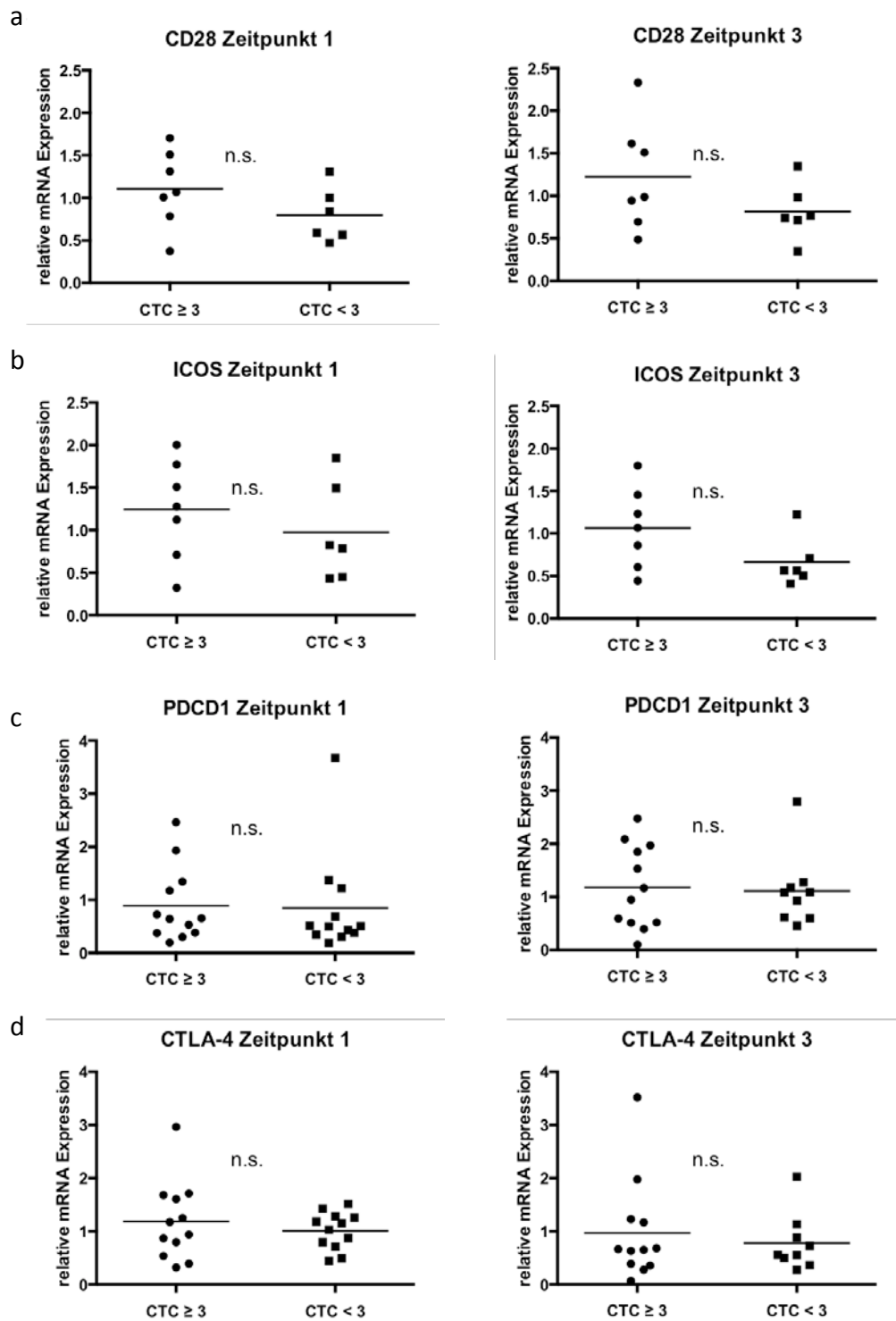


Abbildung 11: Analyse der Genexpression kostimulatorischer und koinhibitorischer Moleküle im Gesamtblut mittels RT-qPCR. Darstellung der relativen mRNA-Expression von *CD28*, *ICOS*, *PDCD1* und *CTLA-4* im Gesamtblut von Kopf-Hals-Tumor-Patienten zu Zeitpunkt 1 (vor RCT) und Zeitpunkt 3 (nach RCT). Die Patienten wurden entsprechend ihren Nebenwirkungen in zwei Kohorten, eine mit $CTC \geq 3$ (starke NW) und eine mit $CTC < 3$ (schwache NW), eingeteilt. Die RT-qPCR-Ergebnisse wurden mithilfe des Mann-Whitney-Tests analysiert. P-Werte $\geq 0,05$ wurden als nicht signifikant (n.s.) bewertet. Jeder abgebildete Punkt repräsentiert den Messwert eines Patienten ($n_a = 13$; $n_b = 13$; $n_{c1} = 24$; $n_{c3} = 21$; $n_{d1} = 24$; $n_{d3} = 21$), die horizontale Linie markiert den Mittelwert. Modifiziert nach Beschel et al. 2016, S. 65909.

Die relative *CD28*-Expression lag zu beiden Zeitpunkten in der Kohorte mit starken Therapienebenwirkungen auf etwas höherem Niveau als in der Kohorte mit schwächeren Nebenwirkungen. Zum Zeitpunkt 1 lag die durchschnittliche Genexpression bei 1,1 im Gegensatz zu 0,8 und zum Zeitpunkt 3 bei 1,2 im Vergleich zu 0,8 ($p \geq 0,05$, Abb. 11a). Auch die relative Expression des kostimulatorischen Gens *ICOS* erwies sich vor und nach der RCT in der Gruppe mit hohem CTC-Score (MW_{11b1} : 1,2 und MW_{11b3} : 1,1) als etwas höher als in der Gruppe mit niedrigerem CTC-Score (MW_{11b1} : 1 und MW_{11b3} : 0,7) ($p \geq 0,05$, Abb. 11b). Die *PDCD1*-Expression lag zum Zeitpunkt 1 in beiden Kohorten bei einem Mittelwert von 0,9 und stieg im Laufe der Therapie in beiden Gruppen nicht signifikant auf einen durchschnittlichen Wert von 1,1 an ($p \geq 0,05$, Abb. 11c). Die relative Expression des koinhibitorischen Gens *CTLA-4* lag zu beiden Zeitpunkten in der Kohorte mit starken Nebenwirkungen marginal höher und nahm im Verlauf der Therapie in beiden Gruppen minimal ab. Vor der RCT lag die Expression von *CTLA-4* bei 1,2 im Vergleich zu 1 und nach der RCT bei 1 im Vergleich zu 0,8 ($p \geq 0,05$, Abb. 11d).

Die Genexpression der hier untersuchten kostimulatorischen und koinhibitorischen Gene *CD28*, *ICOS*, *PDCD1* und *CTLA-4* unterschied sich weder zwischen den beiden Patientenkollektiven noch den Zeitpunkten signifikant.

3.2.4 Relative Genexpression von Apoptosemarkern

Bei Kopf-Hals-Tumor-Patienten kann eine verstärkte spontane Apoptose zirkulierender T-Zellen beobachtet werden, welche bei gesunden Kontrollpersonen nicht stattfindet (Hoffmann et al. 2002). Auch die Anfälligkeit für oder die Resistenz gegen Apoptose hat einen Einfluss auf die Effektivität der an der Antitumorantwort und Entstehung von Gewebeschäden beteiligten Immunzellen (Falschlehner et al. 2009; Frey 2015). Das antiapoptotische Protein BCL-2 und das proapoptotische Protein BAX könnten somit Aufschluss über die Apoptoseneigung der Immunzellen geben (Hoffmann et al. 2002).

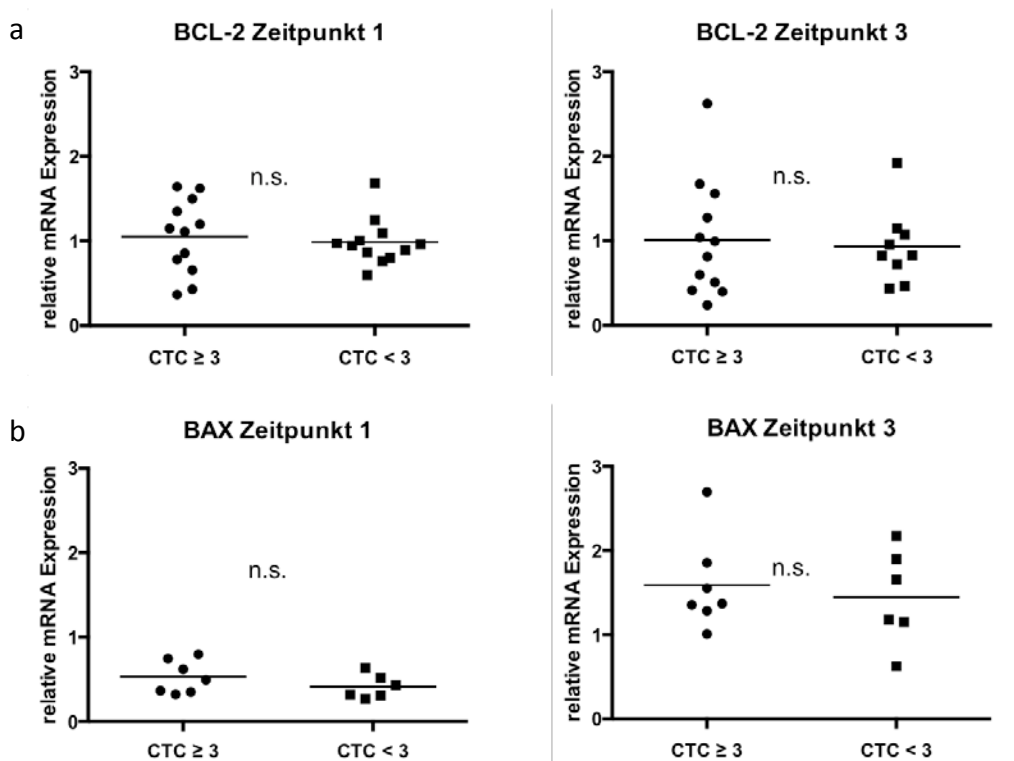


Abbildung 12: Analyse der Genexpression von Apoptosemarkern im Gesamtblut mittels RT-qPCR. Darstellung der relativen mRNA-Expression von *BCL-2* und *BAX* im Vollblut von Kopf-Hals-Tumor-Patienten zu Zeitpunkt 1 (vor RCT) und Zeitpunkt 3 (nach RCT). Die Patienten wurden entsprechend ihren Nebenwirkungen in zwei Kohorten, eine mit $CTC \geq 3$ (starke NW) und eine mit $CTC < 3$ (schwache NW), eingeteilt. Die RT-qPCR-Ergebnisse wurden mithilfe des Mann-Whitney-Tests analysiert. P-Werte $\geq 0,05$ wurden als nicht signifikant (n.s.) bewertet. Jeder abgebildete Punkt repräsentiert den Messwert eines Patienten ($n_{a1} = 24$; $n_{a3} = 21$; $n_b = 13$), die horizontale Linie markiert den Mittelwert. Modifiziert nach Beschel et al. 2016, S. 65909.

Die relative Genexpression von *BCL-2* lag in beiden Patientengruppen zu beiden Zeitpunkten bei einem Durchschnittswert von 1 (Abb. 12a). Die relative *BAX*-Expression zeigte zwischen den Kohorten ebenfalls keine Differenz, verzeichnete aber in beiden Gruppen über den Verlauf der Therapie einen signifikanten Anstieg (siehe Abb. 14a

und b, S. 57) von einem relativen Expressionsniveau von ca. 0,5 (Abb. 12a) auf 1,5 (Abb. 12b). Weder das Expressionsniveau von *BCL-2* noch das von *BAX* unterschied sich zwischen den beiden Kohorten vor Beginn der Therapie signifikant.

3.3 Genexpression und Plasmakonzentration von HMGB1

High-mobility-group-box-1 (HMGB1) ist ein in allen eukaryotischen Zellen vorkommendes und von sterbenden Zellen freigesetztes, Chromatin-assoziiertes Kernprotein, das extrazellulär als DAMP, also als Signalmolekül, in Entzündungsprozessen wirkt (Sims et al. 2010). Intrazellulär wirkt es stabilisierend auf die DNA und ist an ihrer Reparatur beteiligt (Liu et al. 2010). Im Serum von Kopf-Hals-Tumor-Patienten wurde eine signifikant erhöhte Konzentrationen von HMGB1 gefunden, wo es vermutlich die immun-supprimierende Funktion regulatorischer T-Zellen verstärkt (Wild et al. 2012).

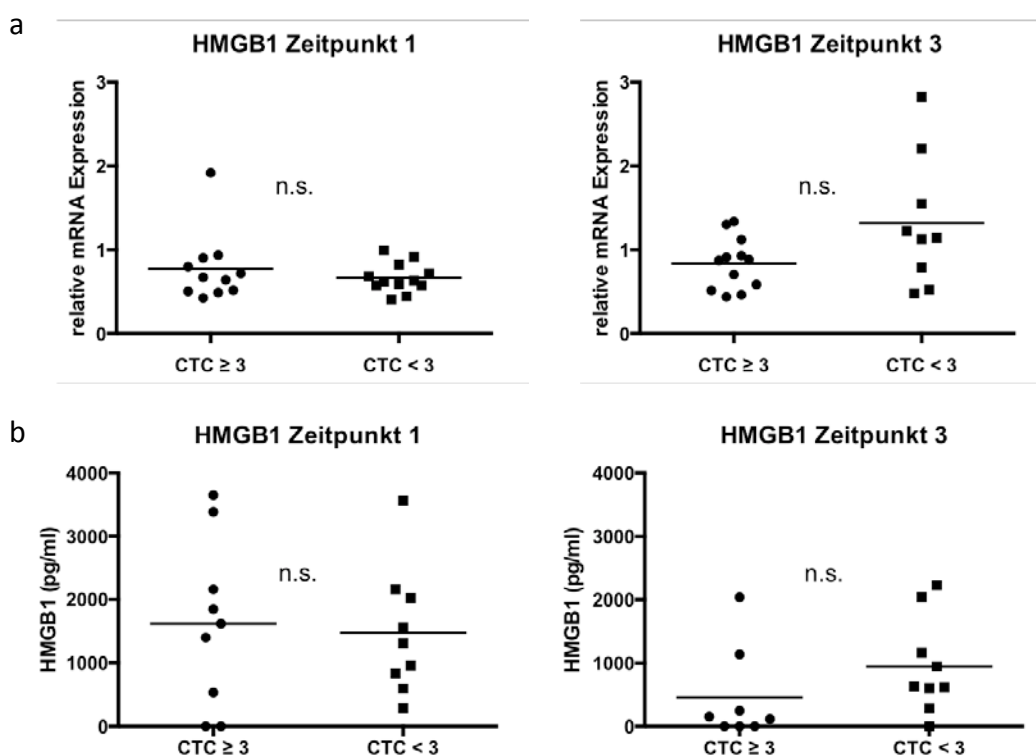


Abbildung 13: Analyse von HMGB1 bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren. Darstellung der relativen mRNA-Expression von *HMGB1* aus dem Vollblut (a) sowie der Konzentration von HMGB1 im Plasma (b) von Kopf-Hals-Tumor-Patienten zu Zeitpunkt 1 (vor RCT) und Zeitpunkt 3 (nach RCT). Die Patienten wurden entsprechend ihren Nebenwirkungen in zwei Kohorten, eine mit CTC ≥ 3 (starke NW) und eine mit CTC < 3 (schwache NW), eingeteilt. Die RT-qPCR- und ELISA-Ergebnisse wurden mithilfe des Mann-Whitney-Tests analysiert. P-Werte $\geq 0,05$ wurden als nicht signifikant (n.s.) bewertet. Jeder abgebildete Punkt repräsentiert den Messwert eines Patienten ($n_{a1} = 24$; $n_{a3} = 21$; $n_{b1} = 18$; $n_{b3} = 17$), die horizontale Linie markiert den Mittelwert. Modifiziert nach Beschel et al. 2016, S. 65909.

Die relative Genexpression von *HMGB1* lag vor der Therapie in beiden Kohorten im Mittel bei 0,7. Während sie in der Kohorte mit hohem CTC-Score nach der RCT auf gleichem Niveau blieb, stieg der Mittelwert der Kohorte mit schwachen Nebenwirkungen auf ca. 1,3 an ($p \geq 0,05$, Abb. 13a). Die Expression unterschied sich zu keinem Zeitpunkt signifikant zwischen den Kollektiven, nahm jedoch in der Patientengruppe mit geringem CTC-Score über den Verlauf der Therapie hinweg signifikant zu (siehe Abb. 14b, S. 57).

Die Zytokinkonzentration von HMGB1 lag zum Zeitpunkt 1 bei starker Streuung in beiden Kohorten im Mittel bei ca. 1500 pg/ml und nahm im Laufe der Therapie nicht signifikant ab. Die Verringerung der Zytokinkonzentration war in der Kohorte mit hohem CTC-Score stärker (MW_{13b3} : ca. 460 pg/ml, $p \geq 0,05$, Daten nicht dargestellt) als in der Gruppe mit niedrigem CTC-Score (MW_{13b3} : ca. 950 pg/ml, $p \geq 0,05$, Daten nicht dargestellt) (Abb. 13b).

Weder die Genexpression noch die Plasmakonzentration der prätherapeutischen Untersuchung von HMGB1 zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Kohorten.

3.4 Genexpressionsänderungen während des Therapieverlaufs

In der folgenden Abbildung 14 sind die untersuchten RT-qPCR-Ergebnisse im zeitlichen Verlauf dargestellt.

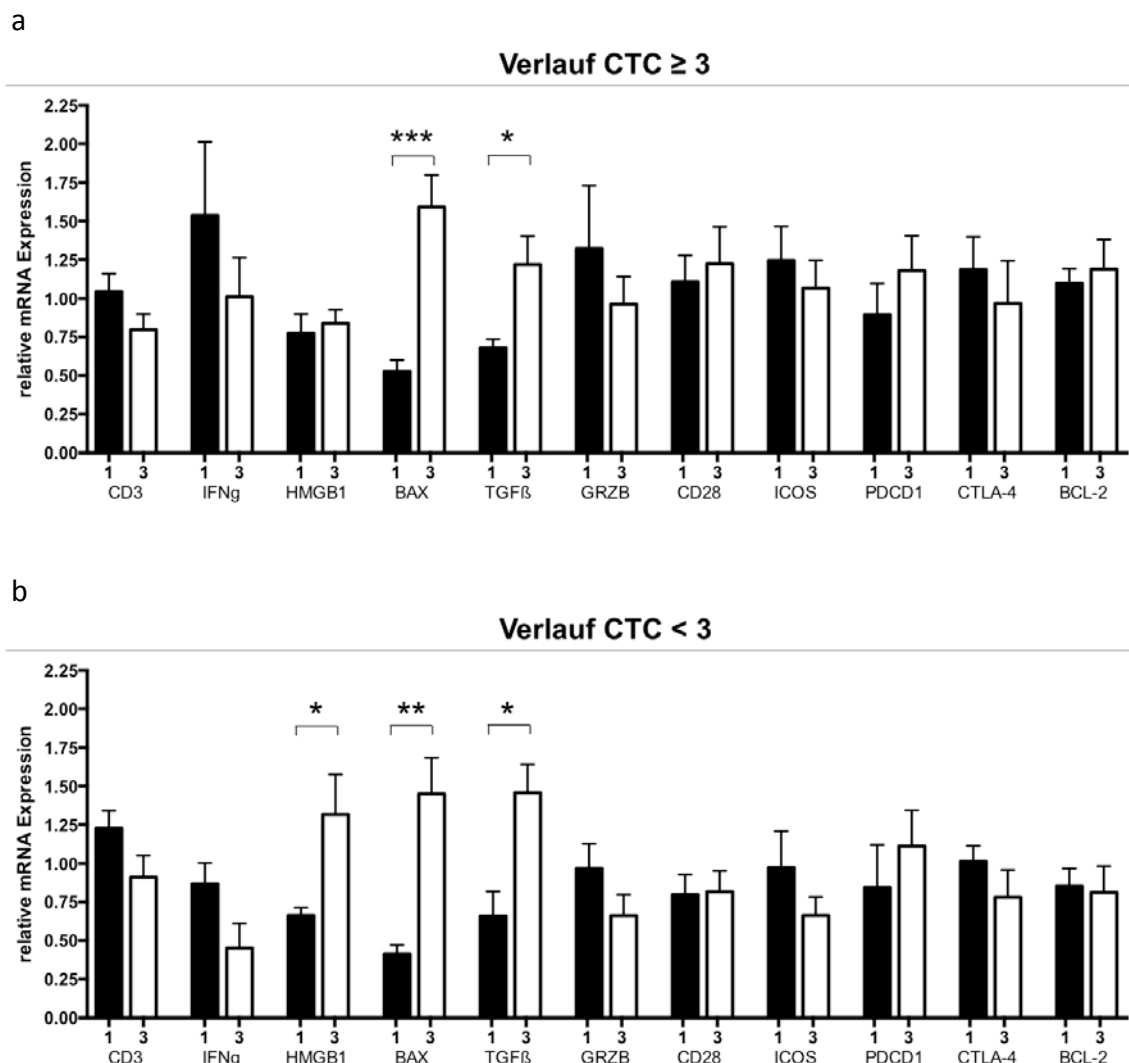


Abbildung 14: Übersicht über die Veränderungen der Genexpression im Verlauf der Therapie. Darstellung der relativen mRNA-Genexpression der in dieser Arbeit untersuchten Moleküle (*CD3*, *IFN γ* , *HMGB1*, *BAX*, *TGF β* , *Granzym B*, *CD28*, *ICOS*, *PDCD1*, *CTLA-4* und *BCL-2*) aus dem Vollblut von Kopf-Hals-Tumor-Patienten zu den Zeitpunkten 1 und 3. (a) Genexpression in der Kohorte mit einem CTC ≥ 3 (starke NW). (b) Genexpression der Patienten mit einem CTC < 3 (schwache NW). Die RT-qPCR-Ergebnisse wurden mithilfe des Mann-Whitney-Tests analysiert und im Balkendiagramm als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) und *** ($p < 0,001$) dargestellt. Die n-Zahlen variieren zwischen 13 und 24.

Der Großteil der untersuchten Gene wies im Verlauf der Therapie keine signifikant veränderte Expressionrate auf. In der Patientenkohorte mit hohem CTC-Score stieg die Expression von *BAX* im Mittel von 0,5 auf 1,6 ($p = 0,0006$) und der MW von *TGF β* er-

höhte sich signifikant von 0,7 auf 1,2 ($p = 0,0003$) (Abb. 14a). In der Gruppe mit schwachen Nebenwirkungen nahm die Expression von *HMGB1* von 0,7 signifikant auf 1,3 zu ($p = 0,028$), *BAX* stieg von 0,4 auf mehr als das Dreifache (1,4; $p = 0,004$) und die Expression von *TGF β* verdoppelte sich im Mittel von 0,7 auf 1,4 ($p = 0,015$) (Abb. 14b).

3.5 FACS-Analyse der PBMCs

Da die bis dato durchgeführten Untersuchungen der Zytokinkonzentration im Plasma und der Genexpression verschiedener immunologisch relevanter Moleküle im Vollblut keine vielversprechenden prädiktiven Marker ergeben hatten, wurde daraufhin die zelluläre Zusammensetzung der PBMCs untersucht. Die Probengewinnung war wie in den vorhergehenden Ansätzen durch eine Blutentnahme möglich. Für die Analyse wird ein FACS-Gerät benötigt, weshalb diese Methode etwas aufwendiger ist als die vorher durchgeführten.

Die Zusammensetzung der PBMCs reflektiert den Status des Immunsystems und wird im klinischen Alltag oft zur Diagnose von entzündlichen Erkrankungen und Infektionen herangezogen (Soloski und Chrest 2013). Sie besitzt eine hohe Aussagekraft hinsichtlich des Immunstatus und der Kompetenz, körperfremde und entartete Zellen und Proteine zu eliminieren.

Die Häufigkeitsverteilung der PBMCs scheint bei einigen Tumorentitäten eine Aussage über die Prognose der Patienten zu erlauben. Im Bezug auf das metastasierte Melanom beispielsweise scheinen hohe absolute Zahlen von Monozyten und neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut einen prognostisch ungünstigen Effekt zu haben (Schmidt et al. 2005). Beim metastasierten Nasopharynxkarzinom deutet ein hohes Verhältnis von Lymphozyten zu Monozyten auf eine günstige Prognose hin (Jiang R et al. 2015). Bei den Kopf-Hals-Tumoren insgesamt wäre es daher ebenfalls denkbar, einen prädiktiven Hinweis durch Bestimmung der Häufigkeitsverteilung der PBMCs zu erhalten. Dabei ist es sinnvoll, sowohl die relative Häufigkeitsverteilung als auch die absolute Zahl einzelner Zellpopulationen zu untersuchen, um patientenindividuelle Besonderheiten wie Leukozytosen oder Leukozytopenien berücksichtigen zu können. Für diese Untersuchung wurden die eingefrorenen Proben aufgetaut, mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern inkubiert, im FACS Canto II Analysegeräte untersucht und die erhobenen Daten mit FlowJo ausgewertet.

3.5.1 Exemplarische Darstellung der *Gating*-Strategie

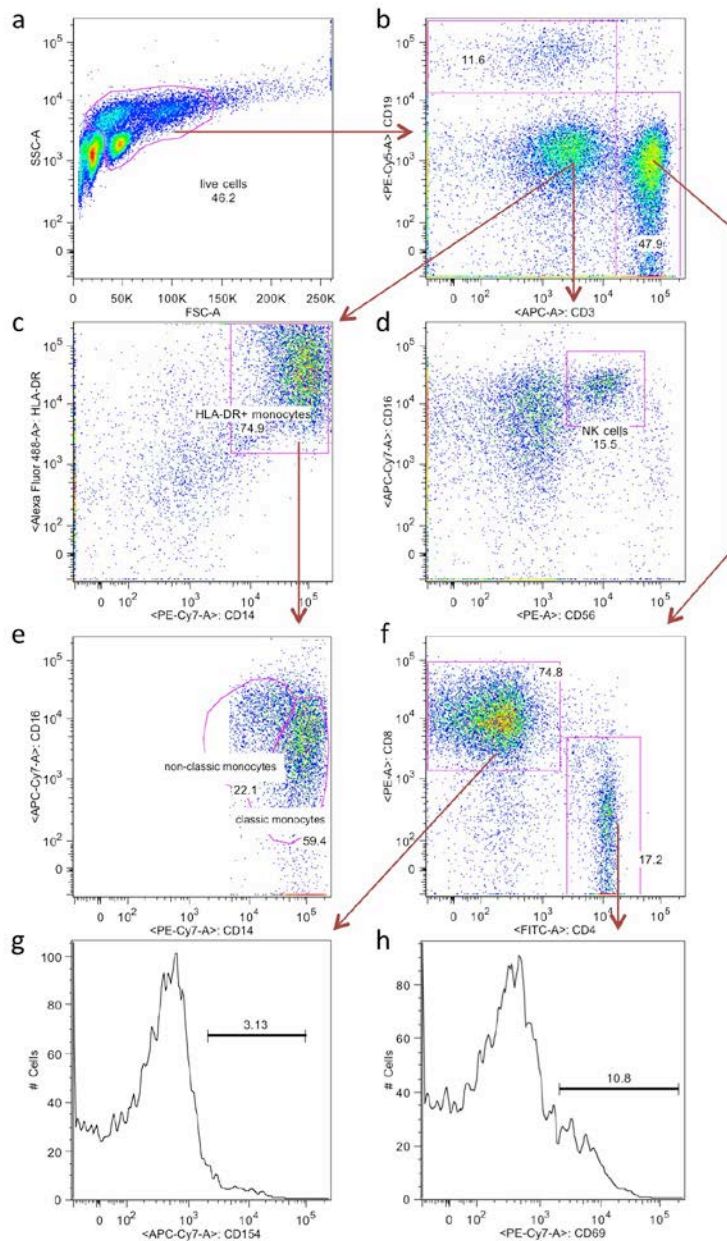
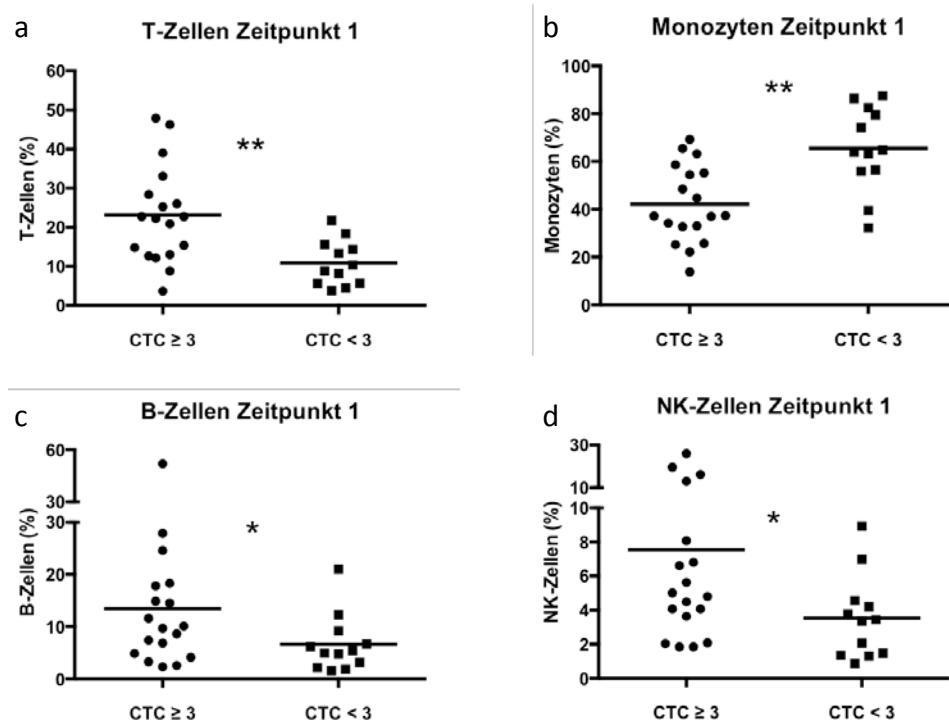


Abbildung 15: Gating-Strategie am Beispiel von Patient 286 zum Zeitpunkt 1. Die analysierten Zellen wurde entsprechend ihrer Größe (FSC-A) und ihrer Granularität (SSC-A) in einem zweidimensionalen Graphen aufgetragen, um so lebende Zellen (*live cells*) von apoptotischen unterscheiden zu können (a). Die lebenden Zellen wurden anschließend auf Basis ihrer Expression von CD3 und CD19 differenziert, um T-Zellen (CD3⁺, rechts), B-Zellen (CD19⁺, oben) und andere Zellen (links unten) von einander zu trennen (b). Die Gruppe der Nicht-T-nicht-B-Zellen wurde mithilfe der Monozytenmarker CD14 und HLA-DR (c) sowie mit den NK-Zellmarkern CD56 und CD16 (d) untersucht. Die Monozyten wurden über CD14 und CD16 in klassische (CD14^{high}CD16⁻) und nicht-klassische (CD14⁺CD16⁺) Monozyten unterteilt (e). T-Zellen wurden entsprechend ihrer Expression von CD4 und CD8 in die beiden wichtigsten Subpopulationen untergliedert (f). Der Aktivierungsgrad der T-Zellen wurde im Histogramm mithilfe der Marker CD154 (g) und CD69 (h) bestimmt.

3.5.2 Analyse der relativen Zellzahlen zum Zeitpunkt 1

Zunächst wurden die prozentualen Anteile verschiedener Zellpopulationen aller lebendigen Zellen von 29 Patienten entsprechend Abb. 15 analysiert und verglichen.

3.5.2.1 Prozentualer Anteil einzelner Zellpopulationen



Der prozentuale Anteil an T-Zellen lag in der Kohorte mit HGAOT prätherapeutisch mit durchschnittlich 23 % signifikant höher als in der Kohorte ohne HGAOT (MW: 11 %) (p = 0,003, Abb. 16a). Bei der Analyse der Monozyten war das Verhältnis umgekehrt und die Patienten mit schwachen Nebenwirkungen wiesen einen signifikant höheren Anteil an Monozyten auf (durchschnittlich ca. 66 % bei schwachen im Gegensatz zu 42 % bei starken Nebenwirkungen) (p = 0,002, Abb. 16b). Die B-Zell-Population war in der CTC \geq 3-Kohorte mit einem Mittelwert von 13 % signifikant größer als in der CTC $<$ 3-Kohorte (MW: 7 %) (p = 0,043, Abb. 16c). Auch der prozentuale Anteil von NK-Zellen lag in der Kohorte mit starken Nebenwirkungen mit durchschnittlich 8 % ungefähr doppelt so

hoch wie in der Kohorte mit schwachen Nebenwirkungen (MW: ca. 4 %) ($p = 0,034$, Abb. 16d).

3.5.2.2 Verhältnisse zwischen einzelnen Zellpopulationen

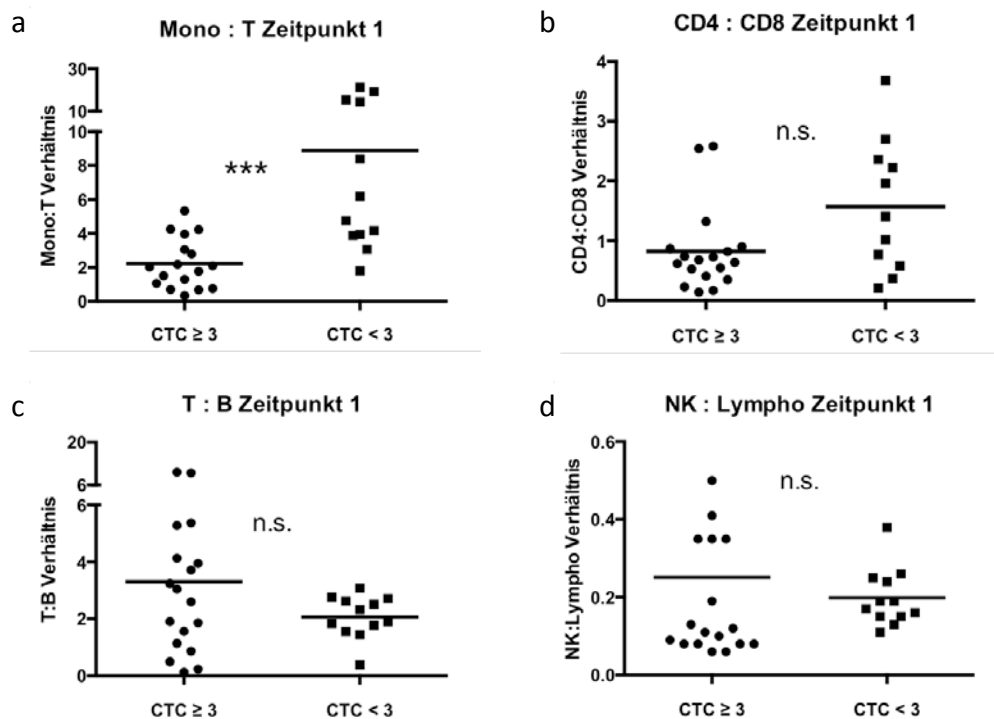


Abbildung 17: Relative Verhältnisse von Zellpopulationen zum Zeitpunkt 1. Darstellung der Verhältnisse einzelner Subpopulationen von PBMCs von Kopf-Hals-Tumor-Patienten zum Zeitpunkt 1 (vor RCT), ermittelt auf Basis der FACS-Analyse und -Gating-Strategie von Abb. 15. Die Patienten wurden entsprechend ihren Nebenwirkungen in zwei Kohorten, eine mit CTC ≥ 3 (starke NW) und eine mit CTC < 3 (schwache NW), eingeteilt. Die FACS-Ergebnisse wurden mithilfe des t-Tests analysiert. Signifikante Unterschiede sind mit *** ($p < 0,001$) dargestellt. P-Werte $\geq 0,05$ wurden als nicht signifikant (n.s.) bewertet. Jeder abgebildete Punkt repräsentiert den Messwert eines Patienten ($n = 30$), die horizontale Linie markiert den Mittelwert. Modifiziert nach Beschel et al. 2016, S. 65906.

Das Mono : T-Zell-Verhältnis lag in der Patientengruppe mit schwachen NW im Mittel mehr als dreifach so hoch wie in der Gruppe mit starken Nebenwirkungen (9 respektive 2) und unterschied sich somit als einzige Zell-Ratio signifikant zwischen den Kohorten ($p = 0,0003$, Abb. 17a). Die Relation zwischen T- und B-Zellen, CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen sowie zwischen NK-Zellen und Lymphozyten zeigte keine signifikanten Unterschiede. Patienten aus der Kohorte mit hohem CTC-Score wiesen vor der Therapie im Mittel etwas höhere CD8⁺- als CD4⁺-T-Zellzahlen auf und hatten somit ein CD4:CD8-Verhältnis von ca. 0,8. In der Kohorte von Patienten mit schwachen NW hingegen waren die CD4⁺-Zellen häufiger, sodass der CD4⁺:CD8⁺-Quotient bei ca. 1,6 lag (Abb. 17b). Beide Patientengruppen wiesen höhere relative T- im Vergleich zu B-Zellwerten auf. Im Vergleich zur Kohorte mit schwachen Nebenwirkungen lag diese T-Zell-Dominanz bei

Patienten mit starken Nebenwirkungen im Mittel nicht signifikant stärker vor, worauf der höhere T:B-Zell-Quotient von ca. 3,3 im Vergleich zu 2 hinweist (Abb. 17c). Das Verhältnis von NK-Zellen zu Lymphozyten unterschied sich nicht signifikant und lag in beiden Kohorten im Durchschnitt bei ca. 0,2 (Abb. 17d).

3.5.2.3 Oberflächenexpression von Aktivierungsmarkern auf T-Zellen

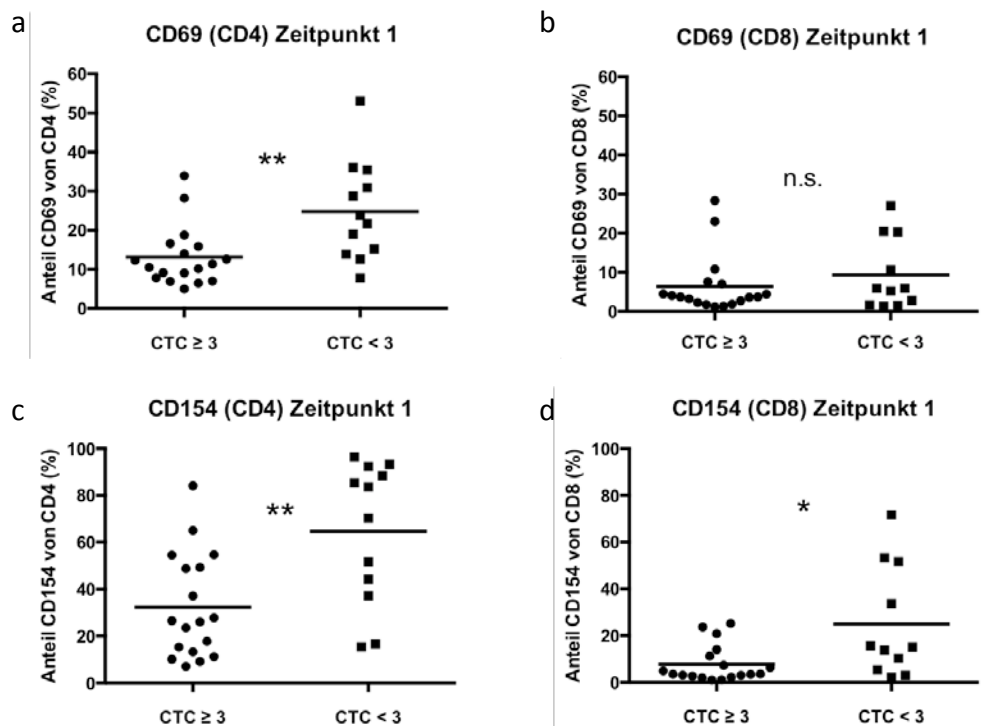


Abbildung 18: FACS-Analyse der Aktivierungsmarker von T-Zellen zum Zeitpunkt 1. Darstellung der prozentualen Anteile aktivierter ($CD69^+$ bzw. $CD154^+$) $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen unter den T-Zellsubpopulationen von Kopf-Hals-Tumor-Patienten zum Zeitpunkt 1 (vor RCT), ermittelt auf Basis der FACS-Analyse und -Gating-Strategie von Abb. 15. Die Patienten wurden entsprechend ihren Nebenwirkungen in zwei Kohorten, eine mit $CTC \geq 3$ (starke NW) und eine mit $CTC < 3$ (schwache NW), eingeteilt. Die FACS-Ergebnisse wurden mithilfe des t-Tests analysiert. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0,05$) und ** ($p < 0,01$) dargestellt. P-Werte $\geq 0,05$ wurden als nicht signifikant (n.s.) bewertet. Jeder abgebildete Punkt repräsentiert den Messwert eines Patienten ($n = 30$), die horizontale Linie markiert den Mittelwert.

Sowohl CD69 als auch CD154 wurde von $CD4^+$ -T-Zellen signifikant stärker exprimiert als von $CD8^+$ -T-Zellen. Die $CD4^+$ -T-Zellen von Patienten mit niedrigem CTC-Score wiesen im Durchschnitt einen ca. doppelt so hohen Prozentsatz an $CD69^+$ -Zellen auf, als Patienten mit hohem CTC-Score (25 % respektive 13 %) ($p = 0,003$, Abb. 18a). Der Anteil an $CD69^+CD8^+$ -Zellen unterschied sich mit ca. 9 % ($CTC < 3$) und 6 % ($CTC \geq 3$) nicht signifikant (Abb. 18b) und lag in beiden Kohorten deutlich niedriger als der Anteil an $CD69^+CD4^+$ -Zellen ($MW_{CTC < 3}$: 25, $MW_{CTC \geq 3}$: 12). Der Anteil $CD154^+$ -Zellen war sowohl unter den $CD4^+$ - als auch unter den $CD8^+$ -Zellen in der Patientengruppe ohne HGAOT

signifikant größer als in der mit HGAOT. In der CD4⁺-Subpopulation war der Anteil der CD154⁺-Zellen bei niedrigerem CTC-Score mit 65 % im Mittel mehr als doppelt so groß wie bei hohem CTC-Score (MW: 32 %) ($p = 0,004$, Abb. 18c). Ein ähnliches Verhältnis bestand auch in der Analyse der CD154⁺CD8⁺-Zellen, lag hier jedoch auf niedrigerem Niveau (MW_{CTC < 3}: 25 % im Vergleich zu MW_{CTC ≥ 3}: 8 %) ($p = 0,024$, Abb. 18d).

Beide Aktivierungsmarker (CD69 und CD154) waren bei CD4⁺-T-Zellen in der Patientengruppe mit geringen Nebenwirkungen signifikant stärker ausgeprägt; bei den CD8⁺-T-Zellen war hier nur die CD154-Expression signifikant häufiger.

Zusammengefasst zeigte die FACS-Analyse, dass ein großer prozentualer Anteil an T-, B- und NK-Zellen, ein geringer Anteil an Monozyten (also auch ein geringer Mono : T-Quotient) und ein geringer Aktivierungsgrad der vorhandenen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen einen Hinweis auf die Entwicklung starker Nebenwirkungen (CTC ≥ 3) im Verlauf der Therapie gab. Die Zusammensetzung der PBMCs zu Beginn der RCT korrelierte mit der Entstehung der HGAOT bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren.

3.5.2.4 Relative Zellzahlen als prädiktive Biomarker

Um die mittels FACS bestimmten Werte als prädiktive Biomarker verwenden zu können, musste zunächst ihre Aussagekraft ermittelt werden. Dies kann mithilfe einer ROC-Kurve erreicht werden. Eine ROC-Kurve wird aus der Sensitivität und Spezifität verschiedener *Cutoff*-Werte gebildet und kann wie folgt dargestellt werden. Die Sensitivität wird auf der Ordinate aufgetragen und die Spezifität, dargestellt als „100 % - Spezifität“, auf der Abszisse. Die Kurve liefert einen Anhaltspunkt über die Aussagekraft des jeweiligen Biomarkers. Je näher sie an der linken oberen Ecke liegt (siehe Abb. 19 und folgende), also je weiter sie von der Diagonalen entfernt ist und je größer die AUC (*area under the curve*) ist, desto aussagekräftiger ist der Parameter. Die AUC liegt zwischen 0,5 (der Test ist so aussagekräftig wie der Zufall) und 1,0 (perfekter Test). Dabei kann eine Abstufung zur Bewertung der AUC als Kriterium für die Trennschärfe des Parameters angewandt werden (siehe Tab. 20):

Tabelle 20: Aussagekraft der AUC

AUC	Interpretation
0,9 bis 0,99	exzellenter Test
0,8 bis 0,89	guter Test
0,7 bis 0,79	mittelmäßiger Test
0,51 bis 0,69	schlechter Test

Quelle: (Diagnostic tests - University of Georgia)

Aus der ROC-Kurve kann der optimale *Cutoff*-Wert eines Parameters abgelesen werden, also der Wert, der die beiden Kohorten am besten von einander abgrenzt. Es handelt sich um den Punkt, welcher der linken oberen Ecke am nächsten liegt, also am weitesten von der Diagonalen entfernt ist. Alternativ kann er mithilfe des Youden-Index errechnet werden: $\text{Youden-Index} = \text{Sensitivität} + \text{Spezifität} - 1$. Der höchste errechnete Youden-Index markiert dabei den optimalen *Cutoff*-Wert. Dabei werden die Sensitivität und die Spezifität mathematisch gleich gewichtet. Falls jedoch aus medizinischer Sicht entweder der Sensitivität oder der Spezifität größere Bedeutung zugemessen werden soll, so kann der errechnete *Cutoff*-Wert dementsprechend angepasst werden.

In den im Folgenden aufgeführten Graphen (z.B. Abb. 20, S. 65) wurden teilweise zwei mögliche *Cutoff*-Werte ausgewählt und verglichen. Dabei handelt es sich zum einen um den errechneten Wert (orange markiert) und den Wert mit der nächst höheren Spezifität bei noch akzeptabler Sensitivität (rot markiert). Hierdurch wird die Anzahl an Patienten, die schwache Nebenwirkungen entwickeln und auch negativ getestet werden (Spezifität), angehoben. Auf diese Weise könnte erreicht werden, dass ein möglichst hoher Anteil dieser Patienten eine exazerbierte Therapie erhält. In Kauf genommen wird dadurch jedoch eine verringerte Sensitivität, wodurch eventuell mehr Patienten eine verstärkte Therapie erhalten würden, obwohl sie von der Konstitution her bereits eine starke Nebenwirkungstendenz aufweisen.

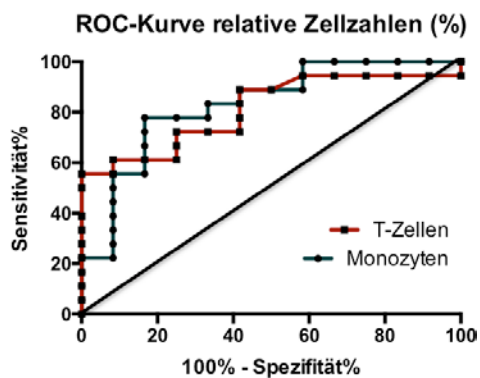


Abbildung 19: ROC-Kurven der relativen Anzahl von T-Zellen und Monozyten. Auf der X-Achse ist die Spezifität als „100 % - Spezifität“ aufgetragen, auf der Y-Achse die Sensitivität. Die Monozyten- und T-Zell-Werte zeigten sich als relativ gleich starke prädiktive Marker, wobei die Monozytenzahlen bei einer Spezifität zwischen 80 und 55 % sowie unter 40 % sensitiver waren.

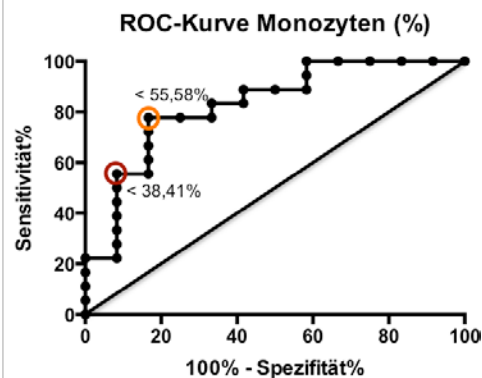


Abbildung 20: ROC-Kurve der relativen Anzahl an Monozyten. Als errechneter optimaler *Cutoff*-Wert ergab sich der orange-umkreiste Punkt (55,58 % Monozyten) mit einer Sensitivität von 77,78 % und einer Spezifität von 83,33 %. Bei stärkerer Gewichtung der Spezifität kam auch der dunkelrot-umkreiste Punkt (38,41 % Monozyten) als *Cutoff*-Wert infrage. In diesem Fall mit einer Sensitivität von 55,56 % und einer Spezifität von 91,67 %. Die AUC dieser Kurve lag bei 0,83 und der p-Wert bei 0,003.

Eine Vierfeldertafel dient zur übersichtlichen Darstellung der möglichen Ergebnisse eines Tests. Dafür wird der Zustand, in diesem Fall „CTC-Score ≥ 3 “ und „CTC-Score < 3 “, oben angegeben, die Testergebnisse „positiv“ oder „negativ“ werden links dargestellt. Die Sensitivität (SEN) errechnet sich aus der Anzahl richtig positiver Tests geteilt durch die Anzahl aller Patienten mit einem CTC-Score ≥ 3 . Die Spezifität ergibt sich aus dem Quotienten der Anzahl richtig negativer Tests und der Zahl von Patienten mit einem CTC-Score < 3 . Der positiv und negativ prädiktive Wert (PPV und NPV) eines Tests wird unter Einbeziehung der Prävalenz des Zustandes (PRE), in diesem Fall der akuten Organtoxizität mit einem CTC-Score ≥ 3 , berechnet (siehe Ende der Seite). Die Prävalenz der HGAOT lag in der untersuchten Kohorte bei 56,25 %.

$$\text{PPV: } \text{SEN} \times \text{PRE} / (\text{SEN} \times \text{PRE} + (1-\text{SPE}) \times (1-\text{PRE}))$$

$$\text{NPV: } \text{SPE} \times (1-\text{PRE}) / ((\text{SPE} \times (1-\text{PRE}) + (1-\text{SEN}) \times \text{PRE}))$$

		Zustand		
		CTC \geq 3	CTC < 3	
Test	Test positiv	richtig positiv	falsch positiv	Positiv prädiktiver Wert
	Test negativ	falsch negativ	richtig negativ	Negativ prädiktiver Wert
		Sensitivität	Spezifität	

Abbildung 21: Prinzip der Vierfeldertafel. Oben ist der tatsächliche Zustand dargestellt, also CTC-Score \geq 3 oder < 3 und links das jeweilige Testergebnis. Die Sensitivität errechnet sich, indem die Anzahl der richtig positiv getesteten Patienten durch alle Patienten mit einem Score \geq 3 geteilt wird. Die Spezifität errechnet sich, indem alle richtig negativen Testpersonen durch die Anzahl der Patienten mit einem Score < 3 geteilt werden.

Wie aus Abb. 19 hervorgeht (siehe S. 65), hatte die relative Monozytenzahl an den meisten Punkten den stärkeren Vorhersagewert für die Schwere der Nebenwirkungen als der Anteil der T-Zellen. Im Folgenden sind die entsprechenden Vierfeldertafeln der beiden *Cutoff*-Werte der Monozyten in Abb. 22 und 23 dargestellt.

Cutoff-Wert: 55,58 % Monozyten

		Zustand	
		+ 18	- 12
Test	+ 16	14	2
	- 14	4	10

Abbildung 22: Vierfeldertafel mit *Cutoff*-Wert 55,58 % Monozyten. Der Test galt als positiv, wenn weniger als 55,58 % der lebenden Zellen Monozyten waren. Die Sensitivität lag in diesem Fall bei 77,78 % und die Spezifität bei 83,33 %.

Cutoff-Wert: 38,41 % Monozyten

		Zustand	
		+ 18	- 12
Test	+ 11	10	1
	- 19	8	11

Abbildung 23: Vierfeldertafel mit *Cutoff*-Wert 38,41 % Monozyten. Dieser Test galt als positiv, wenn weniger als 38,41 % der lebenden Zellen Monozyten waren. Bei diesem *Cutoff*-Wert lag die Sensitivität bei 55,56 % und die Spezifität bei 91,67 %.

Bei Festlegen des *Cutoff*-Wertes auf 55,58 % Monozyten waren Sensitivität und Spezifität, mit 77,78 % respektive 83,33 %, relativ ausgeglichen (Abb. 22). Bei stärkerer Gewichtung der Spezifität (Abb. 23) stieg diese unter Inkaufnahme einer geringeren Sensitivität (55,56 %) auf 91,67 % an. Dadurch wurden mithilfe des *Cutoff*-Wertes aus Abb. 22 mehr Patienten mit HGAOT richtig vorhergesagt (14 von 18), bei Anwendung des *Cutoff*-Wertes aus Abb. 23 war dies der Fall für die Patienten ohne HGAOT (11 von 12).

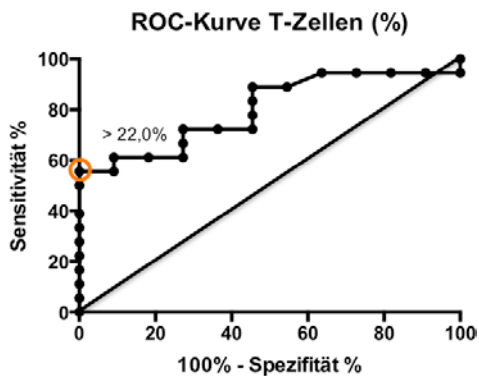


Abbildung 24: ROC-Kurve der relativen T-Zellzahl. Als optimaler *Cutoff*-Wert wurde der orange umkreiste Punkt (22,0 %) ermittelt. AUC: 0,81, p-Wert: 0,004.

Cutoff-Wert: 22,0 % T-Zellen

		Zustand	
		+ 18	-12
Test	+ 10	10	0
	- 20	8	12

Abbildung 25: Vierfeldertafel mit *Cutoff*-Wert 22 % T-Zellen. Der Test galt als positiv, wenn mehr als 22 % der lebenden Zellen T-Zellen waren. Die Sensitivität lag in diesem Fall bei 55,56 % und die Spezifität bei 100 %.

In der Untersuchung der relativen T-Zellzahl wies der mithilfe des Youden-Index errechnete *Cutoff*-Wert (orange umkreist) bereits die höchst mögliche Spezifität auf (Abb. 24) und kündigte damit 12 von 12 Patienten mit schwachen Nebenwirkungen korrekt an während er bei den Patienten mit starken Nebenwirkungen nur bei 10 von 18 eine richtige Vorhersage erlaubte (Abb. 25).

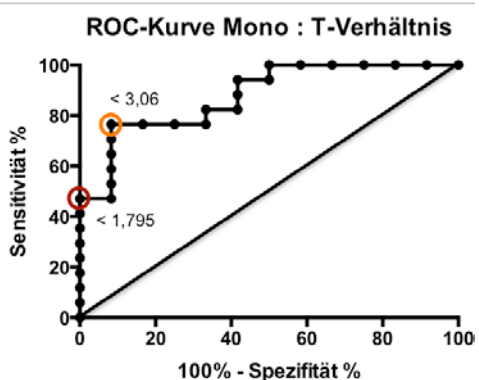


Abbildung 26: ROC-Kurve Mono : T-Verhältnis. Der errechnete optimale *Cutoff* lag bei einem Mono : T-Zell-Verhältnis von 3,06 und ist in der Abbildung orange umkreist. Mit einer Gewichtung der Spezifität kam unter Inkaufnahme einer geringeren Sensitivität auch der rot markierte *Cutoff*-Wert von 1,8 infrage. AUC: 0,88, p-Wert: 0,001.

Cutoff-Wert: Mono : T-Verhältnis: 3,06

		Zustand	
		+ 17	- 12
Test	+ 14	13	1
	- 15	4	11

Abbildung 27: Vierfeldertafel mit Cutoff-Wert Mono : T-Verhältnis 3,06. Der Test galt als positiv, wenn das Verhältnis kleiner als 3,06 war. Bei diesem Cutoff-Wert lag die Sensitivität bei 76,47 % und die Spezifität bei 91,67 %.

Cutoff-Wert: Mono : T-Verhältnis: 1,8

		Zustand	
		+ 17	- 12
Test	+ 8	8	0
	- 21	9	12

Abbildung 28: Vierfeldertafel mit Cutoff-Wert Mono : T-Verhältnis 1,8. Der Test galt als positiv, wenn das Verhältnis kleiner als 1,8 war. Die Sensitivität lag bei diesem Cutoff-Wert bei 47,06 % und die Spezifität bei 100 %.

In der Untersuchung des Mono : T-Verhältnisses lag der zunächst errechnete Cutoff-Wert 3,06 (Abb. 27) in seiner Sensitivität von 76,47 % deutlich über dem nächstspezifischeren Wert von 1,8, der eine Sensitivität von 47,06 % auswies (Abb. 28). Während das niedrigere Mono : T-Verhältnis als Cutoff-Wert in dieser Untersuchung eine weitaus schlechtere Aussage über die Patienten mit HGAOT zuließ (Abb. 27), wurden damit alle Patienten ohne HGAOT korrekt angekündigt (Abb. 28).

Die Cutoff-Werte der relativen Zellzahlen ergaben unterschiedlich starke Tests zur Vorhersage von Therapie Nebenwirkungen. Als Marker mit der größten AUC erwies sich das Verhältnis von Monozyten zu T-Lymphozyten als stärksten Biomarker (AUC: 0,88). Er lag damit im oberen Bereich der guten Tests (siehe Tab. 20, S. 63). Die Untersuchungen der relativen Monozytenzahl (AUC: 0,83) und der relativen T-Lymphozytenzahl (AUC: 0,81) lagen dahinter, aber ebenfalls im Bereich der guten Tests.

3.5.3 Analyse der absoluten Zellzahlen zum Zeitpunkt 1

Zur Bestimmung der absoluten Zellzahlen einzelner Subpopulationen wurden die oben verwendeten relativen Zellzahlen mit der zuvor bestimmten Gesamtzahl an PBMCs in der jeweiligen Patientenprobe verrechnet und auf einen Milliliter genormt.

3.5.3.1 Analyse der Zellpopulationen anhand absoluter Zellzahlen

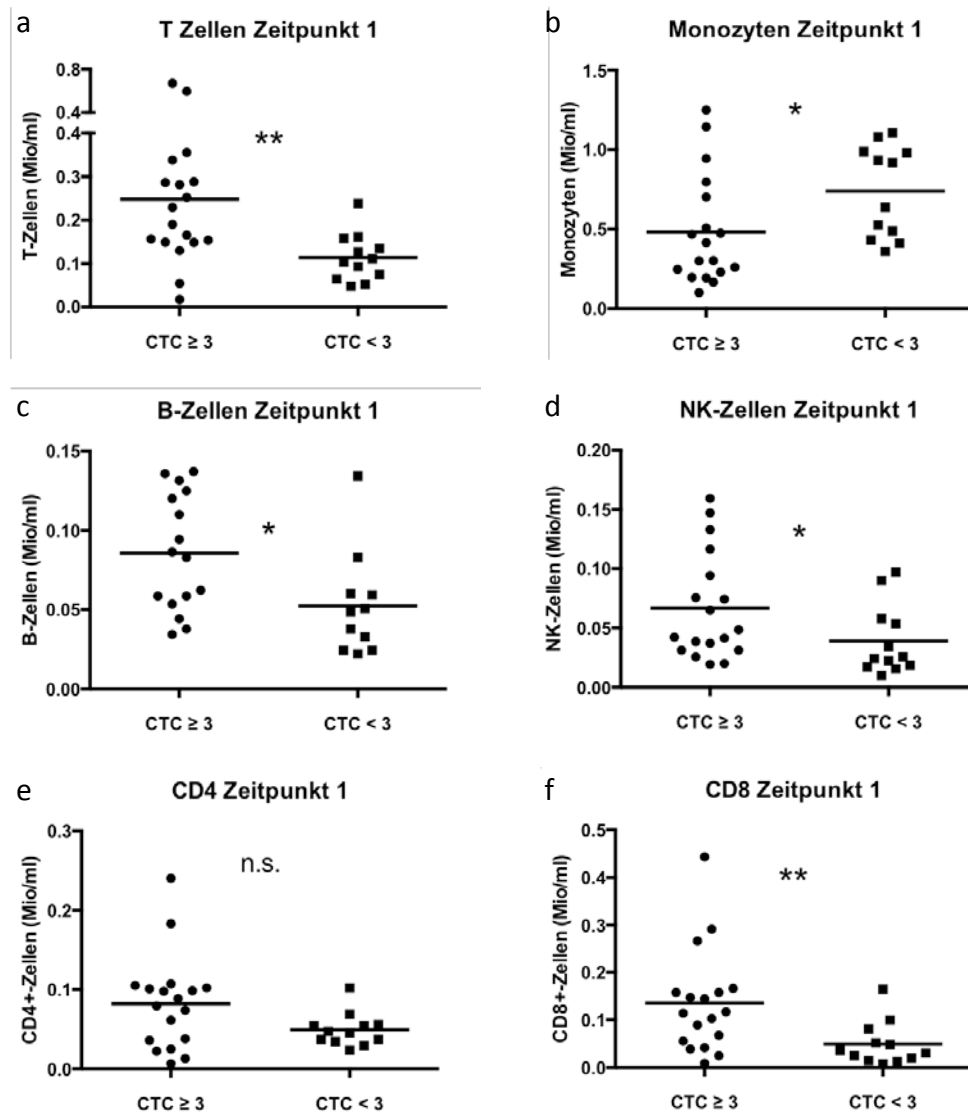


Abbildung 29: Bestimmung der absoluten Zellzahlen mittels FACS-Analyse zum Zeitpunkt 1. Darstellung der absoluten Zellzahlen verschiedener Subpopulationen von PBMCs von Kopf-Hals-Tumor-Patienten zum Zeitpunkt 1 (vor RCT) in Millionen pro ml (Mio/ml), ermittelt auf Basis der FACS-Analyse und -Gating-Strategie von Abb. 15. Die Patienten wurden entsprechend ihren Nebenwirkungen in zwei Kohorten, CTC ≥ 3 (starke NW) und CTC < 3 (schwache NW), eingeteilt. Die FACS-Ergebnisse wurden mithilfe des t-Tests analysiert. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0,05$) und ** ($p < 0,01$) dargestellt. P-Werte $\geq 0,05$ wurden als nicht signifikant (n.s.) bewertet. Jeder abgebildete Punkt repräsentiert den Messwert eines Patienten ($n = 30$), die horizontale Linie markiert den Mittelwert. Modifiziert nach Beschel et al. 2016, S. 65907.

In der Analyse der absoluten Zahlen lag die T-Zellzahl der Patienten mit starken Nebenwirkungen im Mittel bei 0,25 Millionen pro ml (Mio/ml) und war somit ungefähr doppelt so hoch wie die der Patienten mit schwachen Nebenwirkungen (0,11 Mio/ml) ($p = 0,004$, Abb. 29a). Auch in der Analyse der absoluten Zellzahlen war das Verhältnis bezüglich der Monozytenzahl umgekehrt zu dem der T-Zellen. Die Kohorte mit niedrigem CTC-Score wies durchschnittlich eine höhere Anzahl an Monozyten auf, als die Patienten mit hohem CTC-Score (0,74 Mio/ml bzw. 0,5 Mio/ml, respektive) ($p = 0,027$, Abb. 29b). Die absolute B-Zellzahl lag bei den Patienten mit HGAOT durchschnittlich 0,04 Mio/ml höher als bei den Patienten ohne HGAOT (0,09 Mio/ml bzw. 0,05 Mio/ml, respektive) ($p = 0,019$, Abb. 29c). In der Patientengruppe mit starken Nebenwirkungen wurde im Mittel eine größere NK-Zellzahl von ca. 0,07 Mio/ml verzeichnet als in der Kohorte mit schwachen Nebenwirkungen (0,04 Mio/ml) ($p = 0,036$, Abb. 29d). Die beiden Subpopulationen der T-Zellen zeigten in der Kohorte mit hohem CTC-Score höhere Werte, der Unterschied war jedoch nur bei den $CD8^+$ -T-Zellen signifikant (0,14 Mio/ml bei $CTC \geq 3$ im Gegensatz zu 0,05 Mio/ml bei $CTC < 3$) ($p = 0,005$, Abb. 29f). Die Werte der $CD4^+$ -T-Zellen lagen bei 0,08 Mio/ml ($CTC \geq 3$) und 0,05 Mio/ml ($CTC < 3$) und unterschieden sich nicht signifikant (Abb. 29e).

Auch in der Analyse der absoluten Zellzahlen wurde eine Korrelation zwischen einer erhöhten Anzahl an T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und dem Auftreten stärkerer Nebenwirkungen beobachtet. Zusätzlich wies eine hohe Anzahl an $CD8^+$ -T-Zellen auf die Entwicklung von HGAOT hin. Eine hohe Monozytenzahl korrelierte hingegen mit der Entwicklung schwacher Nebenwirkungen durch die Therapie. Die $CD4^+$ -T-Zellzahl unterschied sich nicht signifikant zwischen den Kohorten.

3.5.3.2 Absoluten Zellzahlen als prädiktive Biomarker für die Entwicklung von HGAOT

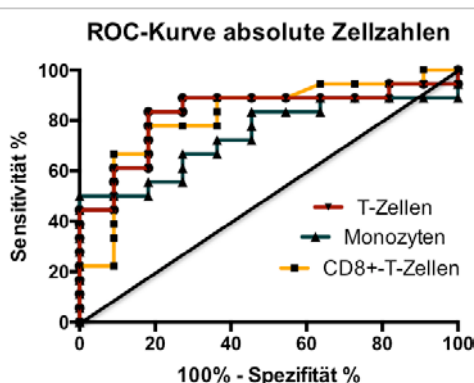


Abbildung 30: ROC-Kurven der absoluten Zellzahlen. Unter den absoluten Zellzahlen erwies sich die Monozytenanzahl als der schwächere prädiktive Marker. T-Zellen und CD8⁺-T-Zellen besaßen eine höhere AUC und somit eine stärkere Aussagekraft als die Monozyten.

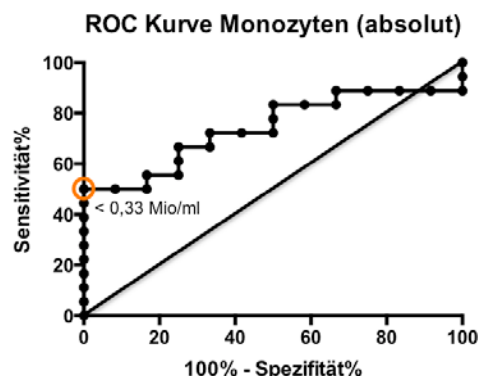


Abbildung 31: ROC-Kurve der absoluten Monozytenzahl. Als errechneter optimaler „Cut-off“-Wert ergab sich der orange umkreiste Punkt mit < 0,33 Mio Monozyten/ml. Werte unterhalb dieser Schwelle galten als positiver Test, Werte darüber als negativer Test. Die AUC lag bei 0,74 und der p-Wert bei 0,028.

Cutoff-Wert: 0,33 Mio Monozyten/ml

		Zustand	
		+ 18	- 12
Test	+ 9	9	0
	- 21	9	12

Abbildung 32: Vierfeldertafel mit Cutoff-Wert 0,33 Mio Monozyten/ml. Dieser Test galt als positiv, wenn weniger als 0,33 Mio Monozyten pro ml gezählt wurden. Die Sensitivität dieses Tests lag bei 50 % und die Spezifität bei 100 %.

Die ROC-Kurve der absoluten Monozytenzahl stellte 0,33 Mio Monozyten/ml mit einer Spezifität von 100 % (Abb. 31) als optimalen Cutoff-Wert dar und ermöglichte somit in dieser retrospektiven Studie eine korrekte Ankündigung aller Patienten mit schwachen Nebenwirkungen. Dieser Cutoff-Wert erlaubte jedoch nur bei der Hälfte der Patienten mit starken Nebenwirkungen eine korrekte Aussage (Abb. 32).

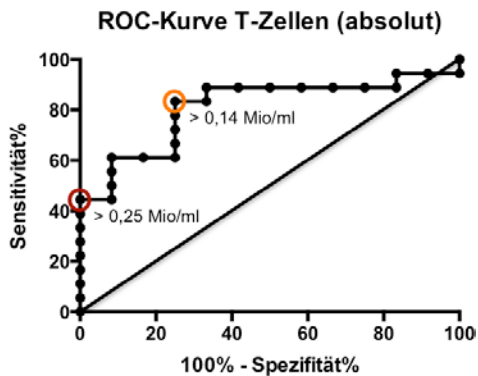


Abbildung 33: ROC-Kurve der absoluten T-Zellzahl. Der orange-markierte Punkt repräsentiert den errechneten optimalen *Cutoff*-Wert von 0,14 Mio T-Zellen pro ml. Alle Werte darüber wurden als positiver Test angesehen, alle darunter liegenden als negativer Test. Bei stärkerer Gewichtung der Spezifität kam der rot umkreiste Punkt mit einem *Cutoff*-Wert von 0,25 Mio T-Zellen pro ml infrage. Die AUC lag bei 0,81 und der p-Wert bei 0,005.

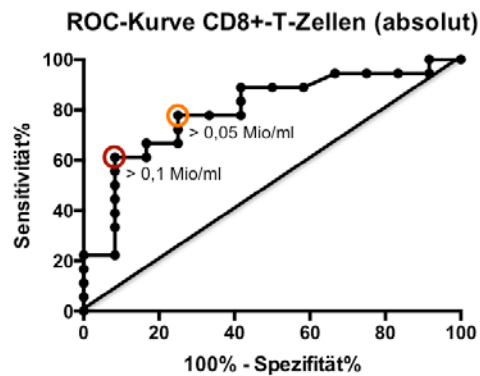


Abbildung 34: ROC-Kurve der absoluten Anzahl an CD8⁺-T-Zellen. Der errechnete optimale *Cutoff*-Wert (orange markiert) lag bei 0,05 Mio CD8⁺-T-Zellen pro ml. Darüber liegende Werte wurden als positiver, darunter liegende als negativer Test eingestuft. Der rot markierte *Cutoff*-Wert von 0,1 Mio/ml stellte eine Variante mit stärkerer Gewichtung der Spezifität dar. Die AUC dieser Kurve lag bei 0,80 und der p-Wert bei 0,006.

Cutoff-Wert: 0,14 Mio T-Zellen/ml

		Zustand	
		+ 18	- 12
Test	+ 18	15	3
	- 12	3	9

Abbildung 35: Vierfeldertafel mit *Cutoff*-Wert 0,14 Mio T-Zellen/ml. Der Test wurde bei mehr als 0,14 Mio T-Zellen pro ml als positiv gewertet. Die Sensitivität betrug 83,33 % und die Spezifität 75 %.

Cutoff-Wert: 0,05 Mio CD8⁺-T-Zellen/ml

		Zustand	
		+ 18	- 12
Test	+ 18	14	4
	- 12	4	8

Abbildung 36: Vierfeldertafel mit *Cutoff*-Wert 0,05 Mio CD8⁺-T-Zellen/ml. Bei mehr als 0,05 Mio CD8⁺-T-Zellen pro ml wurde der Test als positiv gewertet. Die Sensitivität lag bei 77,78 % und die Spezifität bei 75 %.

Cutoff-Wert: 0,25 Mio T-Zellen/ml

		Zustand	
		+ 18	- 12
Test	+ 8	8	0
	- 22	10	12

Abbildung 37: Vierfeldertafel mit *Cutoff*-Wert 0,25 Mio T-Zellen/ml. Dieser Test galt bei mehr als 0,25 Mio T-Zellen pro ml als positiv. Die Sensitivität beträgt 44,44 % und die Spezifität 100 %.

Cutoff-Wert: 0,1 Mio CD8⁺-T-Zellen/ml

		Zustand	
		+ 18	- 12
Test	+ 13	11	2
	- 17	7	10

Abbildung 38: Vierfeldertafel mit *Cutoff*-Wert 0,1 Mio CD8⁺-T-Zellen/ml. Bei mehr als 0,1 Mio CD8⁺-T-Zellen pro ml wurde der Test als positiv gewertet. Die Sensitivität lag bei 61,11 % und die Spezifität bei 91,67 %.

Obwohl der gewichtete *Cutoff*-Wert der absoluten T-Zellzahl (Abb. 37) eine Spezifität von 100 % anstatt 75 % beim errechneten *Cutoff*-Wert (Abb. 35) aufwies, sank seine Sensitivität dadurch von 83,33 % auf knapp die Hälfte (44,44 %). Durch die Gewichtung wurden zwar alle Patienten mit niedrigem CTC-Score der korrekten Kohorte zugeordnet, doch anstatt von initial 15 (Abb. 35) nur noch 8 der 18 Patienten mit hohem CTC-Score (Abb. 37).

Dieses Phänomen war bei den *Cutoff*-Werten der CD8⁺-T-Zellzahl schwächer ausgeprägt. Eine Gewichtung der Spezifität von 75 % auf 91,67 % führte nur zu einer Reduktion der Sensitivität von 77,78 % auf 61,11 % und damit zu einer besseren Vorhersage der Patienten mit schwachen Nebenwirkungen und zu einer mittelgradig schlechteren Einordnung der Patienten mit starken Nebenwirkungen (Abb. 36 und 38).

Die Analyse der absoluten Zellzahlen ergab, dass die T-Zellen und die CD8⁺-T-Zell-Subpopulation geeignete prädiktive Marker darstellten. Die ROC-Kurve wies eine AUC von $\geq 0,8$ auf (AUC_{T-Zellen}: 0,81, AUC_{CD8}: 0,80). Es handelt sich somit gemäß Tab. 20 (siehe S. 63) um gute Tests. Die ROC-Kurven der Monozyten lag etwas darunter (AUC_{Monozyten}: 0,74) im Bereich der mittelmäßigen Tests.

3.5.4 Übersicht über die FACS-Ergebnisse

Tabelle 21: Übersicht über die neuen FACS-Biomarker

Biomarker	Cutoff	Sensitivität	Spezifität	PPV	NPV	AUC
Mono (rel.)	< 55,58 %	77,78 %	83,33 %	85,71 %	74,47 %	0,83
	< 38,41 %	55,56 %	91,67 %	89,56 %	61,60 %	0,83
T (rel.)	> 22 %	55,56 %	100 %	100 %	63,64 %	0,81
Mono:T (rel.)	< 3,06	76,47 %	91,67 %	92,19 %	75,19 %	0,88
	< 1,8	47,06 %	100 %	100 %	59,50 %	0,88
Mono (abs.)	< 0,33 Mio	50 %	100 %	100 %	60,87 %	0,74
T (abs.)	> 0,14 Mio	83,33 %	75 %	81,08 %	77,77 %	0,81
	> 0,25 Mio	44,44 %	100 %	100 %	58,33 %	0,81
CD8 ⁺ -T (abs.)	> 0,05 Mio	77,78 %	75 %	80 %	72,42 %	0,80
	> 0,1 Mio	61,11 %	91,67 %	90,41 %	64,71 %	0,80

Übersicht über die neuen FACS-Biomarker zur Vorhersage von akuter Organtoxizität bei der RCT von Kopf-Hals-Tumoren. In dieser Abbildung sind die Biomarker mit ihren jeweiligen *Cutoff*-Werten (errechnete und gewichtete), Sensitivität, Spezifität, positiv (PPV) und negativ (NPV) prädiktiven Werten und der *Area under the curve* (AUC) dargestellt.

3.6 Immunhistochemie der Kopf-Hals-Tumoren

Als weitere Methode wurde in dieser Arbeit eine immunhistochemische Untersuchung der Tumoren durchgeführt. Die Probengewinnung war aufwendiger als die Blutentnahme für die oben genannten Untersuchungen. Das Tumorgewebe wurde entweder durch die im Rahmen der Diagnosestellung notwendige Biopsie oder aus dem Resektat der Operation gewonnen. Eine zusätzliche Intervention ist somit nicht erforderlich gewesen. Die Aufbereitung des Gewebes, das Schneiden, Fixieren und Färben der Präparate ist zeit- und kostenaufwendiger als die zuvor beschriebenen Methoden. Die Immunhistochemie zeigt jedoch die lokale Immunsituation im Tumormikromilieu, in der die Antitumorantwort und auch die Gewebsschädigung zum Großteil ablaufen.

Die Tumorproben von 25 Kopf-Hals-Tumor-Patienten wurden in Paraformaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet, 2 µm dick geschnitten und nach einem zweitägigen Protokoll immunhistochemisch gefärbt. Dabei wurden die T-Zell-Marker CD4 und CD8 sowie zusätzlich der Tumormarker CK AE 1/3 angefärbt, um das Tumorgewebe vom umliegenden Bindegewebe abgrenzen zu können.

Die Bewertung der Infiltrationsstärke anhand von 200-fach vergrößerten Bildausschnitten wurde verblindet und unabhängig von drei verschiedenen Untersuchern durchgeführt. In der statistischen Darstellung wurden bei abweichenden Werten der einzelnen Untersucher die Mittelwerte der semiquantitativen Analyse verwendet.

3.6.1 Strategie der immunhistochemischen Analyse

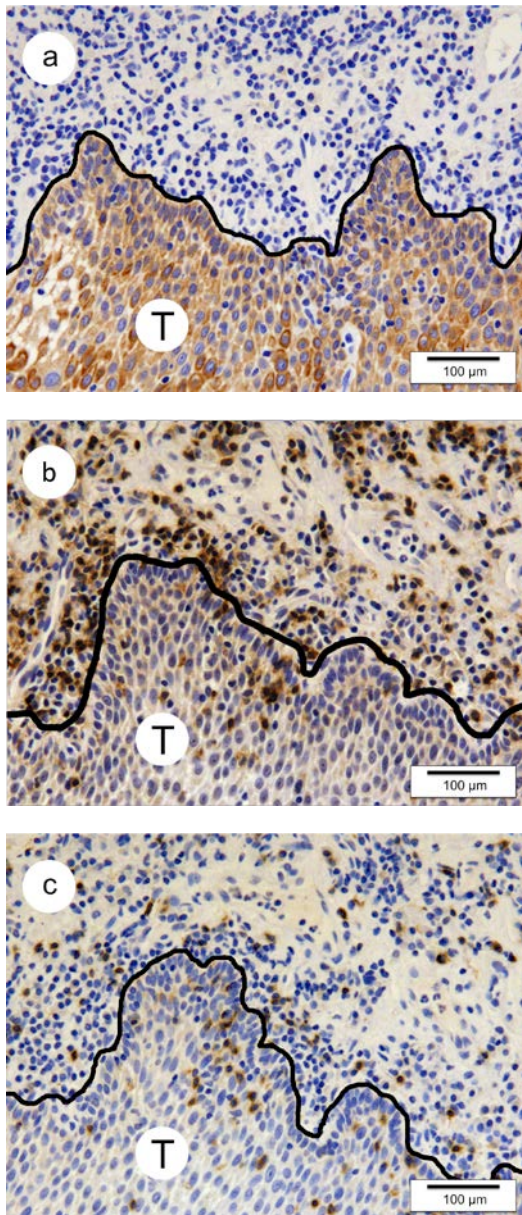


Abbildung 39: Beispiele für immunhistochemische Analyse von CK AE 1/3, CD4 und CD8. Paraffinschnitte des Tumorgewebes wurden mit CK AE 1/3-, CD4- und CD8-Antikörpern angefärbt. Hier sind repräsentative Ausschnitte in 200-facher Vergrößerung abgebildet, auf denen die positiv angefärbten Zellen bräunlich erscheinen. Das oberste Bild stellt die immunhistochemische Anfärbung epithelspezifischer Zytokeratinfilamente (CK AE 1/3) dar (a). Diese kommen nur im Tumor, jedoch nicht im umliegenden Bindegewebe vor. Von dieser Färbung ausgehend konnten die Tumorgrenzen auch in den anderen immunhistochemischen Färbungen der konsekutiven Schnitte nachvollzogen werden (siehe schwarze Linie). Dadurch war es möglich zu erkennen ob die infiltrierenden T-Zellen sich im Tumor selbst oder im umliegenden Bindegewebe befinden. In den Beispielbildern liegen die Tumorzellen am unteren Rand und sind mit dem Buchstaben T markiert. Am oberen Bildrand befindet sich das Tumorstroma. Darstellung der CD4⁺-T-Zellen (b) und der CD8⁺-T-Zellen (c) in konsekutiven Schnitten der gleichen Tumorbiopsie wie in a. 200-fache Vergrößerung. Modifiziert nach Beschel et al. 2016, S. 65908.

3.6.2 Immunhistochemische Bewertung der CD4⁺-T-Zell-Infiltration

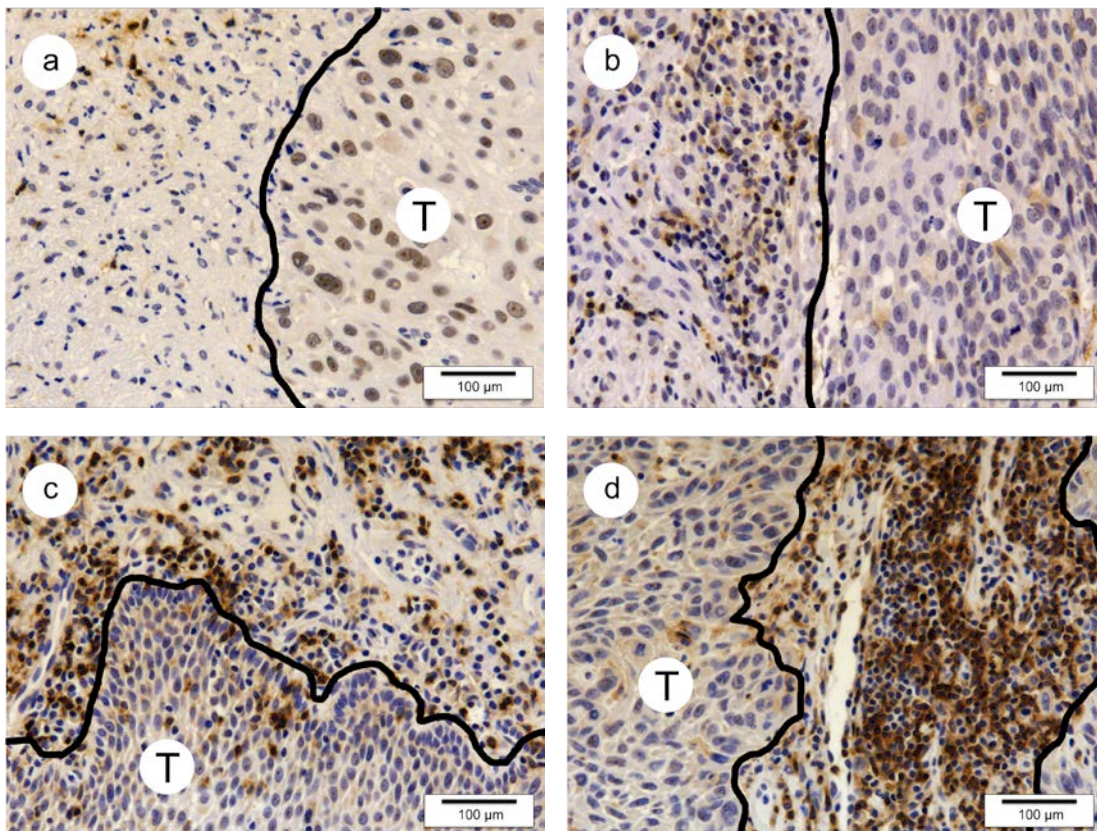


Abbildung 40: Repräsentative Beispiele von Tumorschnitten mit unterschiedlich starker Infiltration von CD4⁺-T-Lymphozyten. Beispiele für den semiquantitativen CD4-Score: (a) keine oder nur vereinzelte CD4⁺-T-Zellen (Score 0), (b) moderat viele CD4⁺-T-Zellen (Score 1), (c) gehäuft vorkommende CD4⁺-T-Zellen (Score 2), (d) sehr viele CD4⁺-T-Zellen (Score 3). Das Tumorporenchym ist in den Abbildungen mit dem Buchstaben T markiert. 200-fache Vergrößerung. Modifiziert nach Beschel et al. 2016, S. 65908.

3.6.3 Immunhistochemische Bewertung der CD8⁺-T-Zell-Infiltration

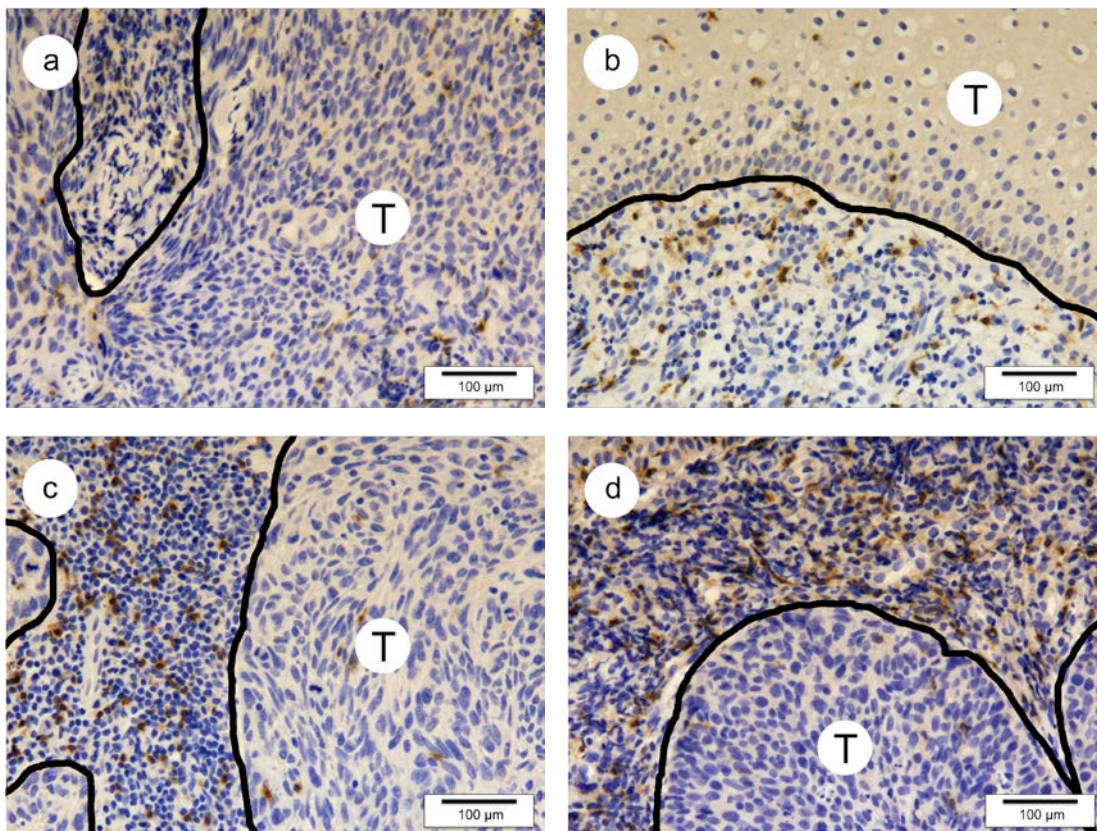


Abbildung 41: Repräsentative Beispiele von Tumorschnitten mit unterschiedlich starker Infiltration von CD8⁺-T-Zellen. Beispiele für den semiquantitativen CD8-Score: (a) keine oder nur vereinzelte CD8⁺-T-Zellen (Score 0), (b) moderat viele CD8⁺-T-Zellen (Score 1), (c) gehäuft vorkommende CD8⁺-T-Zellen (Score 2), (d) sehr viele CD8⁺-T-Zellen (Score 3). Das Tumorparenchym ist in den Teilabbildungen mit dem Buchstaben T markiert. 200-fache Vergrößerung.

3.6.4 Tumorinfiltration durch T-Zellen

Die gefärbten Tumorschnitte wurden im Hinblick auf die Intensität der T-Zellinfiltration untersucht. Dabei wurde drei Bildausschnitten je Tumor in 200-facher Vergrößerung unabhängig und verblindet von drei Untersuchern je eine Punktzahl zwischen 0 und 3 zugeordnet. Keine oder nur vereinzelte T-Zellen wurden mit 0 Punkten, moderat viele T-Zellen mit 1 Punkt, gehäuft vorkommende T-Zellen mit 2 Punkten und sehr viele T-Zellen mit 3 Punkten bewertet (siehe Abb. 40 und 41, S. 77 und 78, respektive). Die ermittelten Scores der beiden Kohorten wurden für die statistische Analyse gemittelt und einander in den folgenden Abbildungen gegenübergestellt.

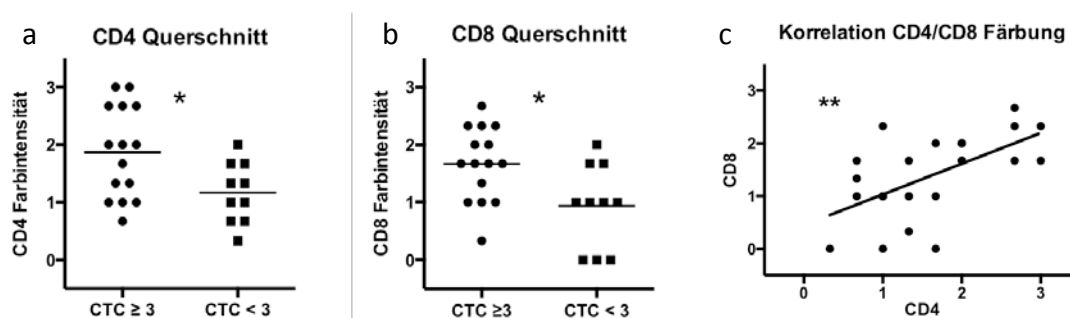


Abbildung 42: Semi-quantitative Analyse der T-Zell-Infiltration mittels Immunhistochemie. Darstellung der Quantifizierung der Infiltration von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in Kopf-Hals-Tumor-Präparaten auf Basis eines semiquantitativen immunhistochemischen Scores. Jeweils drei Ausschnitte eines Tumorpräparats wurden unabhängig von drei Untersuchern verblindet mithilfe eines Scores von 0 bis 3 entsprechend Abb. 40/41 evaluiert. Die Patienten wurden entsprechend ihren Nebenwirkungen in zwei Kohorten, eine mit CTC ≥ 3 (starke NW) und eine mit CTC < 3 (schwache NW), eingeteilt. Die drei unabhängigen Bewertungen wurden gemittelt und mithilfe des Mann-Whitney-Tests statistisch analysiert. Der Zusammenhang zwischen CD4- und CD8-Zellinfiltration wurde mittels Spearman-Korrelation untersucht ($r = 0,586$, p -Wert 0,002). Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0,05$) und ** ($p < 0,01$) markiert. Jeder abgebildete Punkt repräsentiert den gemittelten Score eines Patienten ($n = 25$), die horizontale Linie markiert den Mittelwert, die diagonale Linie in (c) markiert die Regressionsgerade. Modifiziert nach Beschel et al. 2016, S. 65908.

Die Anzahl der tumorinfiltrierenden CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in prätherapeutisch entnommenem Tumorgewebe korrelierte untereinander und mit der Stärke der im Verlauf der Therapie auftretenden Nebenwirkungen.

Die CD4⁺-Zellinfiltration lag in der Kohorte mit hohem CTC-Score mit einer durchschnittlichen Wertung von 1,9 höher als in der Kohorte mit niedrigem CTC-Score (ca. 1,2) ($p = 0,036$, Abb. 42a). In der Analyse der CD8⁺-T-Zellinfiltration wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, der gemittelte Score lag in der Kohorte CTC ≥ 3 bei 1,7 im Gegensatz

zu 0,9 bei einem CTC-Score < 3 ($p = 0,019$, Abb. 42b). Die Infiltrationsstärke beider T-Zell-Subpopulationen korrelierte signifikant miteinander ($r = 0,586$, p -Wert 0,002, Abb. 42c).

3.7 Zusammenfassung der Analyseergebnisse

In folgender Tabelle 22 sind die Ergebnisse dieser Arbeit zusammengefasst:

Tabelle 22: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

Methode	Prädiktiver Biomarker	Differenz zwischen Patientenkohorten
ELISA	IFN γ , TNF α , IL-2, HMGB1	nicht signifikant
	IL-6	signifikant
RT-qPCR	IFN γ , TGF β , CD3, CD28, ICOS, PDCD1, CTLA-4, Granzym B, BCL-2, BAX, HMGB1	nicht signifikant
FACS (rel. Zellzahlen)	T-, B-, NK-Zellen, Monozyten, Mono : T-Ratio, CD69 (CD4), CD154 (CD4), CD154 (CD8)	signifikant
	T : B-Ratio, NK : Lympo-Ratio, CD4 : CD8-Ratio, CD69 (CD8)	nicht signifikant
FACS (abs. Zellzahlen)	T-, B-, NK-Zellen, Monozyten, CD8 ⁺ -T-Zellen	signifikant
	CD4 ⁺ -T-Zellen	nicht signifikant
IHC	CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Zellen	signifikant

Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit. Die verschiedenen Biomarker sind mit der Methode sowie der Signifikanz der Ergebnisse abgebildet. Die Patienten wurden entsprechend ihren Nebenwirkungen in zwei Kohorten, eine mit CTC ≥ 3 (starke NW) und eine mit CTC < 3 (schwache NW), eingeteilt. In der dritten Spalte ist jeweils die Signifikanz der Unterscheidung zwischen den Kohorten eingetragen.

4 Diskussion

Es gibt eine Vielzahl an Studien, die sich mit prognostischen Biomarkern beschäftigen, um das Überleben von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren abzuschätzen. So haben diese unter anderem Hinweise zum Alter und der Tumorlokalisation als prädiktive Faktoren für das 5-Jahres-Überleben geliefert (Baatenburg de Jong et al. 2001). Wenige Erkenntnisse gibt es bisher jedoch bezüglich prädiktiver Biomarker, die helfen könnten, das Ausmaß akuter Nebenwirkungen der Therapie vorherzusagen. Da diese auftretenden Toxizitäten die Behandlungsoptionen der eigentlichen Tumorerkrankung begrenzen, könnte eine mithilfe solcher Marker individuell angepasste Therapie die Überlebenswahrscheinlichkeit möglicherweise verlängern.

Für die Einschätzung des zu erwartenden Schweregrades der Nebenwirkungen wurden bislang grundlegende Umstände wie das Alter, Mundhygienestatus (Pico et al. 1998), Erkrankungsstadium, Geschlecht (Meyer et al. 2012) oder die gewählte Therapieform (Denaro et al. 2013) zu Rate gezogen. Intrinsische Voraussetzungen für die Entwicklung von Nebenwirkungen welche den Immunstatus des Patienten mit einbeziehen, wurden selten in den Mittelpunkt der Fragestellung gesetzt. Dabei korreliert die Ausprägung der vermutlich immunvermittelten Therapienebenwirkungen signifikant mit der Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren (Wolff et al. 2011) und weist dadurch auf die Wichtigkeit der körpereigenen Tumorbekämpfung durch das Immunsystem hin.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die individuell unterschiedliche Zusammensetzung des Immunsystems vor Beginn der Therapie bei Patienten mit lokal fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren mit der Entwicklung von HGAOT unter RCT korreliert.

4.1 Prädiktives Potential der Plasmaspiegel und Genexpression von Zytokinen und zytotoxischen Molekülen

Im Rahmen einer Tumorerkrankung wird eine Vielzahl an Zytokinen und zytotoxischen Molekülen ausgeschüttet, die maßgeblich an der Pathogenese der lokalen Entzündung beteiligt sind (Hymes et al. 2006) und die Immunreaktion gegen den Tumor auf unterschiedliche Weise beeinflussen (Vesely et al. 2011). Diese wichtigen Mediatoren der Entzündung und Immunantwort wären als prädiktive Biomarker für die akute Organtoxizität im Rahmen der RCT denkbar und wurden daher in dieser Arbeit mittels ELISA und RT-qPCR untersucht.

Die gemessenen prätherapeutischen Plasmakonzentrationen der Zytokine $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ und IL-2 sowie die relative mRNA-Expression von $IFN\gamma$, $TGF\beta$ und *Granzym B* im Vollblut der Patienten wiesen in dieser Untersuchung keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Patientenkohorten mit geringem und hohem CTC-Score auf und eignen sich somit nicht als prädiktive Biomarker für die Entwicklung akuter Nebenwirkungen der RCT bei Kopf-Hals-Tumor-Patienten (Abb. 8a und 9, S. 46 und 49, respektive).

Die Plasmakonzentration von $IFN\gamma$ lag in der untersuchten Patientenkohorte, ohne Berücksichtigung der nicht-messbaren Werte, im Mittel bei 4,14 pg/ml (Abb. 8a, S. 46). Die Werte liegen somit auf einem niedrigeren Niveau als bei gesunden Kontrollpersonen (MW 26,20 pg/ml), eine Beobachtung die Kaskas und Kollegen bereits gemacht haben (Kaskas NM et al. 2014). In dieser Untersuchung gab es weder vor der Therapie noch danach signifikante Unterschiede zwischen den $IFN\gamma$ -Plasmakonzentrationen der beiden Patientengruppen, die Aufschluss über den späteren CTC-Score geben könnten.

Die $TNF\alpha$ - und IL-2-Konzentrationen im Plasma lagen in der untersuchten Kohorte auf dem Niveau der Negativkontrolle und wiesen somit ebenfalls kein prädiktives Potential auf. In der Normalbevölkerung liegt die Plasmakonzentration von $TNF\alpha$ bei gesunden Probanden bei ca. 11 pg/ml (Arican et al. 2005) und die von IL-2 bei ungefähr 14 pg/ml (Kleiner et al. 2013). Einer Studie von Meirovitz et al. zufolge gibt es keine Korrelation zwischen dem Serumspiegel von $TNF\alpha$ und dem Auftreten einer akuten Mukositis während der RCT bei Kopf-Hals-Tumor-Patienten (Meirovitz et al. 2010). Bei Patienten mit Ösophaguskarzinom wurde hingegen eine Assoziation zwischen den IL-2- und $IFN\gamma$ -Spiegeln und der lokalen Tumorantwort sowie der Entwicklung von akuter therapieassoziiierter Toxizität beschrieben (Ma et al. 2014). In der vorliegenden Untersuchung konnten keine entsprechenden Korrelationen gefunden werden. Da die genannte Ana-

lyse von Ma et al. nicht das Zytokinniveau zu Beginn, sondern im Verlauf der Therapie berücksichtigt, ist ihr prädiktives Potential limitiert.

Grundsätzlich scheinen die peripheren Blutzellen von Kopf-Hals-Tumor-Patienten geringere Mengen an Th₁-Zytokinen wie TNF α und IFN γ und größere Mengen an Th₂-Zytokinen wie IL-4 und IL-10 zu produzieren als die von gesunden Personen (Bose et al. 2008). Diese Beobachtung würde die niedrigen Messwerte bei TNF α und IFN γ teilweise erklären.

In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich bezüglich der TGF β -Genexpression im Gesamtblut der Patienten kein Unterschied zwischen den beiden Kohorten, jedoch ein signifikanter Anstieg der Expression in beiden Patientengruppen über den Verlauf der Therapie (Abb. 14, S. 57). Die Induktion der TGF β -Genexpression tritt vermutlich bestrahlungsbedingt auf. Dabei könnte es sich um ein Phänomen handeln, das bereits von Dancea et al. beschrieben wurde (Dancea et al. 2009). Eine Korrelation mit der späteren Nebenwirkungsausprägung war aufgrund fehlender Unterschiede nicht möglich. In einer Studie von Zhao et al., die 26 Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom einschloss, wurde beobachtet, dass ein Anstieg der TGF β -Plasmakonzentration auf die Entwicklung einer „*radiation-induced lung toxicity*“, also einer bestrahlungsassoziierten Lungentoxizität, hindeutete (Zhao et al. 2008). Ein entsprechender Effekt konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Die Genexpression von *Granzym B* zeigte weder prä- noch posttherapeutisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kohorten (Abb. 9c, S. 49). Granzym B, eines der wichtigsten zytotoxischen Moleküle, das von NK-Zellen und zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen im Rahmen der Antitumorantwort sezerniert wird (Rousaleva und Krepela 2010), wurde bezüglich seines prädiktiven Potentials für die akute Organtoxizität bei RCT bisher selten untersucht. *In vitro* induziert die Co-Expression von Granzym B und Perforin Apoptose in Larynx tumorzellen und hemmt deren Kanzerogenität (Li et al. 2014). Die Ausschüttung von Granzym B würde in diesem Zusammenhang somit durch die Elimination der Tumorzellen eine bessere Therapieantwort vermitteln. Ob mit der gesteigerten Apoptose auch eine verstärkte Nebenwirkungstendenz provoziert werden kann, wurde hingegen nicht untersucht.

Bei Kopf-Hals-Tumor-Patienten scheinen CD8⁺-T-Zellen und CD56⁺-NK-Zellen das Molekül FasL im Vergleich zu gesunden Personen auf einem niedrigeren Niveau zu exprimieren und außerdem scheinen sie geringere Mengen an Perforin und Granzym B zu besitzen (Bose et al. 2008). Somit ist ihre Möglichkeit, Tumorzellen zu eliminieren, eventuell eingeschränkt und ihre Anfälligkeit, durch FasL-exprimierende HNSCC-Zellen selbst in

Apoptose zu gehen, möglicherweise verstärkt. Entsprechende Beobachtungen wurden in dieser Untersuchung jedoch nicht gemacht.

Einzig die IL-6-Konzentration wies in der vorliegenden Untersuchung einen signifikanten Unterschied dahingehend auf, dass Patienten, die vor Therapiebeginn höhere Plasma-IL-6-Werte aufwiesen, im Verlauf der Therapie schwächere Nebenwirkungen entwickelten. Niedrige prätherapeutische IL-6-Spiegel korrelierten hier somit mit der Entwicklung von HGAOT. Die IL-6-Plasmakonzentrationen stiegen in beiden Kohorten im Verlauf der Therapie gleichermaßen an, wobei die Werte der Patienten mit starken Nebenwirkungen jeweils auf niedrigerem Niveau lagen als die der Patienten mit schwachen Nebenwirkungen (Abb. 8b, S. 46).

Einer *in-vitro* Untersuchung von Miyamoto et al. zufolge hemmt IL-6 die strahlungsbedingte Apoptose von Bauchspeicheldrüsenkrebszellen und fördert das Überleben der Zellen durch Hochregulation von BCL-2 (Miyamoto et al. 2001). Die verminderte Ausschüttung von immunstimulierenden DAMPs aufgrund einer geringeren Anzahl sterbender Tumorzellen würde die schwache Immunreaktion mit schwächeren Nebenwirkungen bei hohen Plasmaspiegeln von IL-6 in dieser Untersuchung teilweise erklären, eine Übertragung der Ergebnisse ist aufgrund der unterschiedlichen Tumorentitäten jedoch nur schwer möglich.

IL-6 ist ein immunsuppressives Molekül, das zum Großteil von Tumorzellen, Makrophagen und Stromazellen der Tumorumgebung sezerniert wird und die Differenzierung und Funktion von dendritischen Zellen unterdrückt. Die DCs sind für den ersten Schritt der Tumorelimination, die Erkennung fremder Zellen, wichtig (Zou 2005). Hohe IL-6-Werte könnten somit indirekt zu gehemmter Tumorzellelimination und folglich zu geringerer Nebenwirkungsausprägung und vermindertem Therapieansprechen führen.

In einer Untersuchung von Meirovitz et al. wurde berichtet, dass die IL-6-Konzentration im Plasma von Kopf-Hals-Tumor-Patienten unter RCT mit dem Auftreten von Mukositis und Dysphagie anstieg und mit der Notwendigkeit eine PEG-Anlage (perkutane endoskopische Gastrostomie zur Ernährung der Patienten) korrelierte (Meirovitz et al. 2010). Da die prätherapeutischen Werte in der Untersuchung von Meirovitz et al. keine Aussage ermöglichten, ist ihr prädiktives Potential limitiert.

Hohe IL-6-Spiegel werden in Studien zum einen als positiver (Chen et al. 2013), zum anderen als negativer (Ebrahimi et al. 2004; Zhu et al. 2009) Prognosefaktor beschrieben. Die Studienlage zur prognostischen Relevanz der IL-6-Plasmakonzentration ist derzeit widersprüchlich und auch die Rolle, die IL-6 in der Tumorumgebung spielt, ist nicht vollständig geklärt (Nikakhlagh et al. 2015). Die Tatsache, dass dieses Zytokin

hauptsächlich von myeloiden Zellen produziert wird, könnte die niedrige Konzentration bei Patienten mit HGAOT in dieser Untersuchung erklären, weil diese eine starke T-Zell-Antwort und daher eine geringe myeloide Zellantwort und IL-6-Konzentration aufwiesen. Trotz der signifikanten negativen Korrelation mit der Entwicklung einer HGAOT, empfiehlt sich dieser Parameter aufgrund der starken Streuung der Werte nicht als geeigneter prädiktiver Marker.

4.2 Vorhersagekraft der Genexpression kostimulatorischer und koinhibitorischer Moleküle

Weder die Genexpression der kostimulatorischen Moleküle *CD28* und *ICOS* noch der koinhibitorischen Moleküle *PDCD1* und *CTLA-4* im Vollblut erwies sich in dieser Untersuchung als tauglicher prädiktiver Biomarker für die Entwicklung akuter Nebenwirkungen durch die RCT bei Kopf-Hals-Tumor-Patienten (Abb. 11, S. 52). Auch im Verlauf der Therapie wiesen sie keine signifikanten Veränderungen in der Genexpression auf (Abb. 14, S. 57). Die Wichtigkeit kostimulatorischer oder koinhibitorischer Proteine für die zelluläre Immunantwort gegen Tumorzellen ist vielfach belegt (Driessens et al. 2009; Postow et al. 2015), ihre prädiktive Bedeutung konnte im Rahmen der Literaturrecherche während dieser Arbeit jedoch nicht untermauert werden. In der Literatur findet besonders die therapeutische Unterbrechung der T-Zell-Anergie durch Antikörperblockade koinhibitorischer Moleküle wie CTLA-4 und PDCD1 Beachtung. Sie wird momentan mit hohen Erwartungen im Hinblick auf den Nutzen in der Immunotherapie verschiedener Tumorentitäten untersucht (Gildener-Leapman et al. 2013; Li et al. 2015; Swanson und Sinha 2015).

4.3 Prädiktive Bedeutung der Genexpression von Apoptosemarkern

Die untersuchten Apoptosemarker *BCL-2* und *BAX* zeigten hinsichtlich ihrer Genexpression in dieser Untersuchung keine Eignung als prädiktive Biomarker für die Entwicklung der HGAOT durch die RCT bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren (Abb. 12, S. 54). Die Expression von *BAX*, einem proapoptotischen Molekül, zeigte jedoch in beiden Patientenkohorten einen signifikanten Anstieg während der Therapie (Abb. 14, S. 57). Zur prognostischen Bedeutung von Apoptose gibt es eine bessere Datenlage als zu der der anderen untersuchten Marker, da mehrere Arbeitsgruppen die Apoptoseneigung und entsprechende Marker in peripheren Blutzellen untersucht haben. Bordón et al. gelangte zur Schlussfolgerung, dass radioinduzierte Apoptose in peripheren Lymphozyten von Kopf-Hals-Tumor-Patienten einen Hinweis auf die individuelle Radiosensitivität

gibt und mit dem Auftreten der späten Nebenwirkung Xerostomie korreliert (Bordón et al. 2010).

In einer Genexpressionsanalyse der PBMCs von Tano et al. stellte sich ein *BCL-2/BAX*-Verhältnis von ≥ 2 und somit das Überwiegen des antiapoptotischen Moleküls als positiver prognostischer Marker für das Langzeit- und das rezidivfreie Überleben von Kopf-Hals-Tumor-Patienten dar (Tano et al. 2013). In der immunhistochemischen Untersuchung von Kopf-Hals-Tumoren hingegen zeichnet sich das umgekehrte Verhältnis bezüglich der Proteinexpression als prognostisch günstig ab. Eine starke BAX- und eine schwache BCL-2-Proteinexpression, also ein *BCL-2/BAX*-Verhältnis von ≤ 1 , ging hier mit einer guten 5-Jahres-Überlebens-Prognose einher (Zhang et al. 2009). Zusammenfassend wirken sich somit Apoptose-resistente PBMCs und Apoptose-sensible Tumorzellen positiv auf die Prognose von Kopf-Hals-Tumor-Patienten aus. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Untersuchung nicht reproduziert werden, da es keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kohorten gab. Der starke Anstieg in der BAX-Expression (Abb. 12b, S. 54) von Zeitpunkt 1 (vor der RCT) zu Zeitpunkt 3 (nach der RCT) in beiden Kohorten dieser Arbeit lässt sich durch die Apoptose-induzierende Wirkung der RCT erklären (Budworth et al. 2012).

4.4 Bedeutung von HMGB1 als prädiktiver Biomarker

Das Alarmin HMGB1 wies in dieser Untersuchung prätherapeutisch weder auf Genexpressionsebene im Vollblut noch auf Ebene der Zytokinkonzentration im Plasma auf eine mögliche Unterscheidung der beiden Patientengruppen hin und eignete sich daher nicht als prädiktiver Marker für die im Rahmen der RCT auftretenden Nebenwirkungen bei Kopf-Hals-Tumor-Patienten. Die Plasmakonzentration von HMGB1 sank im Laufe der Therapie in beiden Kohorten ab, in der Gruppe mit starken Nebenwirkungen fast signifikant ($p < 0,09$). Im Gegensatz dazu blieb die Genexpression hier gleich, während sie in der Kohorte mit schwachen Nebenwirkungen signifikant anstieg (Abb. 13 und 14, S. 55 und 57 respektive).

Die Referenzwerte der HMGB1-Plasmakonzentration gesunder Menschen liegen bei 2 bis 7 ng/ml – im Rahmen von entzündlichen Erkrankungen oder Tumoren steigen die Werte an (Sheng et al. 2009; Naumnik et al. 2010; Wu et al. 2013).

Bislang wurde einer stärkeren Expression von HMGB1 eine effektivere T-Zell-Antwort zugesprochen (Suzuki et al. 2012). In dieser Untersuchung konnte jedoch weder die Genexpressionsstärke noch die Plasmakonzentration mit dem Auftreten der HGAOT statistisch in Verbindung gebracht werden. HMGB1 kann als Reaktion auf Zytokine ak-

tiv sezerniert oder durch Nekrose passiv freigesetzt werden (Sims et al. 2010). Auch im Rahmen der RCT wird HMGB1 vermehrt in die Umgebung abgegeben und ist für die Vermittlung des immunogenen Effekts der Antitumorthherapie von Wichtigkeit (Apetoh et al. 2007). Die Platinderivate nehmen in der Reihe der Chemotherapeutika hinsichtlich dieses Effektes eine Sonderstellung ein. Sie scheinen aufgrund der DNA-Strangvernetzungen und der Bindung von HMGB1 im Kern zu verhindern, dass dieses die Zelle verlässt und im Serum in erhöhten Mengen messbar ist (Dong et al. 2007; Pilzweiger und Holdenrieder 2015). Dieser Mechanismus könnte erklären, warum die HMGB1-Konzentration im Verlauf der Therapie nicht oder nur in geringerem Maße ansteigen würde. Der Abfall der Plasmakonzentrationen in beiden Kohorten dieser Untersuchung und besonders in der Patientengruppe mit starken Nebenwirkungen kann hiermit jedoch nicht vollständig erklärt werden.

4.5 PBMCs als Prädiktoren für Nebenwirkungen der RCT bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren

Die Häufigkeit und Zusammensetzung der PBMCs sind wichtige Indikatoren für den Status des Immunsystems. Sie können sich im Rahmen von Erkrankungen und Tumortherapien verändern und haben in Abhängigkeit davon Einfluss auf die Tumorabwehr und das Outcome der Patienten (Bishara et al. 2008; Whiteside 2013; Huang et al. 2015).

Der vorliegenden Untersuchung zufolge gaben sowohl eine prätherapeutisch hohe prozentuale Fraktion an T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen als auch ein geringer Anteil an Monozyten sowie ein geringer Aktivierungsgrad der vorhandenen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen Hinweise auf die Entwicklung starker Nebenwirkungen im Laufe der RCT (Abb. 16 (S. 60) und Abb. 18 (S. 62)). Bei der Analyse der absoluten Zellzahlen gab zusätzlich eine große Anzahl an CD8⁺-T-Zellen Anhalt für eine starke Ausprägung der Therapieebeneffekte (Abb. 29f, S. 69). Diese prädiktiven Biomarker ermöglichten im untersuchten Kollektiv eine gute Vorhersage der Nebenwirkungstendenz im Laufe der RCT bei Kopf-Hals-Tumoren.

Im Rahmen einer Kopf-Hals-Tumor-Erkrankung liegen veränderte Zellzahlen im peripheren Blut vor. Umstritten ist, ob jeweils mehr oder weniger Leukozyten als bei gesunden Kontrollpersonen im Blut zirkulieren. In einer Untersuchung von Millrud et al. wurden erhöhte Leukozytenzahlen und ein höherer prozentualer Anteil an aktivierten und proliferierenden T-Zellen sowie NK-Zellen als bei Gesunden festgestellt (Millrud et al. 2012). Kuss et al. sowie Bose et al. zufolge können bei Patienten mit Kopf-Hals-

Tumoren im Vergleich zur Normalbevölkerung hingegen geringere Zahlen an T-Lymphozyten (Kuss et al. 2005) und Leukozyten insgesamt sowie eine verminderte Aktivierung der Zellen gemessen werden (Bose et al. 2008). Der Einfluss der Tumorerkrankung könnte somit die von der Norm abweichenden Leukozytenzahlen in der vorliegenden Arbeit erklären.

4.5.1 Eine hohe Monozytenzahl korrelierte mit einer schwachen Nebenwirkungsausprägung

Eine hohe relative sowie absolute Anzahl an Monozyten vor Beginn der Therapie korrelierte in dieser Untersuchung mit der Entwicklung schwacher Nebenwirkungen durch die RCT bei Kopf-Hals-Tumor-Patienten (Abb. 16b und 29b, S. 60 und 69, respektive).

Über den Zusammenhang zwischen prätherapeutisch untersuchten Monozyten und der Entwicklung von Nebenwirkungen durch die Tumorthherapie wurde im Gegensatz zur Korrelation mit dem Überleben in der Literatur bislang nicht berichtet. Einer Studie von Jiang et al. zufolge weisen niedrige Monozytenzahlen im peripheren Blut auf ein längeres Überleben von Patienten mit metastasiertem Nasopharynxkarzinom hin (Jiang R et al. 2015). Bei Patienten mit HPV-positivem Oropharynxkarzinom waren hohe Monozytenzahlen mit einem kürzeren Überleben der Patienten verbunden (Huang et al. 2015). Unter Berücksichtigung der Annahme, dass starke Nebenwirkungen mit längerem Überleben verbunden sind (Wolff et al. 2011), zeigen die Ergebnisse eine übereinstimmende Tendenz mit dieser Arbeit. Schlussfolgernd wären hohe prätherapeutisch gemessene Monozytenzahlen im peripheren Blut von Kopf-Hals-Tumor-Patienten unter RCT mit der Entwicklung schwacher Nebenwirkungen, einem verminderten Therapieeffekt und einem kürzeren (rezidivfreien) Überleben verbunden.

4.5.2 Lymphozyten als Biomarker für die Entwicklung starker Therapiebedingter Organtoxizität

Während bezüglich der Genexpression des T-Zellmarkers *CD3* im peripheren Vollblut keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kohorten festzustellen waren (Abb. 10, S. 50), wiesen die relativen und absoluten T- und B-Zellzahlen in der FACS-Analyse prätherapeutisch eine signifikante Differenz zwischen beiden Kohorten auf und eigneten somit als prädiktive Biomarker für die Entwicklung der HGAOT durch die RCT (Abb. 16a und c (S. 60) sowie 29a und c (S. 69)). In der absoluten Zellzahlanalyse korrelierten hohe $CD8^+$ -T-Zellzahlen zusätzlich zu den oben genannten Markern mit der Entwicklung der starken Therapie Nebenwirkungen (Abb. 29f, S. 69). Weitere Un-

tersuchungen zur direkten Korrelation der prätherapeutischen Lymphozytenzahl im peripheren Blut mit dem Schweregrad der Nebenwirkungen konnten in der Literatur bisher nicht gefunden werden. Gemäß Untersuchungen von Jiang et al. und Huang et al. korreliert eine hohe Lymphozytenzahl mit einem längeren Überleben bei metastasierten Nasopharynxkarzinomen bzw. HPV-positiven Oropharynxkarzinomen. Diese Beobachtung wäre mit den Befunden dieser Arbeit gut zu vereinbaren, auch wenn eine Unterscheidung in T- oder B-Zellen nicht durchgeführt wurde (Huang et al. 2015; Jiang R et al. 2015).

Die Ergebnisse hinsichtlich der CD8⁺-T-Zellzahl decken sich unter Annahme der Korrelation zwischen Nebenwirkungen und Überlebenswahrscheinlichkeit mit den Beobachtungen beim Pankreaskarzinom (Karakhanova et al. 2015) und der chronisch lymphatischen Leukämie (Gonzalez-Rodriguez et al. 2010), bei denen eine hohe Anzahl an CD8⁺-T-Zellen mit einer positiven Prognose korrelierte.

In der Analyse der Aktivierungsmarker CD69 und CD154 auf den CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen wiesen hohe prozentuale Anteile an aktivierten Zellen auf die Entwicklung schwacher Nebenwirkungen im Verlauf hin. Ausschließlich der Anteil der CD69⁺CD8⁺-Zellen korrelierte nicht mit den später gemessenen CTC-Scores (Abb. 18a-d, S. 62).

Es scheint widersinnig, dass die T-Zellen bei Patienten mit hohem CTC-Score einen geringeren Grad an Aktivierung aufweisen, als die T-Zellen der Patienten mit niedrigem CTC-Score. Verschiedene Untersuchungen weisen jedoch auf die höhere Sensitivität von aktivierten im Gegensatz zu inaktivierten T-Zellen unter anderem gegenüber der FasL-vermittelten Apoptose hin (Kabelitz und Janssen 1997; Uzzo et al. 1999). Das Fas-FasL-System spielt eine wichtige Rolle in der T-Zell-Selektion im Thymus und in der Regulation einer überschießenden T-Zell-vermittelten Immunantwort zur Verhinderung von Autoimmunität (Maher et al. 2002). Da Kopf-Hals-Tumoren, wie viele andere Tumorentitäten, vermehrt FasL auf ihrer Oberfläche exprimieren (Gastman et al. 1999), stellt dieser Zusammenhang einen Erklärungsansatz für die Unterschiede in der T-Zellaktivierung dar. T-Zellen mit geringer Aktivierung sind weniger anfällig für FasL-induzierte Apoptose und können somit eine stärkere Immunantwort generieren. Unterstützt wird diese These durch die Korrelation hoher Werte früher Aktivierungsmarker (z.B. CD69) auf T-Zellen von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren mit einer schlechteren Prognose (Aarstad et al. 2006).

4.5.3 NK-Zellzahl als Prädiktor toxischer Begleiterscheinungen

Die Zahl der NK-Zellen ermöglichte sowohl in der relativen als auch in der absoluten Zellanalyse eine signifikante Unterscheidung zwischen den beiden Patientengruppen. Dabei korrelierte eine hohe NK-Zellzahl mit der Entwicklung starker Nebenwirkungen durch die RCT bei Kopf-Hals-Tumoren (Abb. 16d und 29d, S. 60 und 69, respektive). Der Einfluss der Häufigkeit an NK-Zellen unter den zirkulierenden PBMCs auf die Entwicklung von Nebenwirkungen und die Prognose der Patienten wurde bisher im Gegensatz zu ihrer Bedeutung im Tumormikromilieu in der Literatur selten untersucht. In der lokalen Tumorkontrolle wirkt sich eine hohe NK-Tumorinfiltrationsdichte positiv auf die Prognose von Patienten mit Kolon-, Magen- und Lungenkarzinomen aus (Cheng et al. 2013) und weist somit auf den hohen Stellenwert der NK-Zellen in der Antitumorantwort hin.

4.5.4 Prädiktive Bedeutung der Zellzahlverhältnisse der PBMCs

Ein geringes prätherapeutisches Mono : T-Zell-Verhältnis korrelierte in dieser Untersuchung signifikant mit der Entwicklung hoher CTC-Scores im Verlauf der Therapie (Abb. 17a, S. 61). Das Verhältnis von T- zu B-Zellen, von CD4⁺- zu CD8⁺-T-Zellen oder von NK-Zellen zu Lymphozyten wies hingegen keine Signifikanz im Bezug auf die Nebenwirkungstendenz auf (Abb. 17b-d, S. 61). In der Literatur wurde bisher nur das Verhältnis von Neutrophilen zu Lymphozyten als prädiktive Biomarker genauer untersucht. Nach Guthrie et al. weist ein hohes Neutrophilen : Lymphozyten-Verhältnis auf eine schlechte Prognose bei verschiedenen Tumoren, unter anderem Lungen-, Magen-, Pankreas- und Lebertumoren hin (Guthrie et al. 2013). Auch in der Tumorentität der Kopf-Hals-Tumoren ist ein hohes Neutrophilen : Lymphozyten-Verhältnis mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet (Charles et al. 2016). Unter erneuter Hinzunahme der Verbindung zwischen Nebenwirkungsausprägung und Überlebenswahrscheinlichkeit stehen die Ergebnisse dieser Untersuchung im Konsens mit der Literatur.

4.6 Korrelation der Intensität der histologischen T-Zellinfiltration mit der Entwicklung starker Nebenwirkungen durch RCT bei HNSCC

Die Zusammensetzung der PBMCs spiegelt den Zustand des Immunsystems wider und spielt eine wichtige Rolle in der Tumorzellelimination und Nebenwirkungsentwicklung. Die lokale Immunantwort hingegen wird durch die einzelnen Komponenten des Tumormikromilieus und ihre Interaktionen bestimmt. Die Immunhistochemie von Tumorsektaten stellt dadurch eine Momentaufnahme des Immunstatus vor Ort dar, die

wichtige Schlüsse mit Signifikanz für Patienten und behandelnde Ärzte - beispielsweise zur Prognose - ermöglicht (Galon et al. 2006; Mlecnik et al. 2011).

In dieser Untersuchung korrelierte die Intensität der Tumordinfiltration durch CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen untereinander und mit der Stärke der entwickelten Organtoxizität (Abb. 42, S. 79). Eine starke T-Zell-Infiltration von Kopf-Hals-Tumoren wird auch in der Literatur als prognostisch günstiger Marker für das Therapieansprechen und das Überleben beschrieben (Balermipas et al. 2014; Punt et al. 2016). Zur Korrelation mit der Nebenwirkungstendenz bei RCT wurden bisher keine Daten veröffentlicht. Die Ergebnisse fügen sich jedoch unter der Annahme der Korrelation zwischen Nebenwirkungen und Überlebenswahrscheinlichkeit in den Kontext der aktuellen Studien ein (Tehrany et al. 2015).

4.7 Limitationen dieser Arbeit

Diese Untersuchung bietet einen Erklärungsansatz dafür, dass die individuell unterschiedliche Zusammensetzung des Immunsystems vor Beginn der Therapie bei Patienten mit fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren mit der Entwicklung der HGAOT unter RCT korreliert. Trotz der signifikanten Ergebnisse birgt diese Arbeit folgende Limitationen:

1. Die immunhistochemische Untersuchung von Tumorsektaten ist technisch aufwendig und anspruchsvoll. Dabei sind die Biopsien nicht unbedingt repräsentativ für das gesamte Gewebe und das Scoring-System ist semiquantitativ und schwierig zu standardisieren.
2. Die *CD3*-Genexpression wies keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Kohorten auf (Abb. 10, S. 50) während die FACS-Analyse in der Patientengruppe mit HGAOT signifikant höhere T-Zellzahlen ergab (Abb. 16a (S. 60) und Abb. 29a (S. 69)). Dieser Unterschied kann zum einen dadurch erklärt werden, dass die zwei Biomarker aus unterschiedlichen Materialien gewonnen wurden: die RT-qPCR wurde anhand von Gesamtblut durchgeführt, während in der FACS-Analyse nur PBMCs untersucht wurden. Zum anderen entsprechen die untersuchten Zellen nicht der physiologischen Verteilung im Blut (ca. 20-40 % Lymphozyten und 1-6 % Monozyten). Das liegt daran, dass eine Tumorerkrankung die Zusammensetzung der PBMCs verändern kann (Kuss et al. 2005; Bose et al. 2008; Millrud et al. 2012). Außerdem wurden in der FACS-Analyse auf Basis der Vorwärts- und Seitstreuung nur die lebenden Zellen untersucht. Da Lymphozyten sensibler gegenüber Apoptose sind als andere Zellarten, wie beispielsweise Monozyten, wurde diese Fraktion durch das Auftauen, Zentrifugieren und die Färbebehandlung deutlich kleiner.

3. HMGB1 wird freigesetzt, wenn Zellen apoptotisch oder nekrotisch werden. Auch im Umgang mit den gesammelten Serumproben handelt es sich um einen sensiblen Marker, der beispielsweise nach Inkubation bei Raumtemperatur verfälscht hohe Werte ergeben kann (Nowak et al. 2012). Die hier verwendeten Proben waren vorher eingefroren. Ein Einfluss der Temperaturwechsel auf die Messergebnisse kann nicht ausgeschlossen werden.
4. Die bisherige Austestung der möglichen prädiktiven Biomarker fand an der gleichen Kohorte statt, aus der die Biomarker entstammten. Nur eine prospektive Studie kann die wirkliche Aussagekraft der Biomarker bestätigen. In einer ersten prospektiven Studie erwiesen sich die absoluten T-Zellen (*Cutoff*-Wert: 0,25 Mio/ml) und CD8⁺-T-Zellen (*Cutoff*-Wert: 0,1 Mio/ml) als aussagekräftig (Beschel et al. 2016).
5. Auch wenn diese Arbeit experimentelle, präklinische Ansätze bietet, um die Therapie der Kopf-Hals-Tumoren zu optimieren und individueller zu gestalten, kann im Rahmen dieses experimentellen Settings nicht eingeschätzt werden, welchen Stellenwert das längere Überleben im Vergleich zu möglichen Einbußen der Lebensqualität durch die Nebenwirkungen für den einzelnen Patienten hat.

4.8 Klinische Relevanz und Ausblick

Die vorliegende Untersuchung liefert erste Ergebnisse zur Beziehung zwischen Immunsystem und später entwickeltem Stärkegrad an Nebenwirkungen durch die RCT bei Kopf-Hals-Tumor-Patienten. Eine Vorhersage der im Laufe der Therapie auftretenden Nebenwirkungen könnte die Anpassung der Therapieintensität an die Nebenwirkungstendenz der jeweiligen Patienten ermöglichen und hätte somit direkten Einfluss auf die Prognose und die Lebensqualität von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren.

Die in früheren Studien beobachtete Korrelation zwischen HGAOT und Prognose (Bonner et al. 2010; Wolff et al. 2011) suggeriert, dass die gleichen intrinsischen immunologischen Faktoren, die für die toxischen Nebenwirkungen verantwortlich sind, auch den Therapieeffekt vermitteln und somit die Prognose und das *Outcome* bestimmen könnten.

In dieser Untersuchung war das peritumorale Stroma von Patienten, die starke Nebenwirkungen entwickelten, mit T-Zellen angereichert, die Genexpression in peripheren Blutzellen und die Konzentration an löslichen Entzündungsfaktoren im Blut zeigten jedoch keine Koinzidenz mit dem späteren Grad an Toxizität. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Frequenz und die absolute Anzahl der Leukozyten-Subpopulationen vor Beginn der RCT signifikant zwischen beiden Kohorten. Allen voran das Mono : T-Verhältnis (Abb. 26, S. 67), gefolgt von der relativen Monozytenzahl (Abb. 20, S. 65)

sowie der relativen (Abb. 24, S. 67) und absoluten T-Zellzahl (Abb. 33, S. 72) wiesen aufgrund ihrer hohen AUC-Werte mit niedrigen P-Werten ein besonders hohes prädiktives Potential auf.

Welche Biomarker mit welchen jeweiligen *Cutoff*-Werten sich letztendlich am ehesten für die klinische Umsetzung eignen, sollte in prospektiven Untersuchungen evaluiert werden. In einer ersten prospektiven Studie zur Anwendung der prädiktiven Biomarker aus dieser Untersuchung zeigten sich die absoluten T-Zellen (*Cutoff*-Wert: 0,25 Mio/ml) und CD8⁺-T-Zellen (*Cutoff*-Wert: 0,1 Mio/ml) als besonders aussagekräftig. Beide Biomarker ließen in einer Kohorte von 16 Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren zu jeweils 81,3 % eine korrekte Vorhersage über die Entwicklung von HGAOT zu. Die relativen T-Zell- und Monozytenzahlen sowie das Mono : T-Zell-Verhältnis erwiesen sich in der prospektiven Studie als schwächere Prädiktoren. Ihre Aussagekraft lag bei 68,8 % korrekter Vorhersagewahrscheinlichkeit (Beschel et al. 2016).

Die Konsequenz einer intensiveren Therapie mit stärkerer Bestrahlung, höherer Chemotherapiedosis oder der Hinzunahme weiterer Therapeutika würde aller Wahrscheinlichkeit zufolge zu stärkeren Nebeneffekten führen. Eine Untersuchung dieser Zusammenhänge wäre ethisch abzuwägen. Außerdem ergibt sich die Diskussion über den Stellenwert einer hohen Sensitivität bzw. Spezifität der Biomarker. Mit einer stärkeren Gewichtung der Sensitivität würde ein Großteil der Patienten mit starken Nebenwirkungen detektiert werden. Diese reagieren angemessen auf die derzeitige Standardtherapie und profitieren von ihr. Gefahr dieser Herangehensweise ist, dass Patienten mit schwacher Nebenwirkungstendenz fälschlicherweise dieser Kohorte zugewiesen werden könnten und somit keine für sie ausreichend intensive Therapie erhalten würden. Eine Betrachtung unter diesem Aspekt spräche für eine stärkere Gewichtung der Spezifität, wodurch ein Großteil der Patienten mit niedrigem CTC-Score erkannt und als Konsequenz intensiver therapiert werden könnte. Bei diesem Lösungsansatz steigt jedoch die Wahrscheinlichkeit, dass Patienten mit der Tendenz zu schwerwiegenden toxischen Nebenwirkungen fälschlicherweise zur Patientengruppe mit niedrigem CTC-Score zugeordnet werden, eine exazerbierte Therapie erhalten und somit unter womöglich noch stärkeren Begleiterscheinungen zu leiden haben. Welche der beiden Herangehensweisen ethisch vertretbar, vorzuziehen und überhaupt klinisch umsetzbar ist, sollte von Ärzten, welche die Folgen der Entscheidung für eine der beiden Gewichtungen einschätzen können, thematisiert und mit betroffenen Patienten diskutiert werden.

Eine weitere Verbesserungsmöglichkeit zur Vorhersage der Nebenwirkungen und des Therapieansprechens wäre eine Kombination verschiedener prädiktiver Biomarker.

Zum einen könnten zwei immunologische Marker kombiniert werden, zum anderen könnten bereits verwendete Marker, wie der Gesundheitszustand des Patienten oder das Tumorstadium, hinzugezogen werden. Dadurch könnten eventuell sowohl Sensitivität als auch Spezifität weiter gesteigert und somit mehr Sicherheit für die Patienten gewonnen werden.

Die Gruppe der Kopf-Hals-Tumoren ist aufgrund unterschiedlicher Lokalisationen und Ätiologie sehr heterogen. Trotzdem wurden in dieser Arbeit signifikante Biomarker für die Entwicklung der HGAOT gefunden. Eventuell ist dadurch eine Übertragung der Parameter auf andere Tumoren vom Plattenepithelzelltyp wie beispielsweise Ösophagus- und Bronchialkarzinome möglich. Zur Prüfung dieser These wären prospektive klinische Studien wünschenswert, die nicht nur die Korrelation von immunologischen Markern mit dem Auftreten von HGAOT sondern auch ihren direkten Zusammenhang mit dem Überleben evaluieren.

Zusammenfassend kann die eingangs formulierte Frage, ob und wenn ja welche Biomarker die Entwicklung von Nebenwirkungen durch die RCT bei Kopf-Hals-Tumorpatienten vorhersagen können, bejaht werden. Bei der Analyse von Zytokinen im Blut, der Genexpression der Zellen des Gesamtbluts, der Tumordinfiltrationsstärke durch T-Zellen und der relativen und absoluten Häufigkeitsverteilung der PBMCs hat sich insbesondere Letzteres als aussagekräftig erwiesen. Eine prätherapeutische Blutentnahme mit Quantifizierung der einzelnen Immunzellpopulationen könnte technisch relativ einfach umgesetzt werden und nach ausgiebiger Evaluation und Weiterentwicklung dieser Ergebnisse den Lauf der Therapie und somit auch das (Über-) Leben von Tumorpatienten entscheidend verändern.

5 Zusammenfassung

Die Therapie der Kopf-Hals-Tumoren besteht aus einem multimodalen Konzept, bei dem sowohl Chirurgie, Radio(chemo)therapie (RCT) als auch neue immunmodulierende Ansätze zum Einsatz kommen. Trotz neuer Behandlungsschemata mit dem Ziel, die Prognose zu verbessern, erhöhen intensivierete Therapien auch das Risiko für eine starke akute Organtoxizität (*high grade acute organ toxicity* = HGAOT). Diese Nebenwirkungen können die Lebensqualität der Patienten stark einschränken und aufgrund ihres behandlungslimitierenden Einflusses die lokale Tumorkontrolle gefährden. Die unterschiedlich stark ausfallende Immunreaktion, die das tumorumgebende gesunde Gewebe schädigt und so für die Toxizität mitverantwortlich ist, greift in erster Linie den Tumor selbst an und trägt somit wesentlich zum Therapieeffekt bei. Dieser Zusammenhang könnte das längere rezidivfreie Überleben von Patienten mit stärkerer Organtoxizität erklären. Eine Vorhersage dieser immunvermittelten Nebenwirkungstendenz könnte zu individualisierten Behandlungsansätzen führen und somit sowohl die Nebenwirkungen vermindern als auch den Antitumoreffekt verstärken.

Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung potentiell prädiktiver immunologischer Parameter aus Blutproben und Tumormaterial von 48 Kopf-Hals-Tumor-Patienten mittels RT-qPCR, ELISA, Immunhistochemie und FACS für die Vorhersage einer HGAOT durch die RCT. Es zeigte sich, dass sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Zellen im tumorumgebenden Bindegewebe von Patienten, die eine HGAOT entwickelten, angereichert waren. Die Plasmakonzentrationen von IFN γ , IL-6, TNF α und IL-2 sowie die Genexpression einer Auswahl von 11 entzündungsmodulierenden Genen hingegen korrelierte nicht mit der Entwicklung toxischer Nebenwirkungen durch die RCT oder wies eine starke Streuung auf. Im Gegensatz dazu unterschied sich sowohl die relative als auch die absolute prätherapeutische Häufigkeit von T-/B-/NK-Zellen und Monozyten signifikant zwischen der Patientenkohorte mit HGAOT und der ohne.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die FACS-Analyse mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut zu Beginn der Therapie eine potentiell geeignete Strategie darstellt, um Patienten mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung akuter Nebenwirkungen durch die RCT zu identifizieren. Durch die Kenntnis des individuellen Risikos für die Entwicklung schwerer Organtoxizität, könnte das Therapieschema noch vor Behandlungsbeginn an die Aktivität des jeweiligen Immunsystems angepasst werden, um auf diese Weise sowohl die Lebensqualität der Patienten als auch ihr klinisches *Outcome* zu verbessern.

Teile dieser Dissertation sind bereits in folgender Fachzeitschrift veröffentlicht:

Beschel LM, Leu M, Reichardt SD, Rave-Fränk M, Schirmer MA, Stadelmann C, Canis M, Wolff HA, Reichardt HM (2016): T cell abundance in blood predicts acute organ toxicity in chemoradiotherapy for head and neck cancer. *Oncotarget* 7, 65902–65915

6 Literaturverzeichnis

Aarstad HJ, Heimdal J-H, Klementsens B, Olofsson J, Ulvestad E (2006): Presence of activated T lymphocytes in peripheral blood of head and neck squamous cell carcinoma patients predicts impaired prognosis. *Acta Otolaryngol* 126, 1326-1333

Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, et al. (2007): Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 13, 1050-1059

Arıcan O, Aral M, Sasmaz S, Ciragil P (2005): Serum Levels of TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in Patients With Active Psoriasis and Correlation With Disease Severity. *Mediators Inflamm* 2005, 273-279

Baatenburg de Jong RJ, Hermans J, Molenaar J, Briaire JJ, le Cessie S (2001): Prediction of survival in patients with head and neck cancer. *Head Neck* 23, 718-724

Báez A (2008): Genetic and environmental factors in head and neck cancer genesis. *J Environ Sci Health Part C* 26, 174-200

Baine MJ, Mallya K, Batra SK (2013): Quantitative real-time PCR expression analysis of peripheral blood mononuclear cells in pancreatic cancer patients. *Methods Mol Biol* 980, 157-173

Balermipas P, Michel Y, Wagenblast J, Seitz O, Weiss C, Rödel F, Rödel C, Fokas E (2014): Tumour-infiltrating lymphocytes predict response to definitive chemoradiotherapy in head and neck cancer. *Br J Cancer* 110, 501-509

Becher H, Ramroth H, Ahrens W, Risch A, Schmezer P, Dietz A (2005): Occupation, exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and laryngeal cancer risk. *Int J Cancer* 116, 451-457

Bertazza L, Mocellin S (2010): The dual role of tumor necrosis factor (TNF) in cancer biology. *Curr Med Chem* 17, 3337-3352

Beschel LM, Leu M, Reichardt SD, Rave-Fränk M, Schirmer MA, Stadelmann C, Canis M, Wolff HA, Reichardt HM (2016): T cell abundance in blood predicts acute organ toxicity in chemoradiotherapy for head and neck cancer. *Oncotarget* 7, 65902–65915

Bierie B, Moses HL (2010): Transforming growth factor beta (TGF-beta) and inflammation in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 21, 49-59

Bishara S, Griffin M, Cargill A, Bali A, Gore ME, Kaye SB, Shepherd JH, Van Trappen PO (2008): Pre-treatment white blood cell subtypes as prognostic indicators in ovarian cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 138, 71-75

Blanchard P, Baujat B, Holostenco V, Bourredjem A, Baey C, Bourhis J, Pignon J-P, MACH-CH Collaborative group (2011): Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): a comprehensive analysis by tumour site. *Radiother Oncol* 100, 33-40

Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Cohen RB, Jones CU, Sur RK, Raben D, Baselga J, Spencer SA, Zhu J, et al. (2010): Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol* 11, 21-28

Bordón E, Henríquez-Hernández LA, Lara PC, Ruíz A, Pinar B, Rodríguez-Gallego C, Lloret M (2010): Prediction of clinical toxicity in locally advanced head and neck cancer patients by radio-induced apoptosis in peripheral blood lymphocytes (PBLs). *Radiat Oncol* 5, 4

Bose A, Chakraborty T, Chakraborty K, Pal S, Baral R (2008): Dysregulation in immune functions is reflected in tumor cell cytotoxicity by peripheral blood mononuclear cells from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer Immun* 8, 10

Budworth H, Snijders AM, Marchetti F, Mannion B, Bhatnagar S, Kwoh E, Tan Y, Wang SX, Blakely WF, Coleman M, et al. (2012): DNA Repair and Cell Cycle Biomarkers of Radiation Exposure and Inflammation Stress in Human Blood. *PLOS ONE* 7, e48619

Burkholder B, Huang RY, Burgess R, Luo S, Jones VS, Zhang W, Lv ZQ, Gao CY, Wang BL, Zhang YM, Huang RP (2014): Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer* 1845, 182-201

Charles KA, Harris BDW, Haddad CR, Clarke SJ, Guminski A, Stevens M, Dodds T, Gill AJ, Back M, Veivers D, Eade T (2016): Systemic inflammation is an independent predictive marker of clinical outcomes in mucosal squamous cell carcinoma of the head and neck in oropharyngeal and non-oropharyngeal patients. *BMC Cancer* 16, 124

Chen DS, Mellman I (2013): Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 39, 1-10

Chen MF, Chen PT, Lu MS, Lin PY, Chen WC, Lee KD (2013): IL-6 expression predicts treatment response and outcome in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Mol Cancer* 12, 26

Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC, Smith CW, Enamorado I, Yeh

NT, Kroog GS, Rudy S, et al. (1999): Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 5, 1369-1379

Cheng M, Chen Y, Xiao W, Sun R, Tian Z (2013): NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol Immunol* 10, 230-252

Chua ML, Wee JT, Hui EP, Chan AT (2015): Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet* 387, 1012-1024

Conti-Freitas LC, Foss-Freitas MC, Mamede RCM, Foss NT (2012): Interferon-gamma and interleukin-10 production by mononuclear cells from patients with advanced head and neck cancer. *Clin São Paulo Braz* 67, 587-590

Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, Kish JA, Kim HE, Cmelak AJ, Rotman M, et al. (2004): Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 350, 1937-1944

Coussens LM, Werb Z (2002): Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860-867

CTCAE

v3.0. https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/ctcae3.pdf; Zugriff am 27.09.2016

CTCAE v4.0. https://www.eortc.be/services/doc/ctc/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_5x7.pdf; Zugriff am 20.12.2015

Curry JM, Sprandio J, Cognetti D, Luginbuhl A, Bar-ad V, Pribitkin E, Tuluc M (2014): Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Oncol* 41, 217-234

Dancea HC, Shareef MM, Ahmed MM (2009): Role of Radiation-induced TGF-beta Signaling in Cancer Therapy. *Mol Cell Pharmacol* 1, 44-56

Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho C-H, Lippman SM, Tsao AS (2010): Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol* 2, 15

Denaro N, Merlano MC, Russi EG (2013): Dysphagia in Head and Neck Cancer Patients: Pretreatment Evaluation, Predictive Factors, and Assessment during Radio-Chemotherapy, Recommendations. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 6, 117-126

Denham JW, Hauer-Jensen M (2002): The radiotherapeutic injury--a complex „wound“. *Radiother Oncol* 63, 129-145

Diagnostic tests; Chapter 4, Diagnosis I/8 – University of

gia. <http://ebp.uga.edu/courses/Chapter%204%20-%20Diagnosis%20I/8%20-%20ROC%20curves.html>; Zugriff am 26.09.2016

Dirix P, Nuyts S, Van den Bogaert W (2006): Radiation-induced xerostomia in patients with head and neck cancer. *Cancer* 107, 2525-2534

Dong XDE, Ito N, Lotze MT, DeMarco RA, Popovic P, Shand SH, Watkins S, Winikoff S, Brown CK, Bartlett DL, others (2007): High mobility group box I (HMGB1) release from tumor cells after treatment: implications for development of targeted chemoimmunotherapy. *J Immunother* 30, 596-606

Driessens G, Kline J, Gajewski TF (2009): Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. *Immunol Rev* 229, 126-144

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004): The three Es of cancer immunoeediting. *Annu Rev Immunol* 22, 329-360

Duray A, Ile, Demoulin S, Hubert P, Delvenne P, Saussez S, Duray A, Ile, Demoulin S, et al. (2009): Immune Suppression in Head and Neck Cancers: A Review. *Clin Dev Immunol* 2010, e701657

Ebrahimi B, Tucker SL, Li D, Abbruzzese JL, Kurzrock R (2004): Cytokines in pancreatic carcinoma: correlation with phenotypic characteristics and prognosis. *Cancer* 101, 2727-2736

Epstein JB, Kish RV, Hallajian L, Sciubba J (2015): Head and neck, oral, and oropharyngeal cancer: a review of medicolegal cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 119, 177-186

Falschlehner C, Schaefer U, Walczak H (2009): Following TRAIL's path in the immune system. *Immunology* 127, 145-154

Fan CY (2001): Genetic alterations in head and neck cancer: interactions among environmental carcinogens, cell cycle control, and host DNA repair. *Curr Oncol Rep* 3, 66-71

Feng AL, Zhu JK, Sun JT, Yang MX, Neckenig MR, Wang XW, Shao QQ, Song BF, Yang QF, Kong BH, Qu X (2011): CD16+ monocytes in breast cancer patients: expanded by monocyte chemoattractant protein-1 and may be useful for early diagnosis. *Clin Exp Immunol* 164, 57-65

Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Ströbel M, Ziegler-Heitbrock HW (1993): The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* 82, 3170-3176

- Finn OJ (2008): Cancer immunology. *N Engl J Med* 358, 2704-2715
- Fisher DT, Appenheimer MM, Evans SS (2014): The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. *Semin Immunol* 26, 38-47
- Fogh S, Yom SS (2014): Symptom management during the radiation oncology treatment course: a practical guide for the oncology clinician. *Semin Oncol* 41, 764-775
- Freedman ND, Park Y, Subar AF, Hollenbeck AR, Leitzmann MF, Schatzkin A, Abnet CC (2008): Fruit and vegetable intake and head and neck cancer risk in a large United States prospective cohort study. *Int J Cancer* 122, 2330-2336
- Frey AB (2015): Suppression of T cell responses in the tumor microenvironment. *Vaccine* 33, 7393-7400
- Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J (2012): The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 12, 298-306
- Fruci D, Benevolo M, Cifaldi L, Lorenzi S, Lo Monaco E, Tremante E, Giacomini P (2012): Major histocompatibility complex class I and tumour immuno-evasion: how to fool T cells and natural killer cells at one time. *Curr Oncol* 19, 39-41
- Fucikova J, Moserova I, Urbanova L, Bezu L, Kepp O, Cremer I, Salek C, Strnad P, Kroe-mer G, Galluzzi L, Spisek R (2015): Prognostic and Predictive Value of DAMPs and DAMP-Associated Processes in Cancer. *Front Immunol* 6, 402
- Gale N, Pilch BZ, Sidransky D, El Naggar A, Westra W, Califano J, Johnson N, MacDonald DG: Epithelial precursor lesions. In: Barnes L, Eveson J W, Reichart P, Sidransky D (Hrsg.): *Pathology & Genetics Head and Neck Tumours*. IARC Press, Lyon 2005, 177-179
- Gallimore AM, Simon AK (2008): Positive and negative influences of regulatory T cells on tumour immunity. *Oncogene* 27, 5886-5893
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, et al. (2006): Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960-1964
- Garavello W, Ciardo A, Spreafico R, Gaini RM (2006): Risk factors for distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132, 762-766
- Garibyan L, Avashia N (2013): Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol* 133, 1-4
- Gastman BR, Atarshi Y, Reichert TE, Saito T, Balkir L, Rabinowich H, Whiteside TL (1999): Fas ligand is expressed on human squamous cell carcinomas of the head and neck, and it promotes apoptosis of T lymphocytes. *Cancer Res* 59, 5356-5364

- Gildener-Leapman N, Ferris RL, Bauman JE (2013): Promising systemic immunotherapies in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 49, 1089-1096
- Gillison ML, Chaturvedi AK, Lowy DR (2008): HPV prophylactic vaccines and the potential prevention of noncervical cancers in both men and women. *Cancer* 113, 3036-3046
- Gonzalez-Rodriguez AP, Contesti J, Huergo-Zapico L, Lopez-Soto A, Fernández-Guizán A, Acebes-Huerta A, Gonzalez-Huerta AJ, Gonzalez E, Fernandez-Alvarez C, Gonzalez S (2010): Prognostic significance of CD8 and CD4 T cells in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 51, 1829-1836
- Gordon S, Taylor PR (2005): Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953-964
- Gorelik L, Flavell RA (2002): Transforming growth factor- β in T-cell biology. *Nat Rev Immunol* 2, 46-53
- Guha N, Boffetta P, Wünsch Filho V, Eluf Neto J, Shangina O, Zaridze D, Curado MP, Koifman S, Matos E, Menezes A, et al. (2007): Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. *Am J Epidemiol* 166, 1159-1173
- Guthrie GJK, Charles KA, Roxburgh CSD, Horgan PG, McMillan DC, Clarke SJ (2013): The systemic inflammation-based neutrophil-lymphocyte ratio: Experience in patients with cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 88, 218-230
- Haberland J, Wolf U, Barnes B, Bertz J, Dahm S, Laudi A, Kraywinkel K (2012): Kurzfristige Prognosen der Krebsmortalität in Deutschland bis 2015. *UMID* 3, 17-23
- Hadrup S, Donia M, Thor Straten P (2013): Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron* 6, 123-133
- Hanahan D, Weinberg RA (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70
- Hanahan D, Weinberg RA (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674
- Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, et al. (2009): Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 18, 541-550
- Head and Neck Tumors | Cancer Network. <http://www.cancernetwork.com/cancer-management/head-and-neck-tumors>; Zugriff am 20.12.2016
- Hennessey PT, Westra WH, Califano JA (2009): Human papillomavirus and head and

neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications. *J Dent Res* 88, 300-306

Hill JJ, Tremblay T-L, Cantin C, O'Connor-McCourt M, Kelly JF, Lenferink AEG (2009): Glycoproteomic analysis of two mouse mammary cell lines during transforming growth factor (TGF)-beta induced epithelial to mesenchymal transition. *Proteome Sci* 7, 2

Hoffmann TK, Dworacki G, Tsukihito T, Meidenbauer N, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL (2002): Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. *Clin Cancer Res* 8, 2553-2562

Huang SH, Waldron JN, Milosevic M, Shen X, Ringash J, Su J, Tong L, Perez-Ordóñez B, Weinreb I, Bayley AJ, et al. (2015): Prognostic value of pretreatment circulating neutrophils, monocytes, and lymphocytes in oropharyngeal cancer stratified by human papillomavirus status. *Cancer* 121, 545-555

Hymes SR, Strom EA, Fife C (2006): Radiation dermatitis: clinical presentation, pathophysiology, and treatment 2006. *J Am Acad Dermatol* 54, 28-46

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011): Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61, 69-90

Ji H, Houghton AM, Mariani TJ, Perera S, Kim CB, Padera R, Tonon G, McNamara K, Marconcini LA, Hezel A, et al. (2006): K-ras activation generates an inflammatory response in lung tumors. *Oncogene* 25, 2105-2112

Jiang R, Cai X-Y, Yang Z-H, Yan Y, Zou X, Guo L, Sun R, Luo D-H, Chen Q-Y, Huang P-Y, et al. (2015): Elevated peripheral blood lymphocyte-to-monocyte ratio predicts a favorable prognosis in the patients with metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Chin J Cancer* 34, 237-246

Jiang Y, Li Y, Zhu B (2015): T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis* 6, e1792

Kabelitz D, Janssen O (1997): Antigen-induced death of T-lymphocytes. *Front Biosci* 2, 61-77

Karakhanova S, Ryschich E, Mosl B, Harig S, Jäger D, Schmidt J, Hartwig W, Werner J, Bazhin AV (2015): Prognostic and predictive value of immunological parameters for chemoradioimmunotherapy in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer* 112, 1027-1036

Kaskas NM, Moore-Medlin T, McClure GB, Ekshyyan O, Vanchiere JA, Nathan CO (2014): Serum biomarkers in head and neck squamous cell cancer. *JAMA Otolaryngol Neck Surg* 140, 5-11

- Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, Morita Y, Okamoto A, Kawashima M, Iwahashi M, Ueno A, Ohmoto Y, Makino H (2002): CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 46, 2578-2586
- Khan NR, Khan AN, Waris E, Suleman BA, Khan AA (2014): Ck AE1/AE3 Tumor Marker Expression in SCC of Head and Neck. *Cell Biol Res Ther* 3
- Kleiner G, Marcuzzi A, Zanin V, Monasta L, Zauli G, Kleiner G, Marcuzzi A, Zanin V, Monasta L, Zauli G (2013): Cytokine Levels in the Serum of Healthy Subjects. *Mediat Inflamm* 2013, e434010
- Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg.) und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (Hrsg.), Robert Koch-Institut, Berlin 2013
- Kreimer AR, Alberg AJ, Daniel R, Gravitt PE, Viscidi R, Garrett ES, Shah KV, Gillison ML (2004): Oral human papillomavirus infection in adults is associated with sexual behavior and HIV serostatus. *J Infect Dis* 189, 686-698
- Kuss I, Hathaway B, Ferris RL, Gooding W, Whiteside TL (2005): Imbalance in absolute counts of T lymphocyte subsets in patients with head and neck cancer and its relation to disease. *Adv Otorhinolaryngol* 62, 161-172
- Kutler DI, Auerbach AD, Satagopan J, Giampietro PF, Batish SD, Huvos AG, Goberdhan A, Shah JP, Singh B (2003): High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 129, 106-112
- Lee DH, Kim MJ, Roh JL, Kim SB, Choi SH, Nam SY, Kim SY (2012): Distant metastases and survival prediction in head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol--Head Neck Surg* 147, 870-875
- Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH (2011): The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 11, 9-22
- Leitlinie Mundhöhlenkarzinom. Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms. Version 2.0, 12.2012
on) http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/007_1000Lm_S3_Mundhoehlenkarzinom_112012-verlaengert.pdf; Zugriff am 27.08.2016
- Leng SX, McElhaney JE, Walston JD, Xie D, Fedarko NS, Kuchel GA (2008): ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 63, 879-884
- Li Q, Prince ME, Moyer JS (2015): Immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 51, 299-304

- Li XY, Li Z, An GJ, Liu S, Lai YD (2014): Co-expression of perforin and granzyme B genes induces apoptosis and inhibits the tumorigenicity of laryngeal cancer cell line Hep-2. *Int J Clin Exp Pathol* 7, 978-986
- Liu VC, Wong LY, Jang T, Shah AH, Park I, Yang X, Zhang Q, Lonning S, Teicher BA, Lee C (2007): Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J Immunol Baltim Md* 1950 178, 2883-2892
- Liu Y, Prasad R, Wilson SH (2010): HMGB1: roles in base excision repair and related function. *Biochim Biophys Acta* 1799, 119-130
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2000): *Molecular Cell Biology*. 4th edition; W. H. Freeman, New York 2000
- Ma J, Jin L, Li YD, He C, Guo X, Liu R, Yang YY, Han S, Ma J, Jin L, et al. (2014): The Intensity of Radiotherapy-Elicited Immune Response Is Associated with Esophageal Cancer Clearance. *J Immunol Res* 2014, e794249
- Maher S, Toomey D, Condrón C, Bouchier-Hayes D (2002): Activation-induced cell death: The controversial role of Fas and Fas ligand in immune privilege and tumour counterattack. *Immunol Cell Biol* 80, 131-137
- Marks JE (1997): Mucosal protectants and their application for head and neck chemoradiation. *Curr Opin Oncol* 9, 267-273
- Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA (2010): HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol* 11, 781-789
- Meirovitz A, Kuten M, Billan S, Abdah-Bortnyak R, Sharon A, Peretz T, Sela M, Schaffer M, Barak V (2010): Cytokines levels, severity of acute mucositis and the need of PEG tube installation during chemo-radiation for head and neck cancer--a prospective pilot study. *Radiat Oncol* 5, 16
- Meyer F, Fortin A, Wang CS, Liu G, Bairati I (2012): Predictors of Severe Acute and Late Toxicities in Patients With Localized Head-and-Neck Cancer Treated With Radiation Therapy. *Int J Radiat Oncol* 82, 1454-1462
- Millrud CR, Kvarnhammar AM, Uddman R, Björnsson S, Riesbeck K, Cardell LO (2012): The Activation Pattern of Blood Leukocytes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Is Correlated to Survival. *PLoS ONE* 7, 51120

- Miyamoto Y, Hosotani R, Doi R, Wada M, Ida J, Tsuji S, Kawaguchi M, Nakajima S, Kobayashi H, Masui T, Imamura M (2001): Interleukin-6 inhibits radiation induced apoptosis in pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* 21, 2449-2456
- Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, Bruneval P, Trajanoski Z, Fridman W-H, Pagès F, Galon J (2011): Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol* 29, 610-618
- Murray PJ, Wynn TA (2011): Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11, 723-737
- Naumnik W, Nilklińska W, Ossolińska M, Chyczewska E (2010): Serum levels of HMGB1, survivin, and VEGF in patients with advanced non-small cell lung cancer during chemotherapy. *Folia Histochem Cytobiol* 47, 703-709
- Neville BW, Day TA (2002): Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 52, 195-215
- Nikakhlagh S, Ranjbari N, Khorami E, Saki N (2015): Association between Serum Levels of Interleukin-6 and Stage of Laryngeal Cancer. *Iran J Otorhinolaryngol* 27, 199-205
- Nowak P, Nystrom J, Troseid M (2012): High levels of HMGB1 in plasma may be due to ex vivo cell necrosis. *Anticancer Res* 32, 4067-4069
- Pico JL, Avila-Garavito A, Naccache P (1998): Mucositis: Its Occurrence, Consequences, and Treatment in the Oncology Setting. *Oncologist* 3, 446-451
- Pilzweiger C, Holdenrieder S (2015): Circulating HMGB1 and RAGE as Clinical Biomarkers in Malignant and Autoimmune Diseases. *Diagnostics* 5, 219-253
- Ploegh HL (2013): Logic of the immune system. *Cancer Immunol Res* 1, 5-10
- Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD (2015): Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol* 33, 1974-1982
- Proia NK, Paszkiewicz GM, Nascia MAS, Franke GE, Pauly JL (2006): Smoking and smokeless tobacco-associated human buccal cell mutations and their association with oral cancer--a review. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 15, 1061-1077
- Pulte D, Brenner H (2010): Changes in Survival in Head and Neck Cancers in the Late 20th and Early 21st Century: A Period Analysis. *Oncologist* 15, 994-1001
- Punt S, Dronkers EAC, Welters MJP, Goedemans R, Koljenović S, Bloemena E, Snijders PJF, Gorter A, van der Burg SH, de Jong RJB, Jordanova ES (2016): A beneficial tumor microenvironment in oropharyngeal squamous cell carcinoma is characterized by a

- high T cell and low IL-17+ cell frequency. *Cancer Immunol Immunother* 65, 393-403
- Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM (2007): Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 25, 267-296
- Rapidis AD, Wolf GT (2009): Immunotherapy of head and neck cancer: current and future considerations. *J Oncol* 2009, 346345
- Reichart PA, Philipsen HP (2005): Oral erythroplakia--a review. *Oral Oncol* 41, 551-561
- Reyes-Gibby CC, Anderson KO, Merriman KW, Todd KH, Shete SS, Hanna EE (2014): Survival patterns in squamous cell carcinoma of the head and neck: Pain as an independent prognostic factor for survival. *J Pain* 15, 1015-1022
- Richards DM, Hettinger J, Feuerer M (2013): Monocytes and macrophages in cancer: development and functions. *Cancer Microenviron* 6, 179-191
- Rousaleva I, Krepela E (2010): Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation (Review). *Int J Oncol* 37, 1361-1378
- Sabharwal R, Mahendra A, Moon NJ, Gupta P, Jain A, Gupta S (2014): Genetically altered fields in head and neck cancer and second field tumor. *South Asian J Cancer* 3, 151-153
- Schmidt H, Bastholt L, Geertsen P, Christensen IJ, Larsen S, Gehl J, von der Maase H (2005): Elevated neutrophil and monocyte counts in peripheral blood are associated with poor survival in patients with metastatic melanoma: a prognostic model. *Br J Cancer* 93, 273-278
- Schoenborn JR, Wilson CB (2007): Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 96, 41-101
- Sheng X, Du X, Zhang X, Li D, Lu C, Li Q, Ma Z, Song Q, Wang C (2009): Clinical Value of Serum HMGB1 Levels in Early Detection of Recurrent Squamous Cell Carcinoma of Uterine Cervix: Comparison with Serum SCCA, CYFRA21-1, and CEA Levels. *Croat Med J* 50, 455-464
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2015): Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 65, 5-29
- Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ (2010): HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol* 28, 367-388
- Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W (1953): Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 6, 963-968
- Soloski MJ, Chrest FJ (2013): Disease Mechanisms in Rheumatology—Tools and Pathways: Multi-parameter flow cytometry for discovery of disease mechanisms in rheu-

matic diseases. *Arthritis Rheum* 65, 1148-1156

Strauss-Ayali D, Conrad SM, Mosser DM (2007): Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J Leukoc Biol* 82, 244-252

Sturgis EM, Cinciripini PM (2007): Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence. *Cancer* 110, 1429-1435

Sugawara S, Uehara A, Tamai R, Takada H (2002): Innate immune responses in oral mucosa. *J Endotoxin Res* 8, 465-468

Suh Y, Amelio I, Guerrero Urbano T, Tavassoli M (2014): Clinical update on cancer: molecular oncology of head and neck cancer. *Cell Death Dis* 5, e1018

Suzuki Y, Mimura K, Yoshimoto Y, Watanabe M, Ohkubo Y, Izawa S, Murata K, Fujii H, Nakano T, Kono K (2012): Immunogenic tumor cell death induced by chemoradiotherapy in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 72, 3967-3976

Swann JB, Smyth MJ (2007): Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest* 117, 1137-1146

Swanson MS, Sinha UK (2015): Rationale for combined blockade of PD-1 and CTLA-4 in advanced head and neck squamous cell cancer – Review of current data. *Oral Oncol* 51, 12-15

Syrjänen S (2005): Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 32, 59-66

Tano T, Okamoto M, Kan S, Nakashiro K, Shimodaira S, Koido S, Homma S, Sato M, Fujita T, Kawakami Y, Hamakawa H (2013): Prognostic Impact of Expression of Bcl-2 and Bax Genes in Circulating Immune Cells Derived from Patients with Head and Neck Carcinoma. *Neoplasia* 15, 305-314

Tarnawski R, Fowler J, Skladowski K, Swierniak A, Suwiński R, Maciejewski B, Wygoda A (2002): How fast is repopulation of tumor cells during the treatment gap? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 54, 229-236

Tehrany N, Kitz J, Rave-Fränk M, Lorenzen S, Li L, Küffer S, Hess CF, Burfeind P, Reichardt HM, Canis M, et al. (2015): High-grade acute organ toxicity and p16(INK4A) expression as positive prognostic factors in primary radio(chemo)therapy for patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Strahlenther Onkol* 191, 566-572

Thieblemont N, Weiss L, Sadeghi HM, Estcourt C, Haeffner-Cavaillon N (1995): CD14^{low}CD16^{high}: a cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection. *Eur J Immunol* 25, 3418-3424

- Tímár J, Csuka O, Remenár E, Répássy G, Kásler M (2005): Progression of head and neck squamous cell cancer. *Cancer Metastasis Rev* 24, 107-127
- Trotti A (2000): Toxicity in head and neck cancer: a review of trends and issues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 47, 1-12
- Uzzo RG, Rayman P, Kolenko V, Clark PE, Bloom T, Ward AM, Molto L, Tannenbaum C, Worford LJ, Bukowski R, et al. (1999): Mechanisms of Apoptosis in T Cells from Patients with Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 5, 1219-1229
- van der Waal I (2009): Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol* 45, 317-323
- Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ (2011): Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 29, 235-271
- Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA (2015): Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol* 15, 388-400
- Wajant H (2009): The role of TNF in cancer. *Results Probl Cell Differ* 49, 1-15
- Warnakulasuriya S, Ariyawardana A (2016): Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies. *J Oral Pathol Med* 45, 155-166
- Whiteside TL (2013): Immune Responses to Cancer: Are They Potential Biomarkers of Prognosis? *Front Oncol* 3, 107
- Wild CA, Brandau S, Lotfi R, Mattheis S, Gu X, Lang S, Bergmann C (2012): HMGB1 is overexpressed in tumor cells and promotes activity of regulatory T cells in patients with head and neck cancer. *Oral Oncol* 48, 409-416
- Wittekind C, Meyer H-J (Hrsg.): *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*. 7. Auflage; Wiley VCH, Weinheim 2013
- Wolff HA, Daldrup B, Jung K, Overbeck T, Hennies S, Matthias C, Hess CF, Roedel RMW, Christiansen H (2011): High-grade acute organ toxicity as positive prognostic factor in adjuvant radiation and chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *Radiology* 258, 864-871
- Wu Y, Zhang K, Zhao L, Guo J, Hu X, Chen Z (2013): Increased serum HMGB1 is related to oxidative stress in patients with atrial fibrillation. *J Int Med Res* 41, 1796-1802
- Yardimci G, Kutlubay Z, Engin B, Tuzun Y (2014): Precancerous lesions of oral mucosa. *World J Clin Cases* 2, 866-872
- Zhang AM, Fan Y, Wang XX, Xie QC, Sun JG, Chen ZT, Zhu B (2012): Increased treat-

ment-related mortality with additional cisplatin-based chemotherapy in patients with nasopharyngeal carcinoma treated with standard radiotherapy. *Radiother Oncol* 104, 279-285

Zhang M, Zhang P, Zhang C, Sun J, Wang L, Li J, Tian Z, Chen W (2009): Prognostic significance of Bcl-2 and Bax protein expression in the patients with oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 38, 307-313

Zhao L, Sheldon K, Chen M, Yin MS, Hayman JA, Kalemkerian GP, Arenberg D, Lyons SE, Curtis JL, Davis M, et al. (2008): The predictive role of plasma TGF- β 1 during radiation therapy for radiation-induced lung toxicity deserves further study in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 59, 232-239

Zhu AX, Sahani DV, Duda DG, di Tomaso E, Ancukiewicz M, Catalano OA, Sindhvani V, Blaszkowsky LS, Yoon SS, Lahdenranta J, et al. (2009): Efficacy, safety, and potential biomarkers of sunitinib monotherapy in advanced hepatocellular carcinoma: a phase II study. *J Clin Oncol* 27, 3027-3035

Ziegler-Heitbrock L (2007): The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 81, 584-592

Zou W (2005): Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 5, 263-274