

Aus der Klinik für Radioonkologie und Strahlentherapie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchung der regulatorischen T-Zellen als Prognosefaktor bei der
Behandlung von Patientinnen mit einem primären Zervixkarzinom und
einer primär kombinierten Radiochemotherapie**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Elvira Katrin Siewert
aus Berlin

Datum der Promotion: 16.06.2018

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Zusammenfassung.....	1
Abstract.....	2
1 EINLEITUNG.....	3
1.1 Zervixkarzinom.....	3
1.1.1 Epidemiologie.....	3
1.1.2 Morphologie und Metastasierung	3
1.1.3 Ätiologie und Risikofaktoren.....	5
1.1.4 Therapie	6
1.2 Regulatorische T-Zellen.....	8
1.2.1 Heterogenität und Funktion	8
1.2.2 Phänotypische Charakterisierung.....	10
1.2.3 Epigenetische Charakterisierung.....	12
1.3 Zielsetzung	13
2 MATERIAL UND METHODIK.....	15
2.1 Studienprotokoll	15
2.2 Aufbereitung der PBMCs	15
2.3 Phänotypische Quantifizierung der Tregs aus PBMCs mittels Durchflusszytometrie	17
2.3.1 Färbung.....	17
2.3.2 Messung.....	19
2.4 Epigenetische Quantifizierung der Tregs aus PBMCs mittels methylierungsspezifischer Analyse.....	21
2.4.1 DNA-Isolation	21
2.4.2 Bisulfitbehandlung der DNA	22

2.4.3	Methylierungsspezifische quantitative Real-Time-PCR	23
2.4.4	Herstellung der externen Standardreihen mittels Klonierung.....	26
2.4.4.1	Klonierung.....	26
2.4.4.2	Plasmidisolation	27
2.4.4.3	Kontrolle der Klonierung	28
2.5	Statistische Auswertung.....	28
3	ERGEBNISSE	30
3.1	Charakterisierung der Patientenproben	30
3.1.1	Übersicht der Patientenproben	30
3.1.2	Probenentnahmezeitpunkt.....	31
3.1.2.1	Probenentnahme vor Therapie	31
3.1.2.2	Probenentnahme nach Therapie	31
3.2	Charakterisierung des Patientenkollektives	32
3.2.1	Patientendaten vor Beginn der RCT	32
3.2.1.1	Alter bei Erstdiagnose.....	32
3.2.1.2	Tumorcharakteristika	32
3.2.2	Patientendaten während der RCT	34
3.2.3	Patientendaten nach Abschluss der RCT	35
3.2.3.1	Erkrankungsfreies Überleben	35
3.2.3.2	Gesamtüberleben	37
3.3	Validierung der epigenetisch quantifizierten Treg-Anteile	39
3.3.1	Validierung der PCR-Qualität	39
3.3.2	Vergleich der epigenetisch quantifizierten Treg-Anteile.....	41
3.3.3	Vergleich der phänotypisch und epigenetisch quantifizierten Treg-Anteile	44
3.4	Phänotypisch quantifizierte Tregs aus PBMCs	45
3.4.1	Übersicht der phänotypisch quantifizierten Treg-Anteile.....	45

3.4.2	Tregs als Indikator für das prätherapeutische Tumorstadium.....	46
3.4.3	Tregs als Prognosefaktor für das erkrankungsfreie Überleben	48
3.4.4	Tregs als Prognosefaktor für das Gesamtüberleben	49
3.5	Epigenetisch quantifizierte Tregs aus PBMCs	50
3.5.1	Übersicht der epigenetisch quantifizierten Treg-Anteile	50
3.5.2	Tregs als Indikator für das prätherapeutische Tumorstadium.....	51
3.5.3	Tregs als Prognosefaktor für das erkrankungsfreie Überleben	53
3.5.4	Tregs als Prognosefaktor für das Gesamtüberleben	54
3.6	Vergleich der statistischen Ergebnisse der phänotypisch und epigenetisch quantifizierten Treg-Anteile	55
4	DISKUSSION	57
4.1	Unterschiede der phänotypisch und epigenetisch quantifizierten Treg-Anteile	57
4.2	Bedeutung der Tregs vor und nach RCT beim Zervixkarzinom	61
4.2.1	Tregs vor RCT als Indikator für das prätherapeutische Tumorstadium	61
4.2.2	Tregs vor RCT als Prognosefaktor	63
4.2.3	Tregs nach RCT als Prognosefaktor	67
4.3	Schlussfolgerung	68
	Literaturverzeichnis	70
	Eidesstattliche Versicherung	86
	Lebenslauf.....	87
	Danksagung.....	88

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation modifiziert nach Luttmann et al. [109].....	16
Abbildung 2: Prinzip der Durchflusszytometrie modifiziert nach Luttmann et al. [109]..	17
Abbildung 3: Auswahlstrategie der durchflusszytometrischen Messung anhand eines Beispiels	19
Abbildung 4: Festlegung der Grenzen mittels FMO-Kontrollen.....	20
Abbildung 5: Prinzip der TaqMan-Messmethode modifiziert nach Mülhardt [111]	23
Abbildung 6: Probenübersicht für die Quantifizierung der Treg-Anteile aus PBMCs	30
Abbildung 7: Blutentnahmezeitpunkte vor Beginn der RCT	31
Abbildung 8: Blutentnahmezeitpunkte nach Abschluss der RCT	32
Abbildung 9: Verteilung der histologischen Tumortypen in absoluten Häufigkeiten.....	33
Abbildung 10: Histologisches Grading abhängig vom histologischen Tumortyp	33
Abbildung 11: Verteilung der klinischen FIGO-Stadien in absoluten Häufigkeiten.....	34
Abbildung 12: Metastasierungsstatus abhängig vom FIGO-Stadium.....	34
Abbildung 13: Verteilung des Tumorstatus der Patientinnen nach RCT zum Zeitpunkt der Auswertung in absoluten Häufigkeiten	36
Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurven des erkrankungsfreien Überlebens abhängig von verschiedenen Prognosefaktoren	37
Abbildung 15: Verteilung des Tumorstatus nach RCT zum Zeitpunkt der Auswertung abhängig vom Überleben der Patientinnen in absoluten Häufigkeiten ..	38
Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens abhängig von verschiedenen Prognosefaktoren	39
Abbildung 17: Externe Standardkurven der PCRs.....	40
Abbildung 18: Vergleich der Treg _{PCR} -Anteile vor und nach RCT	41
Abbildung 19: Streudiagramm der Treg _{PCR} -Anteile vor bzw. nach RCT	42
Abbildung 20: Streudiagramm der detektierten Gesamt-DNA der Proben vor und nach RCT	43
Abbildung 21: Streudiagramm der Treg _{Flow} - und Treg _{PCR} -Anteile vor bzw. nach RCT ..	44
Abbildung 22: Übersicht der Treg _{Flow} -Anteile	45
Abbildung 23: Treg _{Flow} -Anteile vor RCT abhängig von verschiedenen Prognosefaktoren	47
Abbildung 24: Empirische ROC-Kurve der Treg _{Flow} -Anteile vor RCT	48

Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurven des erkrankungsfreien Überlebens abhängig von den Treg _{Flow} -Anteilen	48
Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens abhängig von den Treg _{Flow} -Anteilen	49
Abbildung 27: Übersicht der Treg _{PCR} -Anteile	50
Abbildung 28: Treg _{PCR} -Anteile abhängig von verschiedenen Prognosefaktoren	52
Abbildung 29: Empirische ROC-Kurve der Treg _{PCR} -Anteile vor RCT	53
Abbildung 30: Kaplan-Meier-Kurven des erkrankungsfreien Überlebens abhängig von den Treg _{PCR} -Anteilen	54
Abbildung 31: Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens abhängig von den Treg _{PCR} -Anteilen	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Modifizierter Auszug der FIGO-/TNM-Klassifikation des Zervixkarzinoms [14, 15]	5
Tabelle 2: Studiendesign und Patientenkollektiv	15
Tabelle 3: Verwendete fluoreszenzgekoppelte Antikörper	18
Tabelle 4: Inkubationsbedingungen für die Bisulfitbehandlung	22
Tabelle 5: Verwendete Nukleinsäuresequenzen	24
Tabelle 6: Pipettieranleitungen	25
Tabelle 7: PCR-Bedingungen	25
Tabelle 8: Verwendete Mediane zur Gruppierung der Treg-Anteile	29
Tabelle 9: Kennzahlen des erkrankungsfreien Überlebens gemäß der Kaplan-Meier-Kurve	36
Tabelle 10: Kennzahlen des Gesamtüberlebens gemäß der Kaplan-Meier-Kurve	38
Tabelle 11: Tatsächliche Effizienz und Präzision der PCRs	40
Tabelle 12: Statistische Ergebnisse der Treg _{Flow/PCR} -Anteile vor bzw. nach RCT	56
Tabelle 13: Statistische Ergebnisse zum Verlauf der Treg _{Flow/PCR} -Anteile vor und nach RCT	56

Abkürzungsverzeichnis

6-FAM	6-Carboxyfluorescein
95%-KI	95%-Konfidenzintervall
APC	Allophycocyanin
BBQ	<i>BlackBerry® Quencher</i>
bp	Basenpaare
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CNS 2	<i>conserved non-coding region 2</i>
CT	Computertomografie
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
Dem-Met-Formel	Formel zur Berechnung des Treg-Anteils aus der Dem-PCR und der Met-PCR (Abschnitt 2.4.3)
Dem-C-less-Formel	Formel zur Berechnung des Treg-Anteils aus der Dem-PCR und der C-less-PCR (Abschnitt 2.4.3)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
FIGO	<i>Fédération Internationale de Gynécologie et Obstétrique</i>
FMO	<i>fluorescence minus one</i>
FOXP3	<i>forkhead box P3</i>
FOXP3i1	FOXP3 Intron 1
G(1 - 3)	histologisches <i>Grading</i> (1 - gut, 2 - mäßig, 3 - schlecht)
GFTR	<i>glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related protein</i>
HPV	humanes Papillomavirus
IgG1/G2b,κ	Immunglobulin G1/G2b, kappa
IPEX-Syndrom	<i>immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome</i>
LNA	<i>locked nucleic acid</i>
MGB-NFQ	<i>minor groove binder-non-fluorescent quencher</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MRT	Magnetresonanztomografie
near-IR	<i>near-infrared</i>
NII	<i>Nodi lymphatici</i>
OD	optische Dichte

PCR	(quantitative <i>Real-Time</i> -)Polymerasekettenreaktion
<ul style="list-style-type: none"> • C-less-PCR • Dem-PCR • Met-PCR 	<ul style="list-style-type: none"> • PCR aus der C-less-C1-Sequenz • PCR aus dem demethylierten FOXP3i1 • PCR aus dem methylierten FOXP3i1
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PE	Phycoerythrin
PE/Cy5	Phycoerythrin mit Cyanin 5
PET-CT	Positronen-Emissions-CT
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
RCT	(kombinierte) Radiochemotherapie
ROC	<i>receiver operating characteristic</i>
RPMI-1640 (Medium)	Roswell Park Memorial Institute 1640
RT	Raumtemperatur
S.O.C.(-Medium)	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
TE (Buffer)	Trishydroxymethylaminomethan und Ethylendiamintetraacetat
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
TNM(-Klassifikation)	T – Tumor, N – <i>Nodus</i> , M – Metastase
Treg	regulatorische T-Zelle
<ul style="list-style-type: none"> • iTreg • nTreg • pTreg • tTreg 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>in vitro-induced</i> Treg • <i>natural</i> Treg • <i>peripherally-derived/induced</i> Treg • <i>thymus-derived</i> Treg
Treg _{Flow}	durchflusszytometrisch/phänotypisch quantifizierte Treg
Treg _{PCR}	methylierungsspezifisch/epigenetisch quantifizierte Treg
TSDR	<i>Treg-specific demethylated region</i>

Zusammenfassung

Das Zervixkarzinom ist weltweit die vierthäufigste Tumorerkrankung der Frau [1]. Eine immunmodulatorische Behandlung zur (Re-)Aktivierung des Immunsystems und Überwindung der HPV- bzw. tumorinduzierten Immuntoleranz bietet neue Möglichkeiten der Therapie [2]. Dabei rücken auf die Immunsuppression spezialisierte, regulatorische T-Zellen (Tregs) in den Fokus [3]. Bei unbehandelten Zervixkarzinompatientinnen sind im Vergleich zu gesunden Frauen die im Blut zirkulierenden Tregs signifikant erhöht [4].

Erstmals untersucht diese retrospektive Studie den prognostischen Wert des im Blut zirkulierenden Treg-Anteils von 49 Patientinnen mit einem primären Zervixkarzinom vor und nach einer primär kombinierten Radiochemotherapie (RCT). Neben der klassischen phänotypischen Quantifizierung der Tregs als CD3⁺CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Zellen mittels Durchflusszytometrie (Treg_{Flow}) erfolgte für Zervixkarzinompatientinnen das erste Mal eine epigenetische Quantifizierung der zirkulierenden Tregs anhand einer Treg-spezifischen Demethylierung von FOXP3 mittels methylierungsspezifischer quantitativer *Real-Time-PCR* (Treg_{PCR}).

Ein hoher Anteil zirkulierender Tregs vor RCT erwies sich als prognostisch günstiger Biomarker für Zervixkarzinompatientinnen. Im Vergleich zur phänotypischen Treg-Quantifizierung bildet die epigenetische Quantifizierung verlässlichere, vom Immunstatus unabhängige und zwischen Studien besser vergleichbare Ergebnisse ab. So hatten Patientinnen mit einem hohen Treg_{PCR}-Anteil signifikant seltener Fernmetastasen (Kruskal-Wallis-Test; $P = 0,003$) und ein signifikant besseres erkrankungsfreies Überleben und Gesamtüberleben (Log-Rank-Test; $P = 0,006$ und $P = 0,006$). Der Treg_{PCR}-Anteil vor RCT ist damit ein Indikator für eine Fernmetastasierung (empirische ROC-Kurve; AUC = 0,853; $P = 0,001$) und ein unabhängiger Prognosefaktor für beide Überlebensparameter (multivariate Cox-Regression; $P = 0,009$ und $P = 0,009$). Der Treg_{Flow}-Anteil korreliert hingegen nicht signifikant mit diesen beiden Überlebensparametern (Log-Rank-Test; $P = 0,615$ und $P = 0,828$).

Ergebnisse aus laufenden klinischen Studien zur Immunmodulation beim Zervixkarzinom werden zur weiteren Klärung des prognostischen Werts der zirkulierenden Tregs beitragen können.

Abstract

Cervical carcinoma is the fourth most common tumor disease worldwide [1]. Immunomodulatory therapies provide new possibilities through (re-)activation of the immune system to overcome HPV- or tumor-induced immune tolerance [2]. Regulatory T-cells (Tregs), which are specialized in immunosuppression [3] and are increased in the blood of non-treated cervical carcinoma patients compared to healthy women [4], are at the center of attention.

To date, this retrospective study, is the first attempt to investigate the prognostic value of the Treg frequency in peripheral blood of 49 cervical carcinoma patients before and after a primary radio-chemotherapy (RCT). In addition to the phenotypic quantification of Tregs as CD3⁺CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T cells by flow cytometry (Tregs_{Flow}) an epigenetic quantification of blood Tregs was performed for the first time using a methylation-specific quantitative real-time-PCR based on Treg-specific DNA demethylation within FOXP3 (Tregs_{PCR}).

In this study an increased blood Treg frequency before RCT was identified as a favorable biomarker for cervical carcinoma patients. Compared to phenotypical Treg quantification, epigenetic quantification was more reliable due to independence of immune status and superior comparability between different studies. Cervical carcinoma patients with increased Treg_{PCR} frequency before RCT had significantly less distant metastases (Kruskal-Wallis test; $P = 0,003$) and significantly improved disease-free survival and overall survival (Log-rank test; $P = 0,006$ and $P = 0,006$). Treg_{PCR} frequency before RCT was an indicator for distant metastases (empirical ROC curve; AUC = 0,853; $P = 0,001$) and an independent prognostic factor for both survival parameters (Cox model; $P = 0,009$ and $P = 0,009$). In contrast, Treg_{Flow} frequency before RCT was not significantly associated with disease-free survival or overall survival (Log-rank test; $P = 0,615$ and $P = 0,828$).

Pending results from clinical studies on immune modulatory therapy in cervical carcinoma patients will help to further elucidate the prognostic value of blood Tregs.

1 EINLEITUNG

1.1 Zervixkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Zervixkarzinom, umgangssprachlich als Gebärmutterhalskrebs bekannt, gilt mit ca. 530.000 Neuerkrankungen im Jahr 2012, davon 84 % in den Entwicklungsländern, weltweit als vierthäufigste Tumorerkrankung der Frau. Es ist verantwortlich für 7,5 % aller durch Tumore bedingten Todesfälle unter Frauen. Jährlich sterben weltweit etwa 270.000 Frauen an einem Zervixkarzinom, darunter 85 % aus Entwicklungsländern [1].

In Deutschland nimmt das Zervixkarzinom Platz zwölf unter den häufigsten Malignomen der Frau ein mit einer stabilen Neuerkrankungsrate seit Ende der 1990er Jahre. 2010 erkrankten 4.660 Frauen in Deutschland an einem Zervixkarzinom und 1.524 Frauen erlagen ihrem Zervixkarzinom [5]. Das mittlere Erkrankungsalter des invasiven Zervixkarzinoms liegt mit 53 Jahren deutlich unter dem durchschnittlichen Erkrankungsalter für Malignome (69 Jahre) [6]. 62 % der Zervixkarzinome werden im frühen Tumorstadium T1 diagnostiziert [5]. Das altersangepasste relative Fünfjahresüberleben liegt in Deutschland bei 64,7 % mit einem signifikanten Anstieg zwischen 2002 und 2006 [7].

1.1.2 Morphologie und Metastasierung

Die Zervix stellt die Verbindung zwischen Uterus und Vagina dar. Die meisten Tumore der Zervix und deren Vorstufen entstehen an der Transformationszone, welche aufgrund ihres hohen Zellumsatzes im Rahmen von Umbau- und Reparaturprozessen besonders vulnerabel gegenüber Kanzerogenen ist. Die Transformationszone ist der Bereich der Zervix, in dem es zu einer Verschiebung der Grenze zwischen dem Zylinderepithel der Endozervix und dem unverhornten Plattenepithel der Ektozervix durch eine Metaplasie (Umwandlung) des Zylinderepithels in Plattenepithel insbesondere im Alter kommt [8]. Das Zervixkarzinom gehört zu den epithelialen Tumoren. Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome sind die histologisch häufigsten Tumortypen mit 77 % bzw. 15 % aller Zervixkarzinome. Die prognostisch ungünstigeren Mischformen, wie das adenosquamöse Karzinom, aber auch die neuroendokrinen oder undifferenzierten Tumore, sind deutlich seltener [7]. Tumore nicht-epithelialen Ursprungs der Zervix wie Sarkome, Melanome oder Lymphome stellen Raritäten dar [9].

Die Tumorausbreitung des Zervixkarzinoms erfolgt vorrangig kontinuierlich und lymphogen. Dabei wächst der Tumor *per continuitatem* insbesondere nach lateral in die Parametrien und nach kaudal in die Vagina. Die lymphogene Ausbreitung folgt der Lymphdrainage der Zervix, die zum größten Teil über laterale, aber auch anteriore und posteriore Lymphstraßen in die regionären Lymphknoten führt. Paraaortale Lymphknotenmetastasen können direkt über den posterioren Lymphabfluss der Zervix oder über die regionären Lymphknotenmetastasen entstehen [10, 11] und werden, ebenso wie andere nicht regionäre Lymphknotenmetastasen, als Fernmetastasen gewertet [12]. Eine primär hämatogene Ausbreitung liegt wesentlich seltener vor und betrifft vor allem Patientinnen mit einem weit fortgeschrittenen oder schlecht differenzierten Tumor oder einem seltenen, prognostisch ungünstigen Tumortyp. Typische Lokalisationen für hämatogene Fernmetastasen sind Lunge, Leber, Knochen und Darm [10].

Aufgrund der Dominanz des Zervixkarzinoms in den Entwicklungsländern und deren eingeschränkten diagnostischen Möglichkeiten sowie der nicht operativen Therapieoptionen des Zervixkarzinoms erfolgt die Stadieneinteilung des Zervixkarzinoms weiterhin klinisch gemäß der korrigierten FIGO-Klassifikation (Fédération Internationale de Gynécologie et Obstétrique) von 2009 (Tabelle 1) [10, 13]. Operative Verfahren wie eine pelvine und aortale Lymphonodektomie als Staginguntersuchung oder eine definitive operative Therapie sowie weiterführende bildgebende Diagnostik mittels CT, MRT oder PET-CT können zur Therapieplanung herangezogen werden. Diese führen jedoch nicht zu einer Veränderung des klinisch eingeschätzten FIGO-Stadiums [10, 12]. Die parallele TNM-Klassifikation dient zur ergänzenden histopathologischen und klinischen Stadieneinteilung des Zervixkarzinoms (Tabelle 1) [12, 14].

Welchen Stellenwert einzelne histopathologische Parameter als Prognosefaktoren haben, bleibt insbesondere aufgrund fehlender Standardisierung und Reproduzierbarkeit bei der Erhebung umstritten [15]. Gemäß der deutschen S3-Leitlinie werden Tumorstadium, Tumortyp, Grading, dreidimensionale Tumorgröße, Resektionsrandstatus und pelviner als auch paraaortaler Lymphknotenstatus als therapierelevante Prognosefaktoren beim makroinvasiven Tumor (FIGO-Stadium > IA) eingestuft. Tiefe Stromainvasion, Lymphgefäß- und Blutgefäßinvasion gelten dagegen nur als therapierelevant [16].

Tabelle 1: Modifizierter Auszug der FIGO-/TNM-Klassifikation des Zervixkarzinoms [14, 16]T = Tumor (Primärtumor), N = *Nodus* (regionäre Lymphknoten), M = Metastasen (Fernmetastasen)

TNM-Kategorie	FIGO-Stadien	Beschreibung
T1	I	Tumor begrenzt auf die Zervix
T1a	IA	Ausschließlich mikroskopische Diagnose mit maximaler Stromainvasion von 5 mm und maximaler horizontaler Ausdehnung von 7 mm
T1b	IB	Makroskopisch (klinisch) sichtbare, auf die Zervix begrenzte Läsion oder mikroskopische Läsion größer als T1a
T2	II	Tumorausdehnung jenseits des Uterus, aber nicht bis zur Beckenwand und nicht bis zum unteren Drittel der Vagina
T2a	IIA	Parametrium frei
T2b	IIB	Parametrium befallen
T3	III	Tumorausdehnung bis zum unteren Drittel der Vagina und/oder bis zur Beckenwand und/oder verursachte Hydronephrose oder stumme Niere
T4	IV	Tumorfiltration in Blasen- oder Rektumschleimhaut oder Überschreitung der Grenzen des kleinen Beckens
Nx		Regionärer Lymphknotenstatus nicht beurteilbar
N0		keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1		Regionäre Lymphknotenmetastasen u.a.: <i>Nodi lymphatici (NII) iliaci externi, NII iliaci interni (hypogastrici – obturatorii), NII interiliaci, NII iliaci communes, NII praesacrales, NII rectales superiores</i> oder parazervikale bzw. parametrane NII [10–12]
Mx		Fernmetastasenstatus nicht beurteilbar
M0		Keine Fernmetastasen
M1		Fernmetastasen

1.1.3 Ätiologie und Risikofaktoren

In fast allen Zervixkarzinomen können humane Papillomaviren (HPV) nachgewiesen werden [17, 18]. Durch eine erneute Analyse von HPV-negativen Fällen der *International Biological Study on Cervical Cancer* [19] und dem Ausschluss inadäquater Proben ermittelten Walboomers et al. eine weltweite HPV-Prävalenz von 99,7 % beim Zervixkarzinom [17]. Der HPV-Infektion wird dabei ein höheres attributables Risiko für die Entstehung eines Zervixkarzinoms als Rauchen für das Lungenkarzinom und chronische Hepatitis B für Lebertumore zugeschrieben [20]. Mittlerweile gilt die HPV-Infektion als notwendige Ursache für die Entstehung eines Zervixkarzinoms [18]. Die Entdeckung dieses kausalen Zusammenhangs ist in der Tumorforschung bisher einmalig [20].

Von den mehr als 100 bekannten humanen Papillomaviren führen über 40 HPV-Typen der Alpha-Papillomaviren zu einer genitalen Infektion und werden anhand ihres onkogenen Potentials in Hochrisiko-HPV-Typen mit gehäuftem Auftreten in Zusammenhang mit dem Zervixkarzinom und Niedrigrisiko-HPV-Typen unterteilt [21]. Die zwölf HPV-Typen HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 und 59 werden einheitlich als Hochrisiko-Typen angesehen [22, 23]. Zusammen sind sie für über 90 % der invasiven HPV-positiven Zervixkarzinome verantwortlich [24]. Für HPV-Typen mit einer geringen Prävalenz gibt es uneinheitliche Einteilungen bezüglich ihres Risikopotentials. Weltweit gibt es regionale Unterschiede in den Häufigkeiten der einzelnen HPV-Typen des Zervixkarzinoms, wobei HPV 16, 18 und 45 mit relativen Anteilen von 50 - 61 %, 10 - 15 % und 6 - 8 % am häufigsten auftreten [19, 24, 25].

HPV wird überwiegend sexuell übertragen [26]. Zwischen dem 20. und 79. Lebensjahr entwickeln bis zu 79 % der Frauen mindestens eine HPV-Infektion [27]. Dabei zeigt die HPV-Prävalenz einen ersten hohen Anstieg direkt nach Aufnahme der sexuellen Aktivität (< 25 Jahre) [28]. Die meisten HPV-Infektionen bleiben jedoch klinisch inapparent [29] und 55 % bzw. 67 % der Infektionen heilen innerhalb von 6 bzw. 12 Monaten [30]. Bei Persistenz der Infektion (über 12 Monate) sinkt die Wahrscheinlichkeit der nachfolgenden Heilung und steigt das Risiko für eine höhergradige zervikale Läsion oder eine Tumorentstehung [30], insbesondere bei Infektionen mit HPV 16 und 18 [31]. Entgegen anfänglicher Annahmen über einen kontinuierlichen Progress des Zervixkarzinoms von geringgradigen über höhergradige zervikale Läsionen zum invasiven Tumor kommt es auch zur Regression dieser zervikalen Präkanzerosen und *De-novo*-Entstehung der höhergradigen Präkanzerosen [32–34]. Letztlich entwickelt sich nur bei 1 % der chronischen, persistierenden HPV-Infektionen ein invasives Zervixkarzinom [35]. Da nicht jede HPV-Infektion persistiert und zur Entstehung eines Zervixkarzinoms führt, ist HPV zwar notwendig, aber nicht ausreichend für die Entstehung eines Zervixkarzinoms [22, 25]. Daher werden zusätzliche Kofaktoren für die Entstehung des Zervixkarzinoms benötigt, zu denen beispielsweise Rauchen, langjährige Einnahme von oralen Kontrazeptiva, hohe Anzahl an Geschlechtspartnern oder genetische Faktoren zählen [16, 36].

1.1.4 Therapie

Die Therapie des invasiven Zervixkarzinoms ist international und national sehr heterogen und die Therapiewahl aufgrund der klinischen Klassifikation nach FIGO erschwert.

Neben dem prätherapeutisch ermittelten Stadium hängt die Therapie vom Allgemeinzustand, Menopausenstatus, Kinderwunsch und Risikoprofil der Patientin sowie den möglichen Therapiespätfolgen ab. Prinzipiell existieren die Operation und die Radio(chemo)therapie als primäre Therapieoptionen des invasiven Zervixkarzinoms [16].

Für das frühe Zervixkarzinom (FIGO-Stadium IB - IIA) zeigen sich die primäre Operation (mit und ohne adjuvante Radiotherapie) und primäre Radiotherapie therapeutisch gleichwertig, bei jedoch erhöhter Morbidität im Falle einer adjuvanten Therapie nach primär operativer Versorgung [37]. Daher sollte eine Kombination aus Operation und Radio(chemo)therapie vermieden werden und gemäß der deutschen S3-Leitlinie die primär operative Therapie bis Stadium IIA bei nicht zu erwartender adjuvanter Therapie erwogen werden. Eine adjuvante Radio(chemo)therapie ist bei histologisch gesicherten Lymphknotenmetastasen, tumorinfiltriertem Resektionsrand oder mehr als zwei der nachfolgenden histologischen Risikofaktoren indiziert: Blutgefäßinvasion, Lymphgefäßinvasion, tiefe Stromainvasion, Tumorgröße über 4 cm und histologisch schlecht differenzierter Tumor [16].

Durch eine simultane, platinhaltige Chemotherapie zur Radiotherapie wird das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben gegenüber einer alleinigen Radiotherapie in der primären als auch adjuvanten Behandlungsform signifikant verbessert [38–40]. Anwendung findet die primäre kombinierte Radiochemotherapie (RCT) vor allem beim fortgeschrittenen Zervixkarzinom ab Stadium IIB unabhängig vom Lymphknotenstatus und unabhängig vom FIGO-Stadium bei histologisch gesicherten (pelvinen/paraaortalen) Lymphknotenmetastasen bzw. mehreren nachgewiesenen Risikofaktoren. Im FIGO-Stadium IV erfolgt eine individuelle Therapiewahl [16].

Die primäre RCT besteht aus einer perkutanen Radiatio, einer simultanten Cisplatin-Monotherapie und einer lokalen intrauterinen Kontaktradiatio (Brachytherapie) [16]. Die perkutane Bestrahlung dient zum einen der Kontrolle von Mikrometastasen in den regionären Lymphknoten und zum anderen der Tumorreduktion für eine bessere Dosisverteilung bei der Brachytherapie, die eine Dosissteigerung am Primärtumor dank der hohen Strahlentoleranz der Vagina ermöglicht [41]. Aufgrund der höheren Anwendungssicherheit und -komforts wird im Allgemeinen die *High-Dose-Rate-Brachytherapie* emp-

fohlen und angewendet, obwohl keine klinisch signifikanten Unterschiede zur *Low-Dose-Rate-Brachytherapie* bestehen [42, 43].

Neue Behandlungsmöglichkeiten bietet eine immunmodulatorische Therapie, welche auf eine (Re-)Aktivierung des Immunsystems und eine Überwindung der HPV- bzw. tumorinduzierten Immuntoleranz zielt und sich dazu unter anderem an deren Mechanismen orientiert [2]. Dabei unterscheidet man eine aktive und passive Form der immunmodulatorischen Therapie. Die therapeutische Immunisierung stellt die häufigste aktive Form dar und dient der Bildung einer zellvermittelten Immunantwort in Form von zytotoxischen T-Zellen und T-Helfer-Zellen gegen HPV bzw. den Tumor selbst. Hingegen werden bei der passiven Form Effektormoleküle wie beispielsweise tumorspezifische monoklonale Antikörper verwendet [2]. Für die HPV- bzw. tumorinduzierte Immuntoleranz werden unter anderem sogenannte regulatorische T-Zellen (Tregs) verantwortlich gemacht [35], welche einerseits eine Hauptschwierigkeit bei der Entwicklung eines therapeutischen Impfstoffs darstellen und andererseits einen attraktiven Angriffspunkt für eine immunmodulatorische Therapie bieten [2, 44].

1.2 Regulatorische T-Zellen

1.2.1 Heterogenität und Funktion

Tregs gelten als eigenständige Zellpopulation des adaptiven Immunsystems neben den T- und B-Zellen und sind auf die Immunsuppression spezialisiert. Bei jeder adaptiven Immunantwort werden alle drei Zelltypen rekrutiert und aktiviert. Das Gleichgewicht zwischen den Tregs und den T- und B-Zellen bestimmt die Art und Stärke der Immunantwort oder deren Ausbleiben gegenüber einem Antigen (sogenannte Immuntoleranz) [3]. Tregs übernehmen somit die Etablierung und Aufrechterhaltung der peripheren Immuntoleranz und der Immunhomöostase (Immungleichgewicht) [3]. Tregs werden deshalb auch als Pförtner der Immunreaktionen angesehen [45] und übernehmen in diesem Zusammenhang eine duale Rolle. Auf der einen Seite verhindern sie die Entstehung von Autoimmunerkrankungen, Allergien und Transplantatabstoßungen oder gewähren die orale und mukosale Toleranz von nicht-pathogenen Antigenen und die materno-fetale Toleranz in der Schwangerschaft. Auf der anderen Seite können Tregs gewünschte Immunreaktionen gegen Pathogene und Tumore verhindern und so eine chronische Infektion unterhalten oder einen Tumorprogress unterstützen [46, 47].

Tregs stellen eine heterogene Zellpopulation in Bezug auf ihren Bildungsort, ihre Funktion, ihren Aktivitätszustand und damit auch ihren Phänotyp dar [47, 48]. Anhand des Bildungsorts werden drei Treg-Gruppen unterschieden. Der größte Anteil der Tregs, die sogenannten *thymus-derived* Tregs (tTreg, früher nTreg von *natural* Treg), deren T-Zellrezeptor bevorzugt Eigenantigene erkennt, wird im Thymus generiert. Ein unbekannter Anteil an Tregs wird in der Peripherie aus naiven T-Zellen gebildet. Diese *peripherally derived/induced* Tregs (pTreg, früher iTreg von *induced/adaptive* Treg) erweitern das T-Zell-Rezeptor-Spektrum der tTregs gegen nicht-pathogene Fremdantigene [49–51]. Zusammen gewähren tTregs und pTregs die Immunhomöostase und setzen sich auch jeweils aus funktionell und phänotypisch unterschiedlichen Zellen zusammen [48]. *Ex vivo* generierte Tregs, welche durch Stimulation ihres T-Zell-Rezeptors in Anwesenheit vom *transforming growth factor beta* (TGF- β) aus naiven T-Zellen entstehen [50, 52], werden als iTreg (*in vitro-induced* Treg) bezeichnet und bilden die letzte Gruppe [49–51].

Ihre immunsuppressive Funktion vermitteln Tregs über eine Vielzahl an Mechanismen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* [53, 54] und verhindern darüber die Proliferation und Differenzierung von naiven T-Zellen sowie die Proliferation und Funktion von Effektorzellen. Bei Effektorzellen handelt es sich um ausdifferenzierte Zellen. Zu diesen zählen zum Beispiel CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen, natürliche Killerzellen oder Makrophagen [3, 55, 56]. Die von den Tregs zur Suppression verwendeten Mechanismen können in drei Gruppen unterteilt werden [47, 48]: Zell-Zell-kontaktabhängige Suppression, Sekretion von suppressiven Zytokinen und metabolische Störung bzw. Konkurrenz um Wachstumsfaktoren. Dabei können die Effektorzellen direkt oder indirekt über die Interaktion der Tregs mit sogenannten dendritischen Zellen (Antigen-präsentierenden Zellen) supprimiert werden [53]. Die einzelnen Mechanismen können synergistisch oder sequenziell angewendet werden [3]. Die Induktion der Treg-vermittelten Suppression ist Antigen-spezifisch, die anschließende Suppression dagegen Antigen-unspezifisch und wird deshalb auch als *Bystander*-Suppression bezeichnet [57, 58].

Bei gesunden Menschen entsprechen durchschnittlich 6 % der im Blut zirkulierenden CD4⁺ T-Zellen den zirkulierenden Tregs [59]. Tumorerkrankungen sind mit einer Expansion der Tregs assoziiert. So haben Tumorpatienten, darunter auch Zervixkarzinompatientinnen [4, 60, 61], eine erhöhte Anzahl an Tregs im peripheren Blut, im Tumor und

Tumormikromillieu sowie in den tumordrainierenden Lymphknoten. Die anfängliche Annahme über einen generell negativen prognostischen Einfluss der expandierten Tregs bei Tumorpatienten und einer einheitlichen Treg-depletierenden Therapie zur Stärkung der körpereigenen Anti-Tumorimmunantwort wurde jedoch durch Studien über einen fehlenden oder sogar positiven prognostischen Wert der Tregs entkräftet [45]. Die prognostische Relevanz der Tregs ist folglich abhängig von verschiedenen Faktoren, wie der Tumorentität und dessen möglichen molekulargenetischen Subtypen, der Lokalisation der betrachteten Tregs oder der Art der Treg-Charakterisierung und damit der Betrachtung eines bestimmten Treg-Subtyps oder -Aktivitätszustandes [62, 63].

1.2.2 Phänotypische Charakterisierung

Als erster phänotypisch spezifischer Marker der Tregs gilt der Oberflächenmarker CD25 (α -Kette des hochaffinen Interleukin-2-Rezeptors), welcher neben den Oberflächenmarkern CD3 als kollektiver Marker der T-Zellen und CD4 als Korezeptor des T-Zell-Rezeptors konsekutiv exprimiert wird. Die so identifizierten murinen und humanen CD4⁺CD25⁺ Tregs zeigen typische Treg-spezifische Eigenschaften [59, 64–66]. Jedoch setzen sich die humanen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen sowohl aus Tregs als auch aus aktivierten T-Zellen ohne suppressive Eigenschaften, den sogenannten aktivierten konventionellen T-Zellen, zusammen [66, 67]. Im Vergleich zu den murinen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen besitzen unter den humanen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen die Zellen mit der höchsten CD25-Expression (CD25^{high}) auch die stärksten Suppressionseigenschaften [67]. Die Abgrenzung dieser humanen CD4⁺CD25^{high} Tregs basiert jedoch auf einer eher willkürlichen Unterteilung der CD25-Expression und führt zu einer Unterschätzung des Treg-Anteils [68].

Mit der Entdeckung des Transkriptionsfaktors *forkhead box P3* (FOXP3) als Masterregulator für die Entwicklung und Funktion der murinen und humanen Tregs gilt FOXP3 als spezifischer intrazellulärer Marker der CD4⁺CD25⁺ Tregs. Der auf dem X-Chromosom gelegene Transkriptionsfaktor gehört zur *forkhead/winged-helix family* der Transkriptionsfaktoren und wird sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene bevorzugt von Tregs exprimiert. Durch einen Gentransfer von FOXP3 in naive CD4⁺ T-Zellen entstehen Zellen, welche phänotypisch und funktionell vergleichbar den Tregs sind [69–71]. Eine Mutation oder das komplette Fehlen des FOXP3-Gens führt bei Mäusen zum letalen, lymphoproliferativen Autoimmunsyndrom der *scurfy mouse* und wird auf einen

Mangel an Tregs zurückgeführt [70, 72]. Äquivalent zum Krankheitsbild der *scurfy mouse* führen Mutationen im FOXP3-Gen beim Menschen zum ebenfalls X-chromosomal rezessiv vererbten IPEX-Syndrom (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*) [73, 74]. Das IPEX-Syndrom ist mit der Entstehung von multiplen Autoimmunerkrankungen, insbesondere in Form von schweren Enteropathien, Diabetes mellitus Typ 1 und Dermatitiden, assoziiert [75].

Entgegen der anfänglichen Annahme einer exklusiven Expression von FOXP3 in Tregs lässt sich auch in anderen hämatopoetischen Zellen, einigen epithelialen Zellen und einigen Tumorzellen FOXP3 nachweisen [76]. So exprimieren 1,8 % der CD4⁺CD25⁻ T-Zellen ohne Treg-spezifische Eigenschaften auch FOXP3 [77]. Nach *in vitro* Aktivierung zeigen sowohl konventionelle CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen eine transiente FOXP3-Expression ohne notwendigerweise Treg-typische suppressive Eigenschaften auszubilden [77–80].

Aufgrund fehlender Spezifität der bisherigen Treg-Marker werden Tregs anhand der Koexpression mehrerer Marker charakterisiert. Trotz der oben genannten Limitationen der einzelnen Marker gilt der CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg-Phänotyp als besonders zuverlässig und findet daher breite Anwendung [81]. Santegoets et al. empfehlen hingegen basierend auf einem Ranking von Treg-Markern und einer nachfolgenden Analyse der Markerkombinationen eine minimale Markerkombination aus CD3, CD4, CD25, CD127 und FOXP3 zur Detektion der humanen Tregs als CD3⁺CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}FOXP3⁺ Zellen [82], ebenso wie Snyder-Cappione bei Treg-Bestimmungen ohne Suppressions- bzw. Funktionstests [83]. Die Expression des Oberflächenmarkers CD127 (α -Kette des Interleukin-7-Rezeptors) korreliert dabei invers mit der intrazellulären FOXP3-Expression und den suppressiven Eigenschaften der Tregs. Eine fehlende bis niedrige CD127-Expression (CD127^{low}) dient damit zur Unterscheidung zwischen Tregs und konventionellen T-Zellen mit hoher CD127-Expression [84–86], wobei einige konventionelle T-Zellen ihre CD127-Expression in der frühen Phase einer Aktivierung herunterregulieren [87, 88].

Letztlich sind viele der bisherigen Marker zur phänotypischen Charakterisierung der Tregs auch generelle Marker der T-Zell-Aktivierung und damit nicht Treg-spezifisch [46, 68]. Nichtsdestotrotz können sie in Kombination zur phänotypischen Identifizierung

und Quantifizierung der Tregs eingesetzt werden [68], wobei die verwendeten Markerkombinationen in der Literatur sehr variieren. Es bleibt abzuwarten, ob im Hinblick auf die sehr heterogene Treg-Population ein solcher phänotypischer Marker überhaupt existiert. Dagegen scheint eine eindeutige Charakterisierung der Tregs anhand einer Treg-spezifischen epigenetischen Veränderung möglich.

1.2.3 Epigenetische Charakterisierung

Unter Epigenetik versteht man die vererbte Veränderung der Genexpression ohne Änderung der DNA-Sequenz. Sie wird für die phänotypischen Unterschiede zwischen Zellen und Organismen mit identischer DNA verantwortlich gemacht [89]. Das Grundprinzip der Epigenetik basiert auf einer vererbaren lokalen Veränderung des Chromatins, dem Komplex aus chromosomaler DNA und Proteinen im Zellkern. Der Verpackungszustand des Chromatins beeinflusst dabei die Zugänglichkeit und damit Genaktivität der DNA und kann über verschiedene epigenetische Mechanismen reguliert werden [90]. Dazu zählen unter anderem die reversible, posttranslationale Modifikation der Histone (DNA-bindende Proteine im Zellkern) oder die ebenfalls reversible, postreplikative DNA-Methylierung, welche bei Säugetieren vorwiegend am C5-Atom eines Guanin folgenden Cytosins, einem sogenannten CpG-Dinucleotid, stattfindet [90, 91].

Murine und humane Tregs besitzen im Intron 1 des FOXP3-Gens nicht-codierende, in Säugetieren hoch konservierte Regionen mit solchen epigenetischen Veränderungen [92]. Eine dieser Regionen weist ein spezifisches Methylierungsmuster für Tregs auf und wird in der Literatur auch als *Treg-specific demethylated region* (TSDR), *conserved non-coding sequence 2* (CNS2) oder einfach FOXP3 Intron 1 (FOXP3i1) bezeichnet [93–95].

FOXP3i1 ist durch eine selektive Demethylierung seiner CpG-Nucleotide in murinen und humanen Tregs und einer Methylierung dieser CpG-Nucleotide in naiven und konventionellen T-Zellen gekennzeichnet [93, 96, 97]. Die Demethylierung des FOXP3i1 korreliert zudem besser mit den Treg-spezifischen suppressiven Eigenschaften als dem mRNA- oder Proteinlevel von FOXP3 [98] und bleibt unverändert unter *in vitro* Stimulation und Expansion [96, 97]. tTregs und pTregs zeigen eine vergleichbare Demethylierung des FOXP3i1 [99]. Dagegen weisen TGF- β induzierte iTregs oder aktivierte konventionelle T-Zellen mit transienter FOXP3-Expression eine (fast) komplette Methylierung

rung des FOXP3i1 auf ebenso wie die naiven und nicht-aktivierten konventionellen T-Zellen [93, 96]. Demnach korreliert eine transiente bzw. instabile FOXP3-Expression mit einer Methylierung des FOXP3i1. Das demethylierte FOXP3i1 gilt hingegen als epigenetischer Marker für eine stabile FOXP3-Expression und eine sichere Zugehörigkeit zur Treg-Zellpopulation [51, 92, 94], wobei jedoch bei Frauen aufgrund der Position des FOXP3-Gens auf dem X-Chromosom und der Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen die Hälfte der FOXP3i1 der Tregs methyliert vorliegen [95, 96, 98]. Baron et al. zeigten die Einmaligkeit dieser Demethylierung im FOXP3i1 für reife Tregs auch im Vergleich zu anderen Blut- und Gewebezellen [96].

Die Demethylierung des FOXP3i1 ist damit ein neuer zuverlässiger Marker der humanen und murinen Tregs zur Identifizierung und Quantifizierung der Tregs im Blut und Gewebe in Form einer methylierungsspezifischen Analyse [95, 100, 101]. Die Sensitivität dieser methylierungsspezifischen Methode liegt gemäß Wieczorek et al. bei einer Detektionsgrenze von 0,03 % Tregs, welches in etwa einer Anzahl von 3,5 Kopien demethylierter DNA innerhalb von 12.000 Kopien methylierter Hintergrund-DNA entspricht [100]. Mittlerweile wird diese neue Methode bei der Charakterisierung des Immunstatus unterschiedlicher Patientenkollektive angewendet, zum Beispiel bei Patienten mit Tumor- oder Autoimmunerkrankungen oder unter immunstimulierender bzw. -supprimierender Therapie oder bei Neugeborenen. Inwieweit die Ergebnisse der phänotypischen und epigenetischen Charakterisierung zur Quantifizierung der Tregs miteinander korrelieren, ist für die spezielle immunologische Situation eines Patientenkollektives zu prüfen, da sie abhängig davon zu variieren scheint [102–104].

1.3 Zielsetzung

Bei Patientinnen mit einem unbehandelten Zervixkarzinom ist im Vergleich zu gesunden Frauen der Anteil an zirkulierenden Tregs im Blut signifikant erhöht [4, 105, 106]. Bisher existieren noch keine Studien zur prognostischen Relevanz dieser zirkulierenden Tregs beim Zervixkarzinom. Ziel der vorliegenden Arbeit ist deshalb die Untersuchung des prognostischen Werts der im Blut zirkulierenden Tregs bei Zervixkarzinompatientinnen, die mit einer RCT behandelt wurden. Da konventionelle Tumorthérapien, wie die Strahlen- und Chemotherapie, den absoluten bzw. relativen Anteil an zirkulierenden Tregs im Blut von Tumorpatienten beeinflussen [107], Tregs besonders radioresistent im Vergleich zu anderen Immunzellen sind und die Suppressionskapazität der Tregs bei Tu-

morpatienten durch eine Strahlentherapie gesteigert wird [108], wurde sowohl der Anteil an zirkulierenden Tregs vor als auch nach RCT in Bezug auf das erkrankungsfreie Überleben und Gesamtüberleben der Patientinnen untersucht. Chen et al. sehen zirkulierende Tregs im engen Zusammenhang mit der Tumorentwicklung, dem Tumorstadium und der Metastasierung des Zervixkarzinoms, möglicherweise sogar mit direktem Einfluss darauf [105]. Deshalb wurden die Treg-Anteile vor RCT in Bezug auf bekannte Prognosefaktoren wie das Tumorstadium, den Lymphknoten- und Fernmetastasenstatus sowie den histologischen Tumortyp und die histologische Tumordifferenzierung analysiert. Zhang et al. zeigten in diesem Zusammenhang eine Korrelation zwischen der histologischen Differenzierung des Tumors und den zirkulierenden Tregs mit einem zunehmenden Treg-Anteil bei abnehmender Differenzierung [106]. Die Treg-Quantifizierung erfolgte über eine phänotypische und epigenetische Charakterisierung der Tregs mittels einer durchflusszytometrischen und methylierungsspezifischen Analyse. Bisher wurde der Anteil zirkulierender Tregs bei Zervixkarzinompatientinnen ausschließlich phänotypisch über die Durchflusszytometrie bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurden damit das erste Mal im Blut zirkulierende Tregs von Zervixkarzinompatientinnen über eine methylierungsspezifische Methode quantifiziert und mit den durchflusszytometrischen Messergebnissen verglichen. Zusammenfassend ergeben sich folgende Fragestellung und Hypothesen:

Fragestellung:

Welchen prognostischen Wert haben die zirkulierenden Tregs im Blut von radiochemotherapierten Zervixkarzinompatientinnen?

Hypothesen:

- I. Der Treg-Anteil vor Therapie korreliert mit folgenden Prognosefaktoren: Tumorstadium, regionärem Lymphknoten- und Fernmetastasenstatus, histologischem Tumortyp und Grading.
- II. Der Treg-Anteil nach RCT wird verändert sein.
- III. Der Treg-Anteil vor oder nach RCT korreliert mit dem klinischen Verlauf bzw. Überleben.
- IV. Die Ergebnisse der phänotypisch und epigenetisch quantifizierten Treg-Anteile stimmen überein.

2 MATERIAL UND METHODIK

2.1 Studienprotokoll

An dieser retrospektiven Studie nahmen 57 Patientinnen mit primärem Zervixkarzinom teil, denen gemäß Ethikantrag EA4/148/05 vom 28.06.2008 bei Vorliegen einer schriftlichen Einverständniserklärung vor und nach RCT Blut entnommen wurde.

Tabelle 2: Studiendesign und Patientenkollektiv

	Beschreibung
Studienpatientinnen	Einschlusskriterien: <ul style="list-style-type: none"> • Karnofsky-Index \geq 60 • Patientenalter \geq 18 Jahre • histologisch gesichertes, primäres Zervixkarzinom Ausschlusskriterien: <ul style="list-style-type: none"> • neuroendokrine Tumore oder Mischtypen mit neuroendokrinen Anteilen • Schwangerschaft, Stillzeit • vorangegangene maligne Erkrankungen
Therapie	Primäre oder adjuvante RCT gemäß der Leitlinie der Klinik für Radioonkologie und Strahlentherapie der Charité
Probengewinnung	Blutentnahme von 10 ml heparinisiertem, venösem Vollblut vor Therapiebeginn und 3 Monate nach Therapieende oder zu einem späteren Nachsorgetermin
Studienendpunkte	Einfluss der im peripheren Blut zirkulierenden Tregs auf <ul style="list-style-type: none"> • das erkrankungsfreie Überleben der Patientinnen und • das Gesamtüberleben der Patientinnen.
Rekrutierung	In der Klinik für Radioonkologie und Strahlentherapie der Charité, Beginn: 08/2009; Ende: 12/2012.

2.2 Aufbereitung der PBMCs

Aus dem peripher entnommenen, heparinisierten Vollblut wurden innerhalb von 24 h die sogenannten mononukleären Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) isoliert. Die Fraktionierung der Blutbestandteile erfolgte über das physikalische Trennverfahren der Dichtegradientenzentrifugation mit *Ficoll-Paque PLUS* (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) entsprechend der Herstellerangaben. Dabei trennen sich die Blutbestandteile während der Zentrifugation aufgrund ihrer unterschiedlichen spezifischen Dichte und der daraus resultierenden Sedimentationsgeschwindigkeit in einen Dichtegradienten auf. Durch die Zentrifugation sammeln sich die als PBMCs bezeichneten Lymphozy-

ten und Monozyten in der Interphase. Erythrozyten und Granulozyten lagern sich als Zellsediment ab (Abbildung 1) [109].

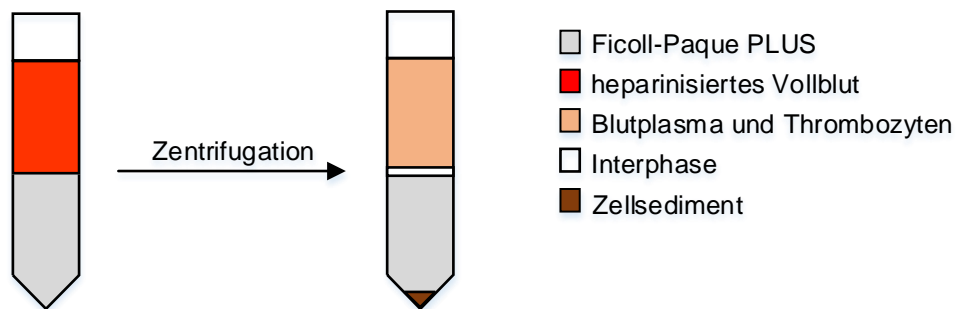


Abbildung 1: Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation modifiziert nach Luttmann et al. [109]

In zwei 15 ml-Röhrchen wurden 5 ml *Ficoll-Paque PLUS* vorgelegt. 7,5 ml Vollblut wurden 1 : 2 mit Nährmedium [RPMI-1640 Medium (Gibco, Carlsbad, USA), 10 % fetales Kälberserum (Gibco)] verdünnt, auf das *Ficoll-Paque PLUS* geschichtet und für 20 min bei 747 xg und 20 °C ohne Bremse zentrifugiert. Die entstandenen milchtrüben Interphasen wurden mit sterilen Pasteurpipetten abgehoben und gemeinsam in ein neues 15 ml-Röhrchen überführt. Um das restliche zytotoxische *Ficoll-Paque PLUS* zu entfernen, folgten zwei Waschschriffe mit 15 ml Nährmedium und anschließender Zentrifugation. Das Zellpellet wurde in 2 ml Einfriermedium [*Minimum Essential Medium* mit *Earle´s Salts* und *L-Glutamine* (Gibco), 15 % fetales Kälberserum, 1 % *Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids Solution* (Gibco), 10 % Dimethylsulfoxid (Gibco)] resuspendiert und auf zwei Einfrierröhrchen aufgeteilt.

Um eine längere Aufbewahrung ohne wesentlichen Viabilitätsverlust zu gewährleisten, wurden die Einfrierröhrchen mit Hilfe eines Einfrierbehälters auf -80 °C heruntergekühlt und nach spätestens einem Monat auf -196 °C in einen Stickstofftank überführt. Zur Untersuchung der Proben wurden die Zellen nach der Entnahme aus dem Stickstofftank zügig durch Handwärme aufgetaut und anschließend zwei Mal mit 10 ml 1x *Phosphate-Buffered Saline* pH 7,0 - 7,3 (PBS, Gibco) gewaschen und zentrifugiert (222 xg, 20 °C, 10 min). Parallel zu den Waschschriffen erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer die Zellzahlbestimmung der 1 : 10 verdünnten Zellsuspension, sodass maximal 5×10^6 Zellen in ein Durchflusszytometrierröhrchen aufgenommen wurden. Die restlichen Zellen wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsröhrchen überführt und zentrifugiert (13.000 xg, 20 °C,

2 min), um das entstandene Zellpellet entweder direkt der DNA-Isolation zu unterziehen oder als Trockenzellpellet bei -80 °C einzufrieren.

2.3 Phänotypische Quantifizierung der Tregs aus PBMCs mittels Durchflusszytometrie

2.3.1 Färbung

Bei der Durchflusszytometrie werden Antikörper markierte Zellen einer Zellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung in einem laminaren Probenstrom einzeln an einem Laser vorbeigeführt. An den Zellen gestreute oder reflektierte Strahlung sowie das durch fluoreszierende Antikörper emittierte Licht ermöglichen die Unterscheidung der Zellen anhand ihrer Größe, Granularität und spezifisch gebundenen Antikörper (Abbildung 2) [109].

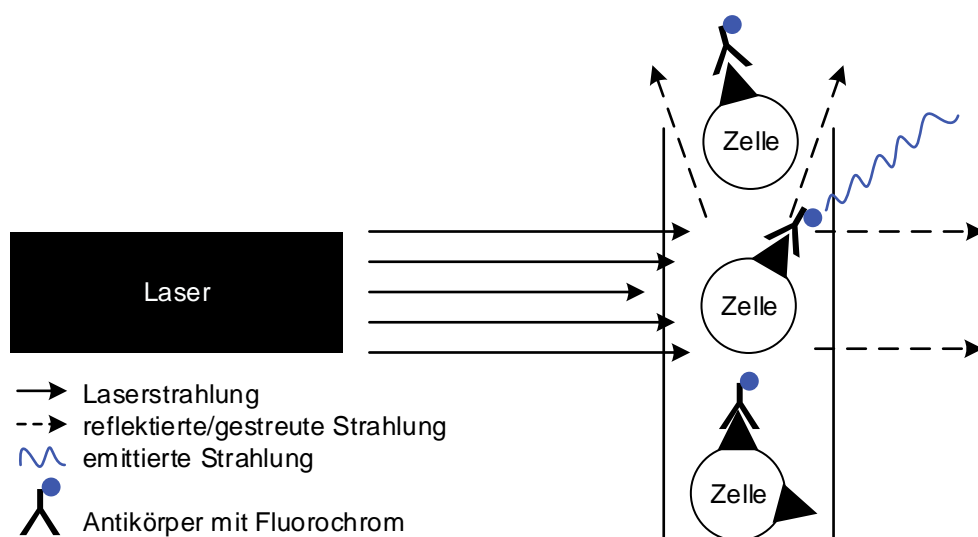


Abbildung 2: Prinzip der Durchflusszytometrie modifiziert nach Luttmann et al. [109]

Es wurde der zum Zeitpunkt der Messung besonders zuverlässige und häufig verwendete $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Treg-Phänotyp um den kollektiven T-Zell-Marker $CD3$ ergänzt, um eine bessere Abgrenzung zu Monozyten zu ermöglichen. Für die durchflusszytometrische Quantifizierung der Tregs als $CD3^+CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Zellen wurden die PBMCs in drei Schritten angefärbt:

- 1) Färbung zur Prüfung der Zellviabilität,
- 2) Färbung der Oberflächenmarker und
- 3) Fixierung und Permeabilisierung zur intrazellulären Färbung.

Zuerst wurden die in Abschnitt 2.2 in das Durchflusszytometrierröhrchen überführten Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und abzentrifugiert (1.200 xg, 20 °C, 5 min). Zur Unterscheidung der aufgetauten Zellen hinsichtlich ihrer Viabilität wurde das *Live/Dead® Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit* (Invitrogen, Carlsbad, USA) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Der fluoreszierende Farbstoff reagiert dabei mit zellulären Aminen. Bei Zellen mit geschädigter Zellmembran, wie bspw. bei toten Zellen, werden sowohl Amine der Zelloberfläche als auch intrazellulär gelegene Amine angefärbt. Hingegen werden bei lebenden Zellen mit intakter Zellmembran nur Amine der Zelloberfläche markiert. Daraus resultiert eine 50fach höhere Farbintensität toter Zellen im Vergleich zu lebenden Zellen. Die zu färbenden Zellen wurden in 1 ml PBS aufgenommen, für 30 min mit 1 µl Reagenz dunkel auf Eis inkubiert und danach mit 2 ml PBS gewaschen.

Zur Färbung der Oberflächenantigene wurden die Zellen mit 5 µl fluoreszenzgekoppelten Anti-CD3-, Anti-CD4- und Anti-CD25-Antikörpern (Tabelle 3) für 20 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und ebenfalls mit 2 ml PBS gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

Tabelle 3: Verwendete fluoreszenzgekoppelte Antikörper

Immunogen	Gekoppeltes Fluorochrom	Isotype	Klon	Hersteller
CD3	APC	murines IgG1, κ	UCHT1	BioLegend
CD4	PE/Cy5	murines IgG2b, κ	OKT4	
CD25	PE	murines IgG1, κ	BC96	
FOXP3	Alexa Fluor® 488	murines IgG1, κ	259D	

Zur Fixierung und Permeabilisierung der Zellen für die intrazelluläre Färbung wurde das *FOXP3 Fix/Perm Buffer Set* (BioLegend, San Diego, USA) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die Fixierung beruht auf einer graduellen Denaturierung der Proteine zur Konservierung der Zelle als Voraussetzung für die Perforation der Membran während der Permeabilisierung. Die Zellen wurden dazu in 1 ml 1x *Bio-Legend's FOXP3 Fix/Perm Solution* für 20 min bei RT im Dunklen inkubiert. Bevor die Zellen zur Permeabilisierung in 500 µl 1x *BioLegend's FOXP3 Perm Buffer* für 15 min bei RT im Dunklen inkubierten, wurden sie nacheinander mit 2 ml PBS und 1 ml 1x *BioLegend's FOXP3 Perm Buffer* gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (1.200 xg, 20 °C, 5 min)

wurde dem Zellüberstand 5 μ l Anti-FOXP3-Antikörper (Tabelle 3) hinzugefügt und für 30 min bei RT im Dunklen inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit PBS. Abschließend wurden die Zellen in 500 - 1000 μ l PBS aufgenommen und bis zur Messung dunkel auf Eis gelagert.

2.3.2 Messung

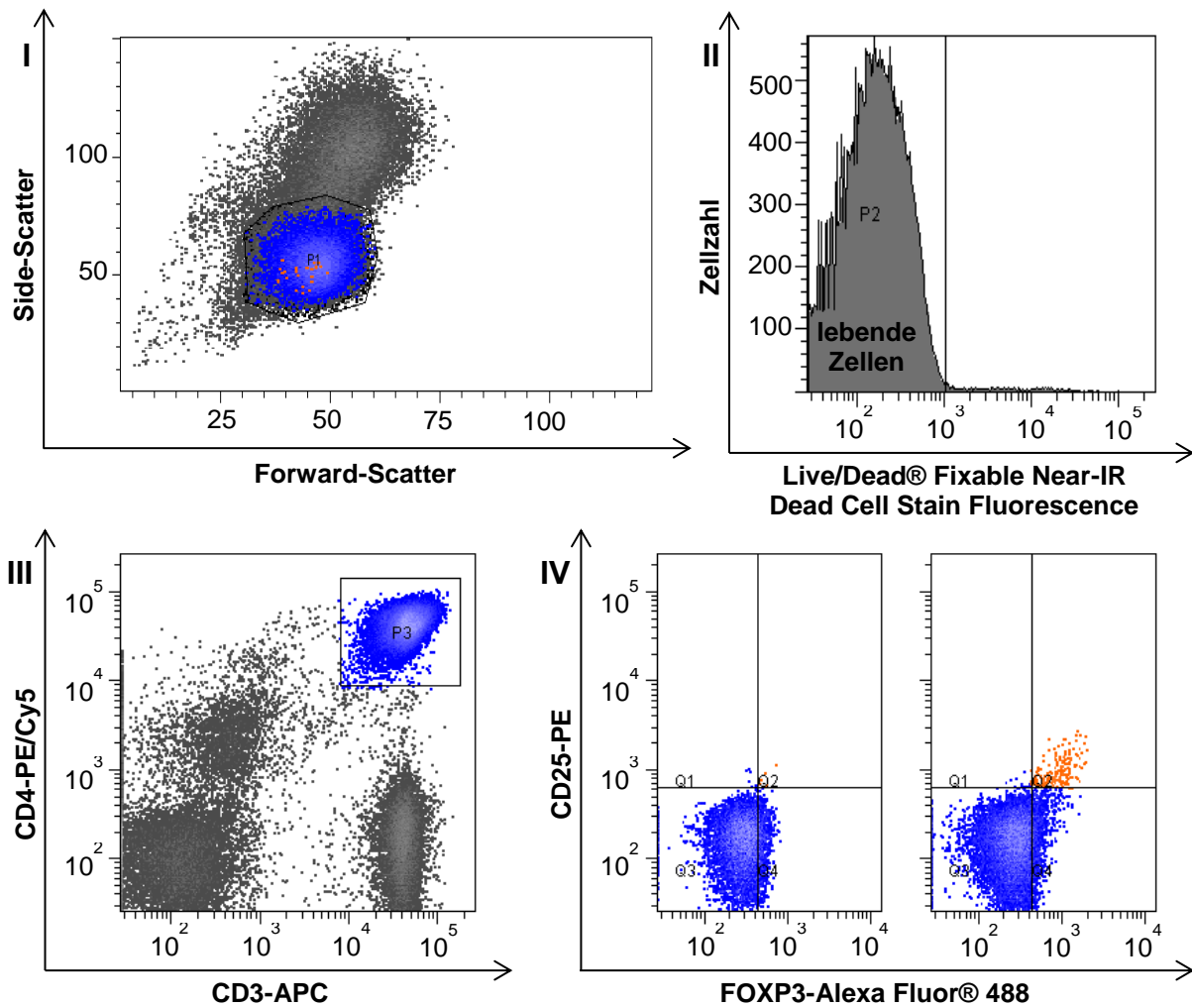


Abbildung 3: Auswahlstrategie der durchflusszytometrischen Messung anhand eines Beispiels

I: Auswahl der PBMCs (P1) aus allen Zellen im *Forward-Side-Scatter*-Diagramm, II: Auswahl der lebenden PBMCs (P2) aus allen PBMCs, III: Auswahl der lebenden $CD3^+CD4^+$ Zellen (P3, blau) aus den lebenden PBMCs, IV: Auswahl der lebenden $CD3^+CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Zellen (Q2, orange) aus den lebenden $CD3^+CD4^+$ Zellen als Tregs einer Patientin vor (links) und nach (rechts) primärer RCT.

Bei der Mehrfarben-Durchflusszytometrie entstehen spektrale Überlappungen der verwendeten Fluorochrome. Um die dadurch entstehenden, falsch positiven Signale zu minimieren, erfolgte eine Kompensation der Fluorochrome gegeneinander unter Verwendung von Einfachfärbungen für jedes Fluorochrom [109, 110]. Die ermittelten Kom-

pensationseinstellungen wurden auf alle Messungen, die am BD FACS Canto™ II (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) erfolgten, angewendet. Die schrittweise Analyse der durchflusszytometrischen Messung mit der BD FACSDiva Software (Version 16.1.2, BD Biosciences) ist in der Abbildung 3 dargestellt. Die lebenden $CD3^+CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Tregs wurden auf die lebenden $CD3^+CD4^+$ Zellen bezogen, um den relativen Treg-Anteil aus den T-Zellen zu bestimmen. Das tiefgestellte Kürzel Flow kennzeichnet durchflusszytometrisch und damit phänotypisch quantifizierte Tregs (Tregs_{Flow}).

Zur objektiven Festlegung der Grenzen zwischen den CD25- bzw. FOXP3-positiven und -negativen Zellpopulationen wurde die sogenannte *Fluorescence-minus-one*-Kontrolle (FMO-Kontrolle) eingesetzt. Die FMO-Kontrollen wurden gemäß des oben beschriebenen Protokolls gefärbt, wobei für die CD25-FMO-Kontrollen der Anti-CD25-Antikörper und für die FOXP3-FMO-Kontrollen der Anti-FOXP3-Antikörper weggelassen wurde, um so die exakte Lage der negativen Population bestimmen zu können [110]. Es wurden mehrere FMO-Kontrollen für CD25 und FOXP3 angelegt, um Intraassay-Abweichungen überprüfen und korrigieren zu können.

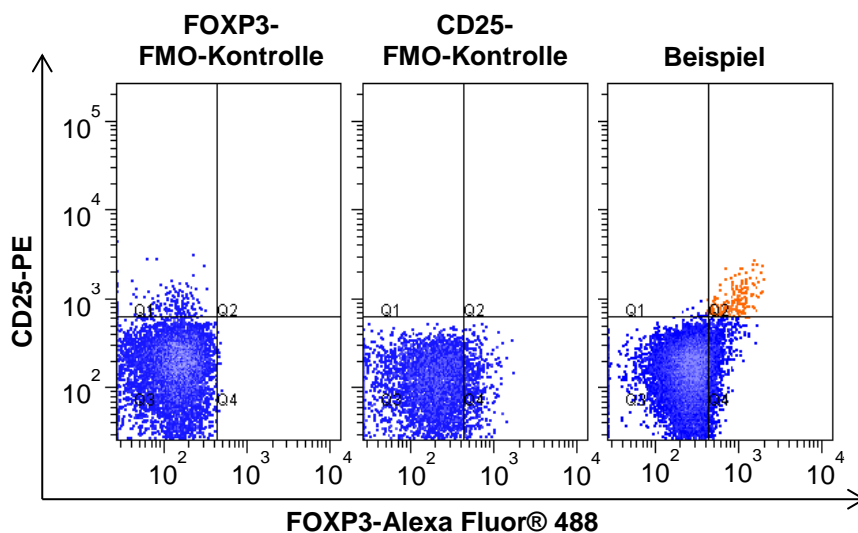


Abbildung 4: Festlegung der Grenzen mittels FMO-Kontrollen

Für die FMO-Kontrollen wurden bis zu 0,2 % falsch positive Zellen akzeptiert, darüber ist von einer Kontamination auszugehen. Unter den 22 CD25-FMO-Kontrollen gab es drei Proben mit bis zu 1 % falsch positiven Zellen, unter den 25 FOXP3-FMO-Kontrollen gab es hingegen keine Probe mit mehr als 0,2 % falsch positiven Zellen. Die festgelegten Grenzen wurden für alle Patientenproben angewendet.

2.4 Epigenetische Quantifizierung der Tregs aus PBMCs mittels methylierungsspezifischer Analyse

2.4.1 DNA-Isolation

Die DNA-Isolation aus den eingefrorenen PBMCs wurde entsprechend der Herstellerangaben des *Invisorb® Spin Tissue Mini Kits* (Strattec Molecular, Berlin, Deutschland) durchgeführt. Das Prinzip dieser DNA-Isolation basiert auf der reversiblen Bindung der DNA an eine Silica-Membran in Gegenwart hoch konzentrierter chaotroper Salze. Nicht gebundene Bestandteile werden mit Hilfe eines Ethanol-Salz-Puffers ausgewaschen. Anschließend wird die DNA mittels reinem Wasser oder einer gering konzentrierten Salzlösung eluiert, wodurch die Bindungen zwischen der DNA und den Silikaten der Membran wieder aufgehoben werden [111].

Das frische oder eingefrorene Zellpellet aus Abschnitt 2.2 wurde in PBS resuspendiert und zentrifugiert (13.000 xg, 20 °C, 2 min). Dann wurde das Pellet in 400 µl *Lysis Buffer G* und 40 µl *Proteinase K* gelöst und bei 56 °C für 2 h im Wasserbad unter Rütteln inkubiert. Nach der Zentrifugation (13.000 xg, 20 °C, 2 min) wurde der mit 200 µl *Binding Buffer A* vermischte Überstand auf den Filter eines neuen Reaktionsgefäßes überführt, für 1 min inkubiert und wieder zentrifugiert. Es folgten drei Waschschriffe mit 550 µl *Wash Buffer* und anschließender Zentrifugation (13.000 xg, 20 °C, 1 min) sowie eine abschließende zweiminütige Zentrifugation zum Trocknen des Filters. Der trockene Filter wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 50 µl angewärmtem *Elution Buffer D* benetzt. Nach dreiminütiger Inkubation wurde ein letztes Mal bei 8.600 xg und RT für 1 min zentrifugiert. Die DNA konnte anschließend direkt weiterverwendet werden, wurde zuvor jedoch auf ihre Qualität und Quantität überprüft.

Die Konzentration und Reinheit der (Plasmid-)DNA wurde mittels Absorptionsspektrometrie am NanoPhotometer® P360 (Implen, München, Deutschland) analysiert. Die Konzentrationsbestimmung beruht hierbei auf der Messung der optischen Dichte (OD) des die Nukleinsäure enthaltenden Eluats bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer anschließenden Multiplikation der OD mit einem für verschiedene Nukleinsäuren spezifischen Multiplikationsfaktor (für Doppelstrang-DNA 50 µg/ml) und der Verdünnung. Über das Verhältnis der OD, gemessen bei 260 nm und 280 nm, wird außerdem die Proteinkontamination ermittelt. Eine reine DNA-Lösung liegt bei einem Verhältnis OD_{260}/OD_{280} von 1,8 bis 2,0 vor [111].

Für die Messung wurde 1 µl des (Plasmid-)DNA enthaltenden Eluats eingesetzt. Als Referenzlösung diente der *Elution Buffer D* aus der DNA-Isolation bzw. der *TE Buffer* aus der Plasmidisolation (Abschnitt 2.4.4.2).

2.4.2 Bisulfitbehandlung der DNA

Zur Unterscheidung der Tregs von den anderen PBMCs anhand des Methylierungsmusters von FOXP3i1 wurde die DNA entsprechend des *MethylCode™ Bisulfite Conversion Kits* (Invitrogen) behandelt. Das Kit basiert auf einer selektiven, nicht-enzymatischen Desaminierung der nicht-methylierten (demethylierten) Cytosine zu Uracil in Anwesenheit von Natriumbisulfit bei denaturierter DNA. Cytosine mit einer Methylgruppe, sogenannte modifizierte 5-Methylcytosine, bleiben hingegen unverändert. In einer nachfolgenden PCR werden methylierte Cytosine als Cytosine erkannt, wohingegen nicht-methylierte, zu Uracil umgewandelte Cytosine als Thymin gelesen werden [112].

Für die Bisulfitbehandlung wurden jeweils 400 ng DNA in 20 µl destilliertem Wasser in Reaktionsröhrchen vorgelegt und mit 130 µl *CT Conversion Reagent* durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Es folgte eine mehrstufige Inkubation im Thermocycler (Tabelle 4).

Tabelle 4: Inkubationsbedingungen für die Bisulfitbehandlung

	Temperatur	Zeit
Denaturierung	98 °C	10 min
Bisulfitkonversion	64 °C	150 min
Abkühlung	4 °C	(max 20 h)

Die Bisulfit-behandelte DNA wurde sofort weiterverarbeitet. Dazu wurden 600 µl *Binding Buffer* auf den Filter eines neuen Reaktionsröhrchens vorgelegt. Die abgekühlte Suspension aus Tabelle 4 wurde dazugegeben, durch Invertieren vermischt und abzentrifugiert (13.000 xg, RT, 30 s). Bevor der Filter mit 200 µl *Desulphonation Buffer* benetzt wurde und für 20 min bei RT inkubiert, wurde er mit 100 µl *Wash Buffer* gewaschen. Nachdem der *Desulphonation Buffer* (13.000 xg, RT, 30 s) abzentrifugiert wurde, folgten zwei weitere Waschschrte mit 200 µl *Wash Buffer*. Danach wurde der Filter in ein neues Reaktionsröhrchen überführt, mit 15 µl *Elution Buffer* benetzt und abzentrifugiert

(13.000 xg, RT, 30 s). Das Eluat enthielt 400 ng/15 µl Bisulfit-behandelte DNA und konnte direkt in die PCR eingesetzt werden.

2.4.3 Methylierungsspezifische quantitative Real-Time-PCR

Für die quantitative *Real-Time*-Polymerasekettenreaktion (PCR) ist die konventionelle PCR um das Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers erweitert worden. Anstatt Licht einer charakteristischen Wellenlänge zu emittieren, gibt ein Fluorochrom (*Reporter*) nach seiner Anregung seine Energie an ein anderes, ausreichend nahes Fluorochrom (*Quencher*) ab und regt dieses an. Der angeregte *Quencher* emittiert daraufhin Licht einer charakteristischen Wellenlänge. Es handelt sich um zwei unterschiedliche Fluorochrome (*Reporter* und *Quencher*), wobei das Emissionsspektrum des ersten mit dem Absorptionsspektrum des zweiten übereinstimmt. Bei der TaqMan-Messmethode (Abbildung 5) liegen die beiden Fluorochrome des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (*Reporter* und *Quencher*) auf einem Oligonukleotid, welches zwischen den Primern an der Zielsequenz bindet. Ist das Oligonukleotid, auch *dual hybridization probe* genannt, intakt, ist die Intensität des vom *Reporter* ausgesendeten Lichts sehr gering, die des *Quenchers* dagegen sehr hoch. Wenn der *Reporter* durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase freigesetzt wird, wird die räumliche Nähe zum *Quencher* unterbrochen, wodurch das Lichtsignal des *Reporters* ansteigt. Je mehr DNA synthetisiert wird, desto mehr *Reporter*-Fluorochrome werden freigesetzt. Das vom Reporter emittierte Licht nimmt zu [111].

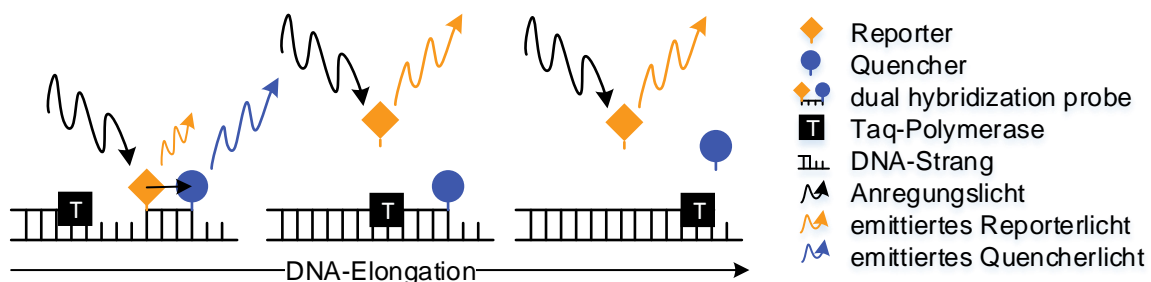


Abbildung 5: Prinzip der TaqMan-Messmethode modifiziert nach Mülhardt [111]

Durch die Bisulfitbehandlung der DNA (Abschnitt 2.4.2) konnte in der nachfolgenden PCR die DNA anhand des Methylierungsmusters unterschieden werden. Für das demethylierte und methylierte FOXP3i1 wurden bereits publizierte Sequenzen verwendet [95], ebenso für die C-less-C1-Sequenz nahe des SLC24 A3 Gens zur Quantifizierung

der DNA-Kopieanzahl einer Probe (Tabelle 5) [113]. Da über die C-less-PCR eine DNA-Sequenz ohne Cytosine, daher auch der Name C-less-C1-Sequenz, erkannt wird, erfolgt die Amplifikation dieser Sequenz unabhängig von der Bisulfitbehandlung und damit auch unabhängig vom Methylierungsmuster der DNA [113].

Tabelle 5: Verwendete Nukleinsäuresequenzen

Die unterstrichenen Basen kennzeichnen LNA(*locked nucleic acid*)-Modifikationen. Außer der *dual hybridization probe* der C-less-PCR von Life Technologies (Carlsbad, USA) wurden alle Nukleinsäuren über TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland) bezogen.

Sequenz	Primertyp	Primersequenz von 5´ zu 3´
Demethyliertes FOXP3i1 (Dem-PCR)	<i>Forward-Primer</i>	CTACCCCTCTTCTTCTCCTCCA
	<i>Reverse-Primer</i>	GATTTTTTTGTTATTGATGTTATGGT
	<i>dual hybridization probe</i>	(6-FAM) AAACCC <u>CAACAC</u> ATCCAACCA (BBQ)
Methyliertes FOXP3i1 (Met-PCR)	<i>Forward-Primer</i>	CTCTTCTCTTCCTCCGTAATATCG
	<i>Reverse-Primer</i>	GTTATTGACGTTATGGCGGTC
	<i>dual hybridization probe</i>	(6-FAM) AAACCC <u>GACGC</u> ATCCGAC (BBQ)
C-less-C1-Sequenz (C-less-PCR)	<i>Forward-Primer</i>	TTGTATGTATGTGAGTGTGGGAGAGA
	<i>Reverse-Primer</i>	TTTCTTCCACCCCTTCTCTTCC
	<i>dual hybridization probe</i>	(6-FAM) CTCCCCCTCTAACTCTAT (MGB-NFQ)

Die Messungen wurden in Doppelbestimmung in weißen *LightCycler® 480 Multiwell 96* Platten (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, USA) am *LightCycler® 480 II* (Roche Molecular Diagnostics) durchgeführt. Dazu wurden 2 µl des die Bisulfit-behandelte DNA enthaltenden Eluats aus Abschnitt 2.4.2 (≈ 53 ng) mit dem *LightCycler® 480 Probes Master* (Roche Molecular Diagnostics) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl entsprechend der Herstellerangaben angesetzt (Tabelle 6). Die PCR-Bedingungen sind Tabelle 7 zu entnehmen. Für jedes Primerpaar gab es eine Negativkontrolle. Gleichzeitig wurde zu jedem PCR-Amplikon eine externe Standardreihe in Form einer Verdünnungsreihe aus klonierten PCR-Produkten mitgeführt (Abschnitt 2.4.4).

Tabelle 6: Pipettieranleitungen

Komponenten	Dem-PCR	Met-PCR	C-less-PCR
	Menge je Probe in µl (gesamte Molarmasse in nM)		
Destilliertes Wasser	10,0	10,0	7,1
Forward-Primer	0,3 (150)	0,3 (150)	0,4 (200)
Reverse-Primer	0,3 (150)	0,3 (150)	0,4 (200)
dual hybridization probe	0,4 (100)	0,4 (100)	0,1 (50)
LightCycler® 480 Probes Master	10,0	10,0	10,0
Gesamtvolumen	18,0		

Tabelle 7: PCR-Bedingungen

	Dem-und Met- PCR		C-less-PCR		Zyklen
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	10 s	95 °C	10 s	45
Annealing	61 °C	50 s	65 °C	20 s	
Elongation	72 °C	1 s	72 °C	10 s	

Die Auswertung erfolgte mittels LightCycler® 480 Software (Version 1.5.0.39, Roche Molecular Diagnostics) über die *Absolute Quantification/2nd Derivative Maximum Method*. Basierend auf den in jedem PCR-Lauf mitgeführten Verdünnungsreihen über fünf Logarithmus-Stufen wurden die externen Standardkurven konstruiert (Abschnitt 2.4.4.1), sodass die unbekanntes Ausgangskonzentrationen der Proben durch einen Vergleich mit den Standardkurven ermittelt werden konnten. Mit den berechneten Messwerten der jeweiligen DNA-Sequenz erfolgte die Berechnung des relativen Treg-Anteils, dabei kennzeichnet das tiefgestellte Kürzel PCR methylierungsspezifisch und damit epigenetisch quantifizierte Tregs (Tregs_{PCR}):

$$\text{Treg - Anteil} = \frac{[\text{demethyliertes FOXP3i1}]}{[\text{demethyliertes FOXP3i1}] + [\text{methyliertes FOXP3i1}]} \cdot 2$$

oder

$$\text{Treg - Anteil} = \frac{[\text{demethyliertes FOXP3i1}]}{[\text{C-less - C1-Sequenz}]} \cdot 2$$

Da FOXP3i1 auf dem X-Chromosom liegt und damit eine der zwei Kopien bei Frauen inaktiv und methyliert vorliegt, erfolgte eine Multiplikation mit dem Faktor 2 [95, 96, 98]. Die Formeln unterscheiden sich in der Art der Berechnung der Gesamtzellzahl in der jeweiligen Probe. In der ersten Formel nach de Vries et al. wird die Gesamtzellzahl aus

der Summe der gemessenen Tregs (definiert über das demethylierte FOXP3i1) und der anderen Nicht-Treg-Zellen (definiert über das methylierte FOXP3i1) berechnet (Dem-Met-Formel) [95]. Hingegen wird die Gesamtzellzahl in der zweiten Formel über die bereits beschriebene methylierungsunabhängige C-less-C1-Sequenz nach Weisenberger et al. bestimmt, da diese Sequenz ein Maß für die Anzahl an DNA-Kopien einer Probe darstellt und bei einem diploiden Genom zwei Kopien einer Zelle entsprechen (Dem-C-less-Formel) [113].

2.4.4 Herstellung der externen Standardreihen mittels Klonierung

2.4.4.1 Klonierung

Für die Erstellung der externen Standardkurven zur absoluten Quantifizierung der Tregs und der Gesamtzellzahl der PBMCs einer Probe wurden die PCR-Produkte kloniert. Für die Klonierung wurde das *TOPO® TA Cloning® Kit* (Invitrogen) für PCR-Fragmente zusammen mit dem *pCR™ 2.1-TOPO Vector®* (Invitrogen) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Für diese Klonierung ist die Bildung eines unspezifischen Überhangs von einer Base, meistens Adenosin, am 3'-Ende des PCR-Amplikons durch die Taq-Polymerase nötig. Der Vektor besitzt dagegen einen einzelnen Thymin-Überhang am 3'-Ende und eine kovalent daran gebundene Topoisomerase I, die die Selbstligation des linearisierten Vektors verhindert und die Ligation des Vektors mit dem PCR-Produkt vermittelt. Der klonierte Vektor wird danach in Bakterien transformiert. Zur Selektion erfolgreich transformierter Bakterien enthält der Vektor Selektionsgene, u.a. die Antibiotikaresistenz gegen Kanamycin und das lacZ-Gen der β -Galactosidase für die Blau-Weiß-Selektion. Die Klonierungsstelle für das PCR-Fragment liegt dabei im lacZ-Gen, sodass das Gen bei erfolgreicher Insertion deaktiviert wird. Bleibt das Gen durch fehlende Insertion aktiv, können die Bakterien das Glycosid X-Gal zu einem blauen Farbstoff abbauen und färben sich blau an. Bei erfolgreicher Klonierung bleiben die Bakterien hingegen weiß [111].

Die Bisulfit-behandelte DNA eines gesunden Probanden wurde entsprechend des vorherigen Abschnitts amplifiziert. 4 μ l des frischen PCR-Produkts wurden mit 1 μ l Vektor und 1 μ l *Salt Solution* gemischt, für 5 min bei RT inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Für die Transformation wurden *One Shot® TOP 10 Chemically Competent E.coli* Bakterien (Invitrogen) auf Eis aufgetaut und mit 3 μ l Ligationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad für exakt 30 s.

Nach einminütiger Abkühlung auf Eis wurden 250 µl S.O.C.-Medium (Invitrogen) hinzugegeben und die Bakterien inkubierten erneut unter Rütteln für 1 h bei 37 °C. Danach wurden zwei antibiotikahaltige Nährböden [10 g/L Trypton/Pepton aus Casein (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 10 g/L Natriumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland), 5 g/L Hefeextrakt (BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA), 15 g/L Agar (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 50 mg/ml Kanamycin (Sigma-Aldrich), pH 7,0] mit 40 µl X-Gal (Sigma-Aldrich) benetzt sowie mit 50 µl bzw. 100 µl Bakteriensuspension beimpft. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C im Inkubator wurden die weißen Bakterienkolonien auf der Grundlage der Blau-Weiß-Selektion jeweils mit Hilfe einer Pipettenspitze in 10 ml-Bakterienröhrchen mit 3,5 ml antibiotikahaltigem Nährmedium [10 g/L Trypton/Pepton aus Casein, 10 g/L Natriumchlorid, 5 g/L Hefeextrakt, 50 mg/ml Kanamycin, pH 7,0] überführt. Es folgte eine weitere Inkubation von 16 h bei 37 °C im Rotationsinkubator.

2.4.4.2 Plasmidisolation

Eine Vermehrung der Bakterien zeigte sich durch eine deutliche Trübung der Suspension. Zur Plasmidisolation wurde das *PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen) gemäß der Herstellerangaben verwendet. Das Kit basiert auf einer alkalischen Lyse mit Natriumhydroxid und Natriumdodecylsulfat sowie einer anschließenden Neutralisation, wodurch die Bakterienmembranen zerstört, die genomische DNA und die Proteine denaturiert und abzentrifugiert werden können [111]. Aus dem Lysat wird nach dem Prinzip in Abschnitt 2.4.1 anschließend die Plasmid-DNA isoliert.

1,8 ml Bakteriensuspension wurden in ein 2 ml-Reaktionsröhrchen überführt und abzentrifugiert (12.000 xg, RT, 2 min). Das Bakterienpellet wurde in 250 µl *Resuspension Buffer* mit *RNase A* resuspendiert. Anschließend wurden 250 µl *Lysis Buffer* hinzugefügt und durch Invertieren gemischt. Nach einer Inkubation von 5 min wurden 350 µl *Precipitation Buffer* dazugegeben und invertiert, bis eine homogene Lösung entstanden war. Nach erneuter Zentrifugation (12.000 xg, RT, 10 min) wurde der Überstand auf den Filter eines neuen Reaktionsröhrchens überführt und abzentrifugiert (12.000 xg, RT, 1 min). Es folgten zwei Waschschrte mit 500 µl *Wash Buffer II* bzw. 700 µl *Wash Buffer I* mit einer jeweils einminütigen Inkubation und Zentrifugation (12.000 xg, RT, 1 min). Zum Trocknen des Filters wurde die Zentrifugation wiederholt. Danach wurde der Filter in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 75 µl erwärmtem *TE Buffer* benetzt und nach einer einminütigen Inkubation zentrifugiert (12.000 xg, RT, 2 min). Das Eluat

enthielt die zirkuläre Plasmid-DNA, deren Konzentration und Reinheit bestimmt wurde (vgl. Abschnitt 2.4.1).

2.4.4.3 Kontrolle der Klonierung

Zur Kontrolle der Klonierung wurde das zirkuläre Plasmid mit Hilfe des Restriktionsenzym *EcoRV* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) entsprechend der Herstellerangaben linearisiert, da *EcoRV* nur eine Schnittstelle im Vektor besitzt. Dazu wurden 1.000 ng zirkuläre Plasmid-DNA in 16 µl destilliertem Wasser vorgelegt und mit 2 µl *10x Buffer R* und 2 µl *EcoRV* bei 37 °C für 1 h im Heizblock inkubiert. Das linearisierte Plasmid wurde anschließend in die entsprechende PCR eingesetzt. Kam es zu einer Amplifikation, wurde der Insertionsbereich zwischen den im Plasmid enthaltenen M13 Primerbindungsstellen, die sich in unmittelbarer Nähe des Inserts befinden, sequenziert (Source BioScience, Berlin, Deutschland). Die PCR-Produkte selbst konnten aufgrund der geringen Basenlänge nicht direkt sequenziert werden (Amplikonlänge von 77 bp bzw. 63 bp für das demethylierte bzw. methylierte FOXP3i1 und 69 bp für die C-less-C1-Sequenz). Bestätigte die Sequenzierung die erfolgreiche Klonierung, wurden aus den linearisierten Plasmiden die Verdünnungsreihen von 10^0 pg/µl - 10^{-4} pg/µl in 1 mg/ml *Polyadenylic Acid* (Sigma-Aldrich) erstellt. Trotz wiederholter Versuche gelang die Klonierung des demethylierten FOXP3i1 nicht, weshalb wir dankend das Plasmid von Sophie Lucas (*Human Regulatory T Lymphocytes and TGF-β*, Institut de Duve, Brüssel, Belgien) annahmen.

2.5 Statistische Auswertung

Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs wurden die Proben als nicht normal verteilt angesehen und über nicht-parametrische Tests mittels SPSS (Version 22, IBM, Armonk, USA) ausgewertet. Auszuschließende Extremwerte der berechneten relativen Treg-Anteile wurden dazu aus der Summe des Mittelwertes der jeweiligen Analyse und dem vierfachen der zugehörigen Standardabweichung berechnet. Es wurde der Wilcoxon-Test für den Vergleich von gepaarten Stichproben, wie für den Vergleich von Treg-Anteilen vor und nach RCT derselben Patientinnen, verwendet. Für den Vergleich von mehr als zwei unverbundenen Stichproben wurde der Kruskal-Wallis-Test und für den Vergleich von nur zwei unverbundenen Stichproben der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die Korrelationsanalysen wurden mittels zweiseitigem Spearman-Test mit listenweisem Ausschluss durchgeführt. Zur Beurteilung des prognostischen Potentials

der Tregs vor RCT zur Detektion von Fernmetastasen wurde eine empirische *Receiver-Operating-Characteristic*(ROC)-Kurve erstellt, deren Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC) die Testgüte angibt. Zum Vergleichen von Gruppen in den Überlebenszeitanalysen wurden Kaplan-Meier-Kurven und der Log-Rank-Test verwendet. Hierbei erfolgte für das FIGO-Stadium eine gemeinsame Betrachtung der Stadien I - II und der Stadien III - IV aufgrund der geringen Fallzahlen. Die Treg-Anteile wurden anhand des Medians in Gruppen mit einem niedrigen ($<$ Median) und hohen (\geq Median) Treg-Anteil unterteilt (Tabelle 8). Aufgrund der geringen Fallzahl wurden das adenosquamöse und lymphoepitheliale Karzinom in den statistischen Analysen zusammengefasst als seltene Karzinome betrachtet.

Tabelle 8: Verwendete Mediane zur Gruppierung der Treg-Anteile

Median	Treg _{Flow} -Anteil	Treg _{PCR} -Anteil (Dem-Met-Formel)
vor RCT	1,550 %	1,822 %
nach RCT	3,550 %	1,879 %

In die multivariate Cox-Regression wurden nur Variablen mit signifikantem Ergebnis im Log-Rank-Test eingeschlossen. Bei signifikanten Ergebnissen der Tregs im Log-Rank-Test wurden diese als stetige Variablen in die multivariate Cox-Regression eingeschlossen. Die Signifikanz des multivariaten Cox-Regressions-Modells wurde gemäß der bedingten log-likelihood-Teststatistik angegeben. Im Sinne des explorativen Charakters der vorliegenden Arbeit wurde das Signifikanzniveau auf $P < 0,05$ festgelegt und keine Anpassung des Signifikanzniveaus bei Mehrfachtestung vorgenommen. Zu dem Kaplan-Meier-Schätzer der Überlebenskurven, der AUC der empirischen ROC-Kurven und dem Risiko (Hazard) signifikanter Parameter aus den multivariaten Cox-Regressions-Modellen wurde zusätzlich das 95%-Konfidenzintervall (95%-KI) angegeben. Eine statistische Beratung erfolgte durch Dr. Konrad Neumann (Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie, Charité, Berlin, Deutschland).

3 ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung der Patientenproben

3.1.1 Übersicht der Patientenproben

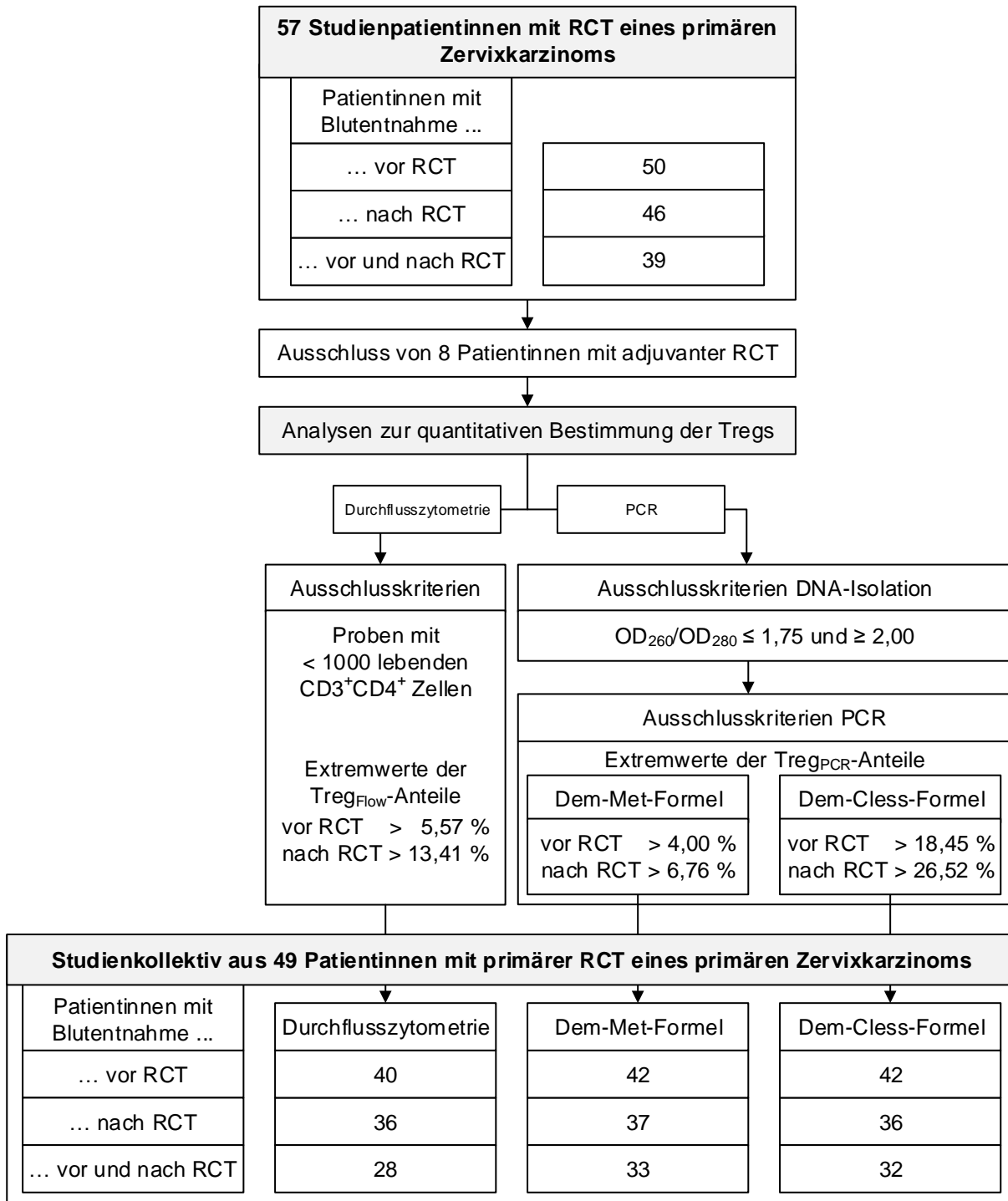


Abbildung 6: Probenübersicht für die Quantifizierung der Treg-Anteile aus PBMCs

Die Abbildung zeigt den anfänglichen Probenumfang von 57 Patientinnen, von denen die Patientinnen mit adjuvanter RCT aufgrund des sehr geringen Stichprobenumfangs ausgeschlossen wurden. Abhängig von der Analyse­methode gab es weitere methodenspezifische Ausschlusskriterien.

3.1.2 Probenentnahmezeitpunkt

3.1.2.1 Probenentnahme vor Therapie

Bei 44 von 49 Patientinnen lag eine Blutprobe vor RCT vor. Im Durchschnitt erfolgte die Blutentnahme neun Tage vor Therapiebeginn (Mittelwert = 8,8 Tage, Median = Modus = 8 Tage) mit einer Entnahmespanne von 0 bis 22 Tagen vor Therapiebeginn (Abbildung 7). Es gab keine Blutentnahmen jenseits von 4 Wochen vor RCT, da die Blutentnahmen vor Therapie überwiegend im Rahmen der Staginguntersuchung erfolgten und die RCT spätestens vier Wochen nach abgeschlossener Staginguntersuchung beginnen sollte.

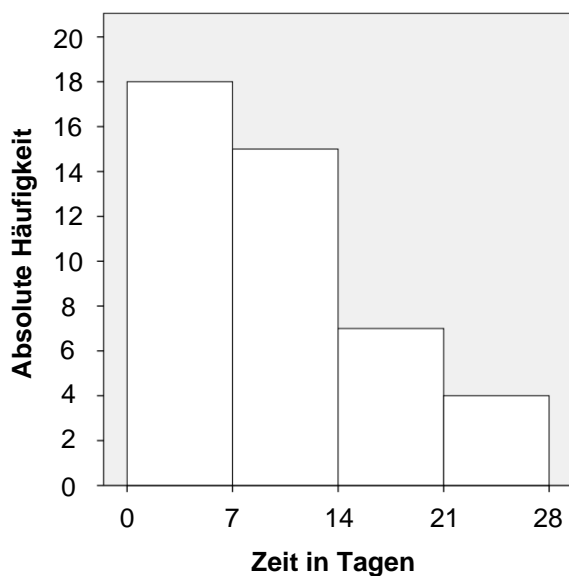


Abbildung 7: Blutentnahmezeitpunkte vor Beginn der RCT

3.1.2.2 Probenentnahme nach Therapie

Bei 40 von 49 Patientinnen lag eine Blutprobe nach RCT vor. Es zeigte sich eine bimodale, rechtsschiefe Verteilung der Blutentnahmen (Modi \leq Median mit 15,5 Wochen $<$ Mittelwert mit 25,5 Wochen) mit einer weiten Streuung von Entnahmen direkt nach Therapieabschluss (Minimum 0 Tage) bis zu mehr als einem Jahr danach (Maximum 76 Wochen) (Abbildung 8). Modus 1 bei 9 Wochen entspricht dem anfänglich ersten Nachsorgetermin zur zervikalen Kontrollabrasio, der im Verlauf der Studie auf drei Monate nach Therapie verschoben wurde. Modus 2 bei 15 Wochen spiegelt damit den korrigierten ersten Nachsorgetermin und den geplanten Blutentnahmezeitpunkt nach Therapie wider.

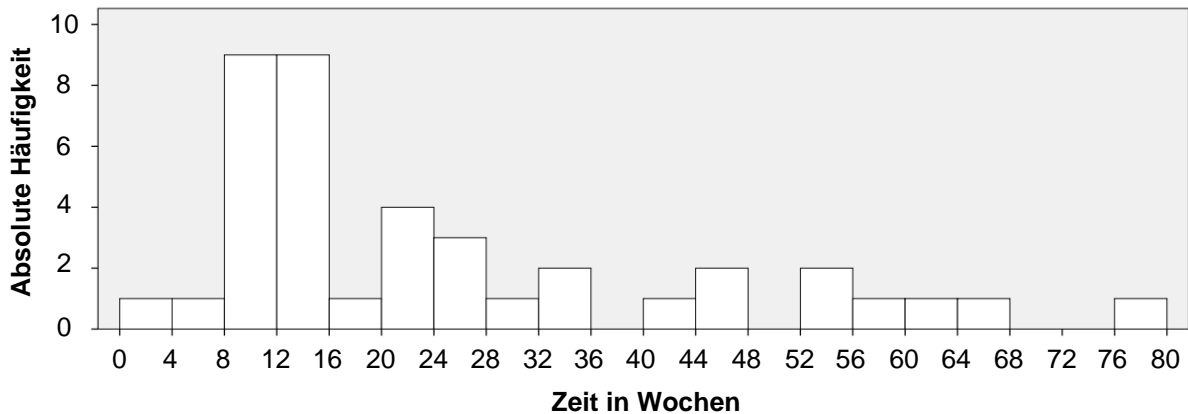


Abbildung 8: Blutentnahmezeitpunkte nach Abschluss der RCT

Aufgrund der weiten Streuung des Datensatzes wurden die Proben nach Blutentnahmen unter einem halben Jahr nach RCT (26 Proben, Mittelwert = 13 Wochen), da die Patientinnen innerhalb dieser Zeit theoretisch an bis zu drei Tumornachsorgen teilnehmen, und solchen über einem halben Jahr nach RCT (14 Proben, Mittelwert = 47 Wochen) unterteilt.

Im Falle eines Wiederauftritts des Tumors wurde dieser fast ausschließlich 4 bis 32 Wochen nach der zweiten Blutentnahme detektiert. Nur eine Patientin erhielt die Blutentnahme nach Therapie, als bereits seit 8 Wochen ein Tumorrezidiv vorlag.

3.2 Charakterisierung des Patientenkollektives

3.2.1 Patientendaten vor Beginn der RCT

3.2.1.1 Alter bei Erstdiagnose

Es zeigte sich eine Normalverteilung des Alters bei Erstdiagnose (Modus = Median = 47 Jahre). Die 49 Patientinnen hatten ein durchschnittliches Alter von 46 Jahren mit einer Altersspanne von 27 bis 73 Jahren.

3.2.1.2 Tumorcharakteristika

Mehr als drei Viertel (77 %) der Patientinnen litten an einem histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinom. Die weiteren histologischen Tumortypen und deren histologisches Grading sind in Abbildung 9 und Abbildung 10 zusammengefasst. Der überwiegende Anteil der Plattenepithelkarzinome war mäßig differenziert (70 %). Selbiges galt für das Adenokarzinom (57 % mäßig differenziert).

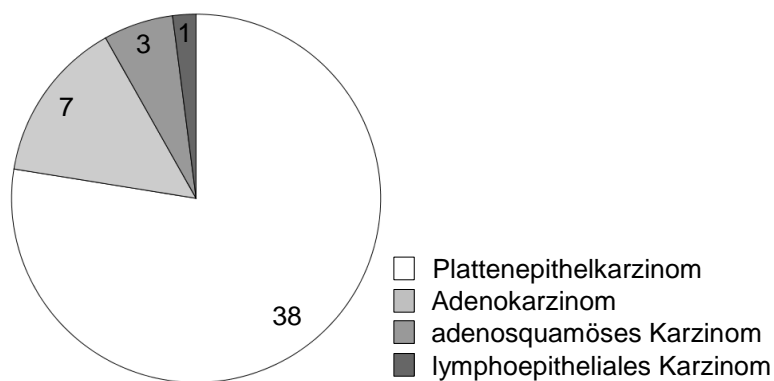


Abbildung 9: Verteilung der histologischen Tumortypen in absoluten Häufigkeiten

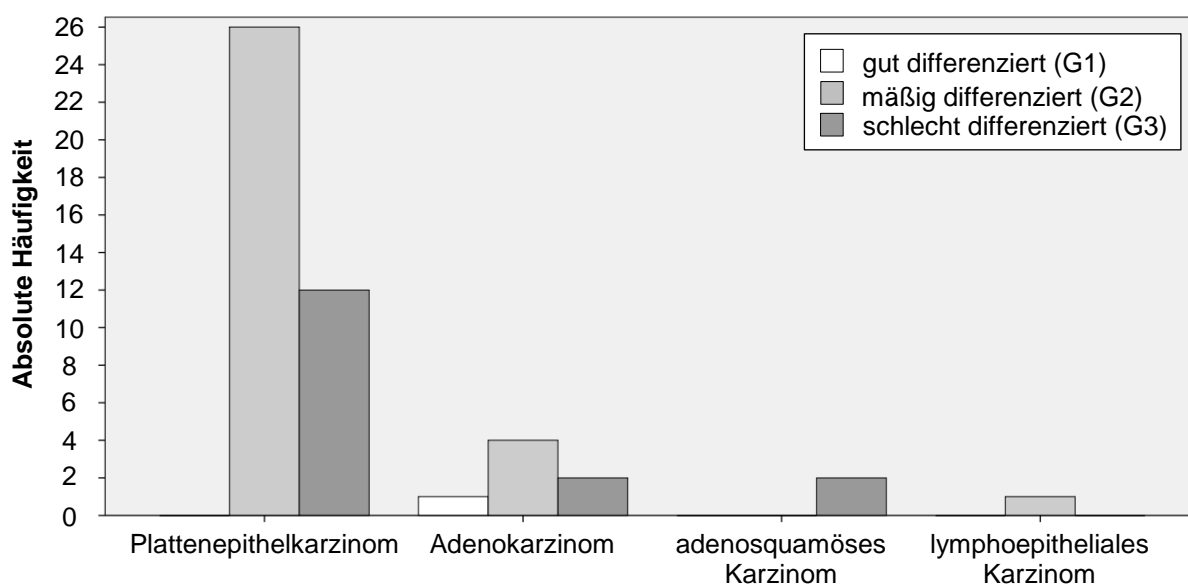


Abbildung 10: Histologisches Grading abhängig vom histologischen Tumortyp

Für eine Patientin mit einem adenosquamösen Karzinom war das histologische Grading unbekannt.

Klinisch zeigte sich bei mehr als der Hälfte der Patientinnen (57 %) ein FIGO-Stadium II (Abbildung 11). Von diesen Patientinnen hatten mehr als die Hälfte (57 %) bildgebend suspekten oder histologisch gesicherte regionäre Lymphknotenmetastasen. Im FIGO-Stadium III war der Anteil an Patientinnen mit regionären Lymphknotenmetastasen noch höher (77 %). Insgesamt betrachtet haben zwei Drittel der Patientinnen (67 %) bildgebend suspekten oder histologisch gesicherte regionäre Lymphknotenmetastasen. Hingegen hatten nur 27 % der Patientinnen Fernmetastasen, darunter 62 % mit histologischer Sicherung. Der Anteil an Patientinnen mit Fernmetastasen nahm mit steigendem FIGO-Stadium von 0 % im Stadium I, 21 % im Stadium II und 54 % im Stadium III zu (Stadium IV bei nur einer Patientin nicht betrachtet.) (Abbildung 12).

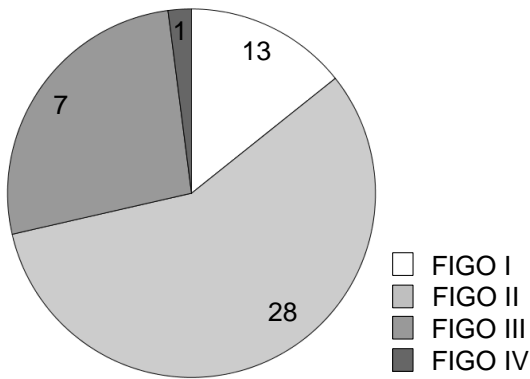


Abbildung 11: Verteilung der klinischen FIGO-Stadien in absoluten Häufigkeiten

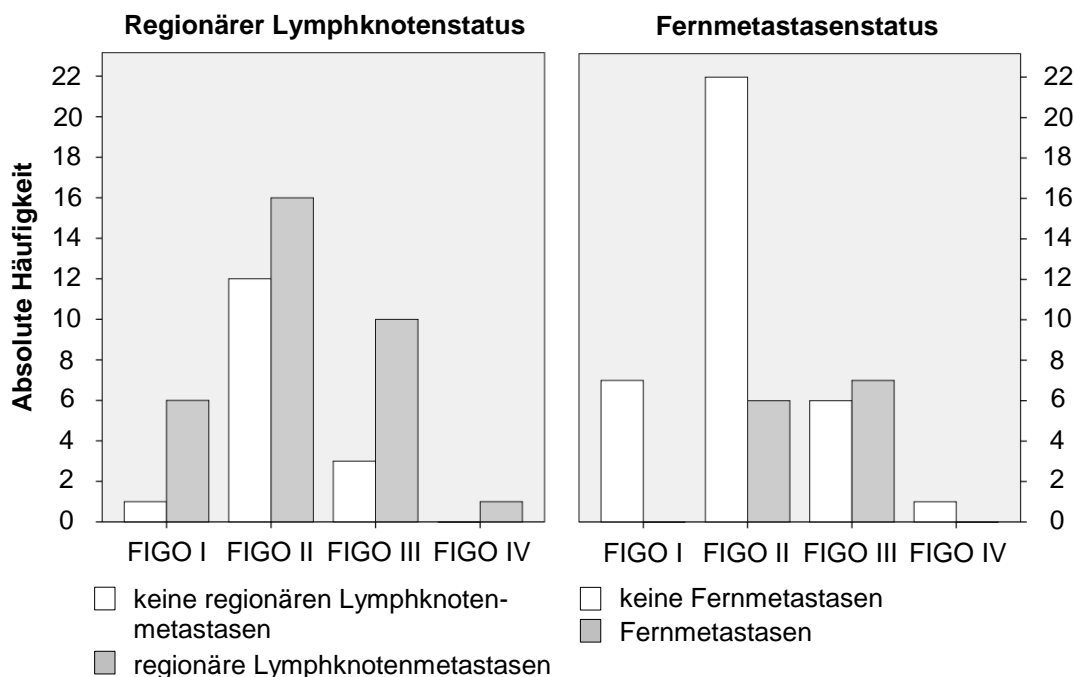


Abbildung 12: Metastasierungsstatus abhängig vom FIGO-Stadium

Unter den Patientinnen mit Fernmetastasen wiesen 12 Patientinnen paraaortale Lymphknotenmetastasen und eine Patientin eine Peritonealkarzinose auf.

3.2.2 Patientendaten während der RCT

Die durchschnittliche Therapiedauer betrug 49 Tage mit einer Therapiespanne von 40 bis 65 Tagen. Alle Patientinnen erhielten eine fraktionierte perkutane Strahlentherapie der Primärtumorregion und der pelvinen Lymphabflusswege bis zu einer Gesamtdosis von 50,4 Gy inklusive eines integrierten Boosts der Parametrien bis zu einer Gesamtdosis von 59,4 Gy. Bei Patientinnen mit paraaortalen Lymphknotenmetastasen wurde das Bestrahlungsfeld um die paraaortalen Lymphknoten erweitert und bis zu einer Gesamtdosis von 50,4 Gy bestrahlt. Ausgenommen war eine Patientin mit einer zusätzli-

chen zervikalen Lymphknotenradiatio. 44 Patientinnen erhielten eine kombinierte, intrazervikale, tumorumschließende (*High-Dose-Rate*-)Brachytherapie bis zu einer geplanten Gesamtdosis von 25 - 30 Gy und vier Patientinnen eine äquivalente Cyberknifetherapie bis zu einer Gesamtdosis von 30 Gy. Nur eine Patientin musste die Brachytherapie bei einer Gesamtdosis von 20 Gy aufgrund einer Verschlechterung des Allgemeinzustandes vorzeitig abbrechen.

Die simultane Chemotherapie erfolgte mit Cisplatin (40 mg/m^2 Körperoberfläche), wobei drei Patientinnen bei bestehenden Kontraindikationen Carboplatin erhielten. Aufgrund Therapie-assoziierten Komplikationen erfolgte bei fünf Patientinnen (14 %) nur eine modifizierte, dosisreduzierte Chemotherapie.

3.2.3 Patientendaten nach Abschluss der RCT

3.2.3.1 Erkrankungsfreies Überleben

Abbildung 13 gibt einen Überblick über den Tumorstatus aller 49 Patientinnen nach primärer RCT. Eine vollständige Remission lag vor, wenn es während der Nachsorgeuntersuchungen keinen Hinweis auf ein Tumorrezidiv gab. Deshalb wurden im Rahmen der Nachsorgeuntersuchungen über Anamnese, gynäkologische Untersuchung, zervikale Abrasio, Röntgen bzw. CT des Thorax, Sonografie bzw. CT des Abdomens und der Nieren, MRT des Beckens und Kontrolle der Tumormarker nach Hinweisen auf ein Tumorrezidiv gesucht. Als Tumorrezidiv galt der radiologisch sichere oder histologisch gesicherte Wiederauftritt des Zervixkarzinoms unabhängig von der Lokalisation. Ein Tumorrezidiv erlitten 24,5 % der Patientinnen, darunter 42 % mit histologischer Sicherung. Bei 83 % der Patientinnen mit einem Tumorrezidiv trat dieses innerhalb der ersten zwei Jahre nach Therapieende auf. Der späteste Zeitpunkt eines Tumorrezidivs war 35 Monate nach Ende der RCT. Bei zehn Patientinnen trat der Tumor in Form von Fernmetastasen und bei den restlichen zwei als regionales bzw. lokoregionäres Rezidiv mit Fernmetastasen wieder auf.

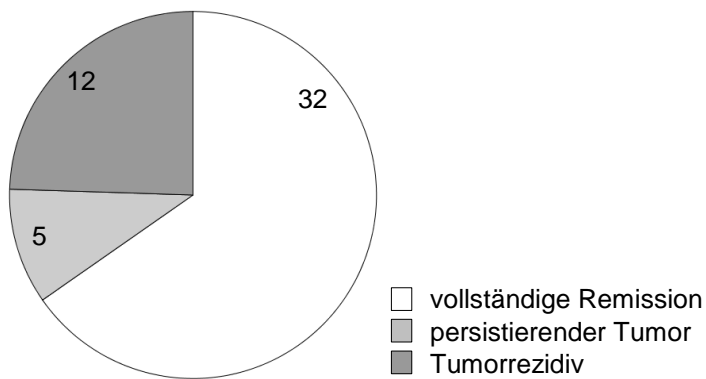


Abbildung 13: Verteilung des Tumorstatus der Patientinnen nach RCT zum Zeitpunkt der Auswertung in absoluten Häufigkeiten

Das erkrankungsfreie Überleben berechnete sich aus der Differenz zwischen dem Ende der Therapie und der letzten unauffälligen Tumornachsorge für zensierte Daten bzw. dem Datum des Tumorrezidivs beim Wiederauftreten des Tumors (Tabelle 9). Patientinnen mit persistierendem Tumor sind per Definition zu keinem Zeitpunkt tumorfrei (0 Monate), ebenso die Patientin mit unbekanntem Tumorstatus, da sie bereits 3 Monate nach Therapieende starb, an der ersten Tumornachsorge nicht teilnehmen konnte und potentiell an ihrem Tumor verstorben war. Die mediane Beobachtungszeit der Patientinnen mit vollständiger Remission betrug 38 Monate (Minimum 9 Monate und Maximum 59 Monate).

Tabelle 9: Kennzahlen des erkrankungsfreien Überlebens gemäß der Kaplan-Meier-Kurve

Zeitpunkt in Jahren	Anzahl an Patientinnen			Erkrankungsfreie Überlebenswahrscheinlichkeit		
	unter Risiko	mit Ereignis	zensiert	Kaplan-Meier-Schätzer	95%-KI	
0 (vor RCT)	49	0	0			
0 (nach RCT)	44	5	0	89,8 %	98,4 %	81,2 %
1	36	12	1	75,3 %	87,7 %	62,9 %
2	29	15	5	68,8 %	81,7 %	54,9 %
3	16	17	16	62,6 %	77,4 %	47,8 %

Im Weiteren wurden die in Abbildung 14 ausgewählten klinischen Prognosefaktoren auf das Vorliegen eines signifikanten Einflusses auf das erkrankungsfreie Überleben der Patientinnen untersucht. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen Patientinnen mit den FIGO-Stadien I - II und den FIGO-Stadien III - IV, ebenso zwischen Patientinnen ohne und mit Fernmetastasen. Dagegen hatten der regionäre Lymphknoten-

status, der histologische Tumortyp und das histologische Grading keinen signifikanten Einfluss auf das erkrankungsfreie Überleben.

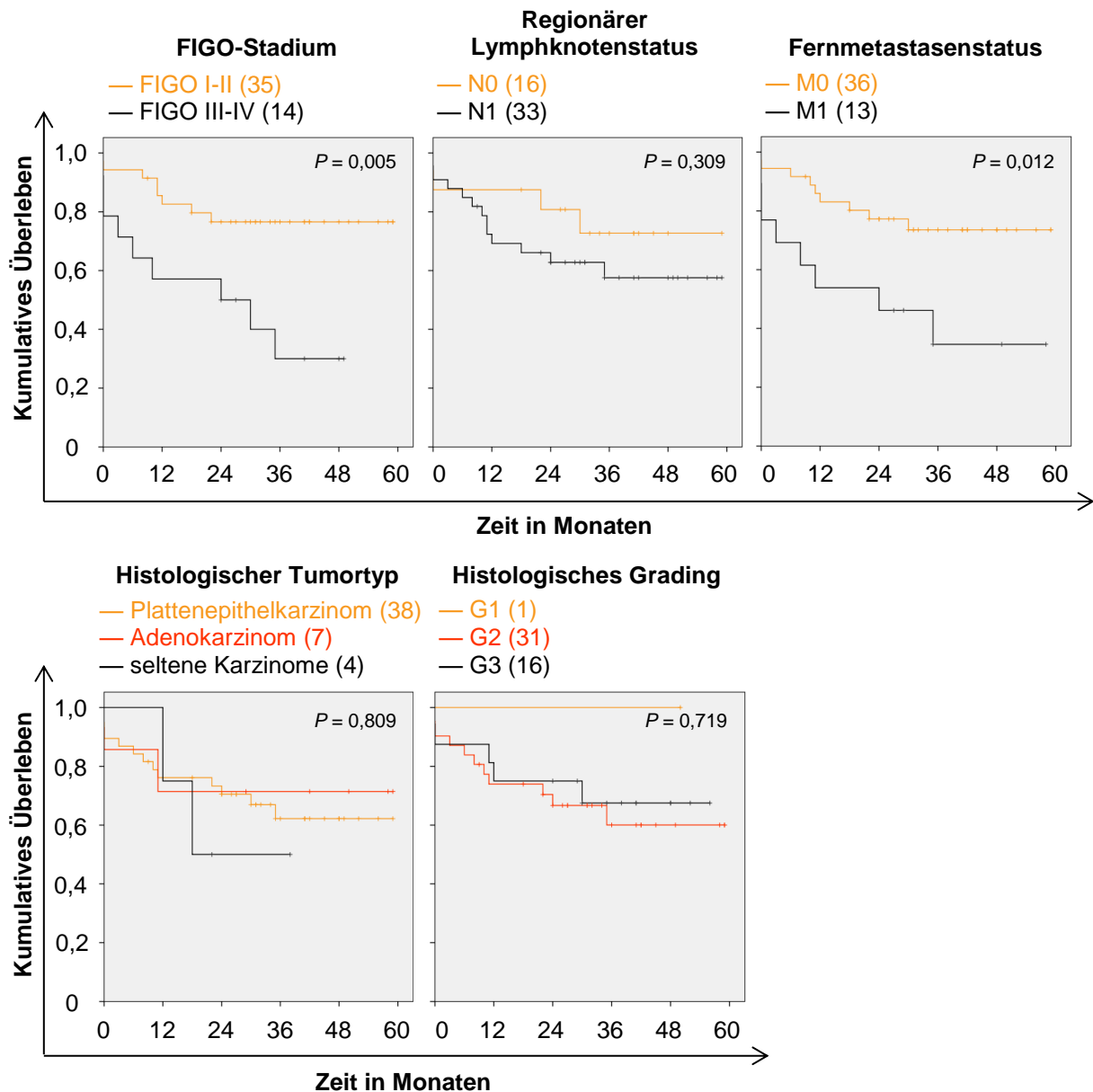


Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurven des erkrankungsfreien Überlebens abhängig von verschiedenen Prognosefaktoren

In den Diagrammen sind das Signifikanzniveau und in Klammern die Patientenzahl der einzelnen Untergruppen angegeben. Senkrechte Striche in den Kurven kennzeichnen zensierte Daten.

3.2.3.2 Gesamtüberleben

Das Gesamtüberleben der Patientinnen wurde aus dem Datum der Erstdiagnose und dem letzten Kontakt (zensierte Daten) oder Sterbedatum der Patientinnen (Ereignis) berechnet (Tabelle 10). Die mediane Gesamtbeobachtungszeit der lebenden Patientin-

nen betrug 43 Monate (Minimum 26 Monate und Maximum 63 Monate). Innerhalb des Beobachtungszeitraums verstarben 31 % der Patientinnen, darunter eine Patientin, deren Tumorstatus nach RCT und zum Zeitpunkt des Todes unbekannt war. In der weiteren Betrachtung wurde diese Patientin, wie in Abschnitt 3.2.3.1, als potentiell an ihrem Tumor verstorben, gewertet. Damit entspricht das Gesamtüberleben auch dem tumorspezifischen Überleben. Abbildung 15 zeigt den Tumorstatus der lebenden und bereits verstorbenen Patientinnen nach RCT.

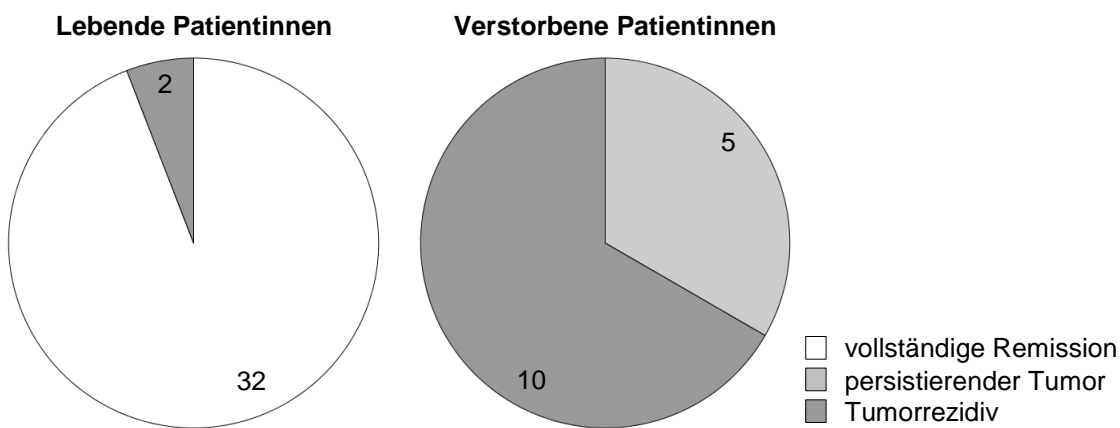


Abbildung 15: Verteilung des Tumorstatus nach RCT zum Zeitpunkt der Auswertung abhängig vom Überleben der Patientinnen in absoluten Häufigkeiten

Tabelle 10: Kennzahlen des Gesamtüberlebens gemäß der Kaplan-Meier-Kurve

Zeitpunkt in Jahren	Anzahl an Patientinnen			Gesamtüberlebenschance		
	unter Risiko	tot	zensiert	Kaplan-Meier-Schätzer	95-%-KI	
0	49	0	0			
1	44	5	0	89,8 %	98,4 %	81,2 %
2	37	12	0	75,5 %	87,7 %	63,3 %
3	22	14	13	71,1 %	84,1 %	58,1 %
4	11	15	23	67,3 %	81,7 %	52,9 %

Im Weiteren wurden die in Abbildung 16 ausgewählten klinischen Prognosefaktoren auf das Vorliegen eines signifikanten Einflusses auf das Gesamtüberleben der Patientinnen untersucht. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich nur zwischen Patientinnen mit den FIGO-Stadien I - II und den FIGO-Stadien III - IV. Dagegen hatten der regionäre Lymphknoten- oder Fernmetastasenstatus, der histologische Tumortyp und das histologische Grading keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben.

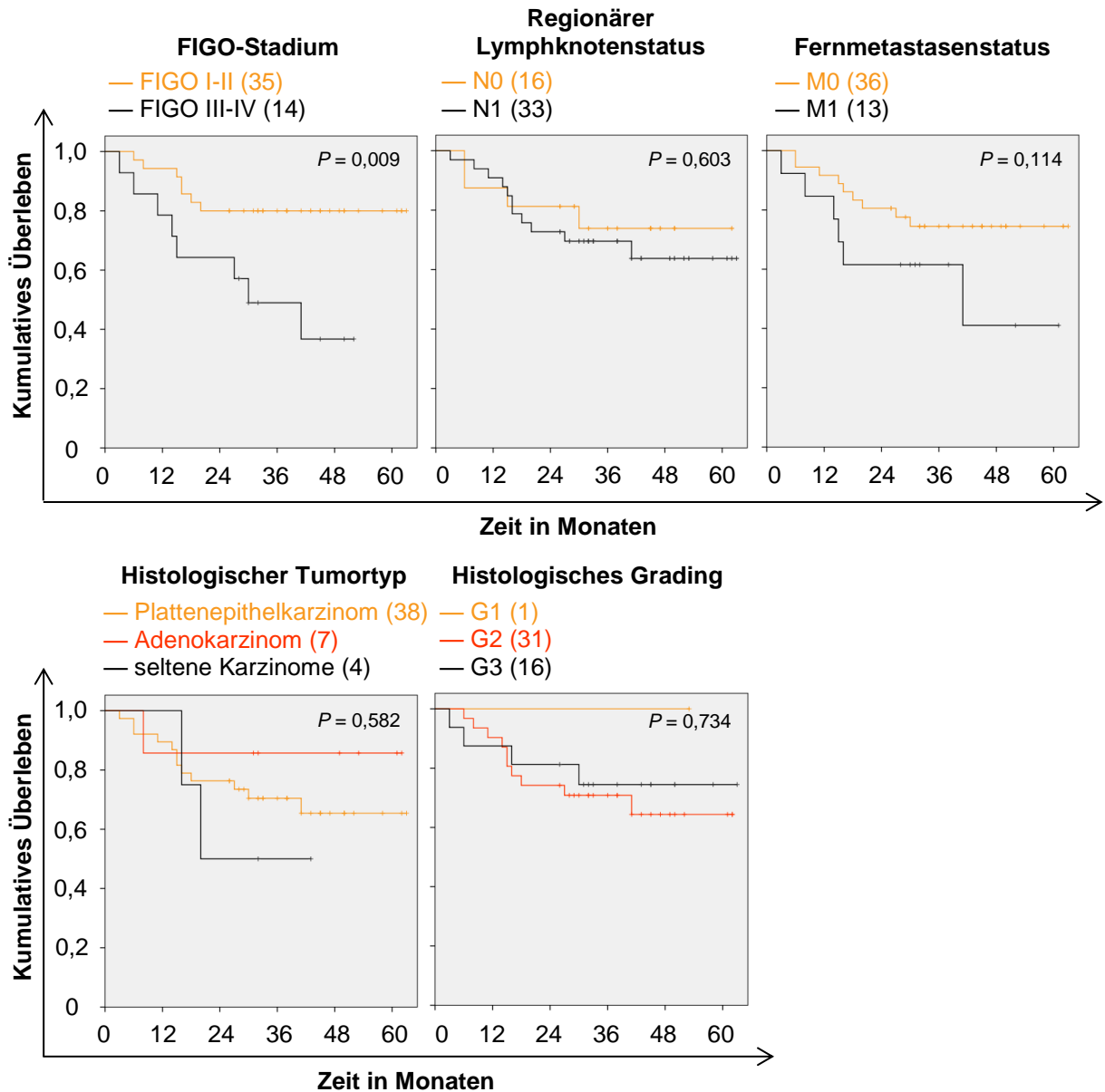


Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens abhängig von verschiedenen Prognosefaktoren

In den Diagrammen sind das Signifikanzniveau und in Klammern die Patientenzahl der einzelnen Untergruppen angegeben. Senkrechte Striche in den Kurven kennzeichnen zensierte Daten.

3.3 Validierung der epigenetisch quantifizierten Treg-Anteile

3.3.1 Validierung der PCR-Qualität

In der vorliegenden Arbeit wurden alle relevanten Daten zu den durchgeführten quantitativen *Real-Time*-PCR-Analysen aufgelistet, die nach den Richtlinien der *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments* zur Sicherung der PCR-Datenqualität, deren Relevanz, Interpretation und Reproduzierbarkeit empfohlen werden [114]. Im Folgenden wurde nochmals besondere Aufmerksam-

keit auf die Validierungskriterien der PCR gelegt. Dabei wurden die tatsächliche Effizienz aus den gemittelten Kurvenanstiegen aller externen Standardreihen und die Präzision aus den Standardabweichungen aller technischen Replikate (Doppelbestimmungen) der einzelnen PCRs berechnet.

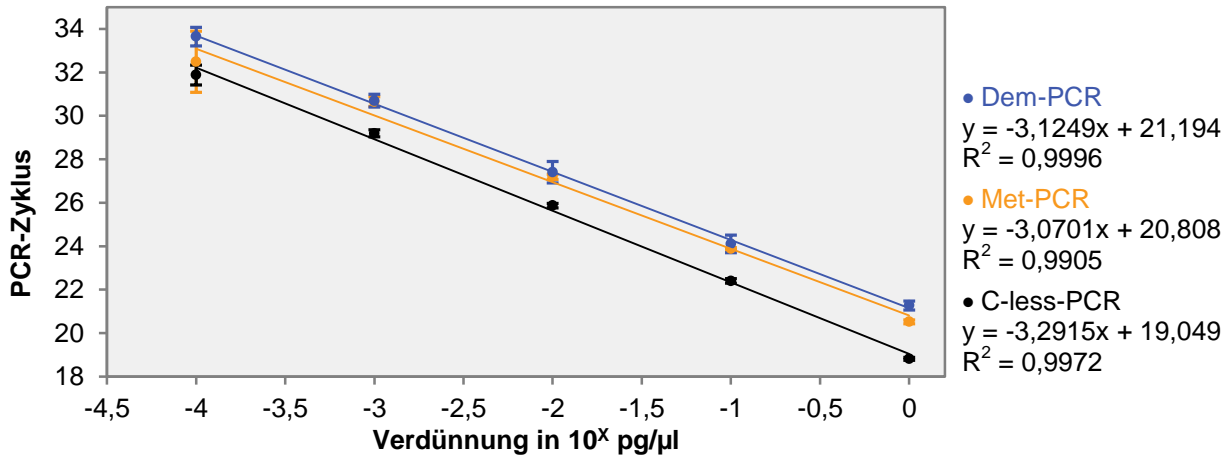


Abbildung 17: Externe Standardkurven der PCRs

Das Diagramm zeigt die gemittelten externen Standardkurven und die intraanalytischen Abweichungen (Standardabweichungen), die aus den Verdünnungsreihen der Dem-, Met- und C-less-PCRs von 10^0 pg/ μ l bis 10^{-4} pg/ μ l für 11 individuelle Experimente berechnet wurden. Kurvenanstieg, x-Achsen-Schnittpunkt und Korrelationskoeffizient der Standardkurven sind den nebenstehenden Gleichungen zu entnehmen.

Tabelle 11: Tatsächliche Effizienz und Präzision der PCRs

	Dem-PCR	Met-PCR	C-less-PCR
Effizienz	2,0893	2,1170	2,0129
Präzision	0,111	0,032	0,028

Die theoretische Effizienz einer PCR liegt bei zwei und die tatsächliche PCR-Effizienz sollte zwischen 1,9 und 2,1 liegen, da es in jedem Zyklus zu einer Verdopplung der vorhandenen DNA kommt. Bei einer Standardabweichung von $\leq 0,167$ kann eine zweifache Verdünnung in mehr als 99,7 % der Fälle identifiziert werden [115]. Die oben dargestellten externen Standardkurven und die darüber ermittelte Effizienz und Präzision der Dem-, Met- und C-less-PCR verdeutlichen die Zuverlässigkeit und hohe Datenqualität der PCR-Analysen (Abbildung 17 und Tabelle 11). Damit konnten diese PCR-Ergebnisse zur epigenetischen Quantifizierung der Treg-Anteile herangezogen werden.

3.3.2 Vergleich der epigenetisch quantifizierten Treg-Anteile

Die epigenetisch quantifizierten Treg-Anteile, welche mit Hilfe der Formeln aus Abschnitt 2.4.3 berechnet wurden, sind in der nachfolgenden Abbildung 18 dargestellt.

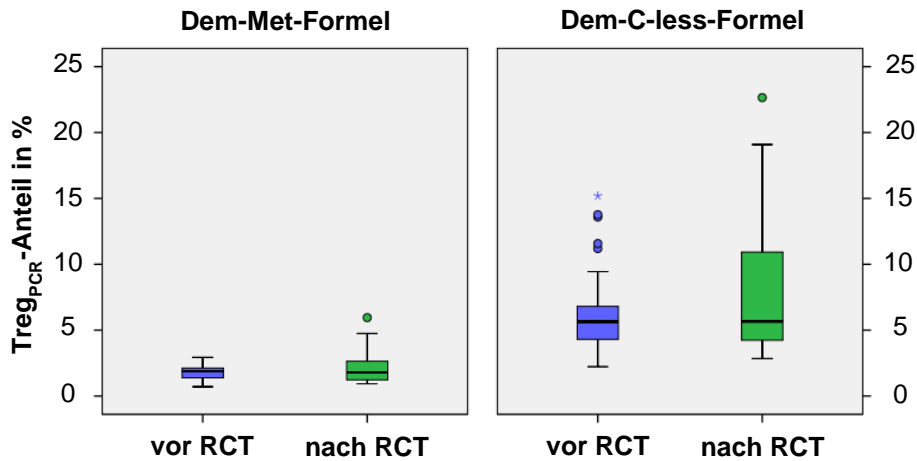


Abbildung 18: Vergleich der Treg_{PCR}-Anteile vor und nach RCT

Die Treg_{PCR}-Anteile aus der Dem-C-less-Formel zeigen eine vergleichsweise weite Streuung.

Die über die Dem-Met-Formel ermittelten Treg_{PCR}-Anteile betragen durchschnittlich 1,73 % ($\pm 0,579$ %) vor RCT und 2,17 % ($\pm 1,147$ %) nach RCT und unterschieden sich signifikant von den über die Dem-C-less-Formel ermittelten Treg_{PCR}-Anteilen mit einem durchschnittlichen Treg_{PCR}-Anteil von 6,23 % ($\pm 3,055$ %) vor RCT und 7,80 % ($\pm 4,682$ %) nach RCT (Wilcoxon-Test; $P(\text{Treg}_{\text{PCR}}\text{-Anteil vor RCT}) < 0,001$ für 42 Patientinnen; $P(\text{Treg}_{\text{PCR}}\text{-Anteil nach RCT}) < 0,001$ für 36 Patientinnen). Trotzdem zeigte sich eine signifikante, starke, positiv monotone Korrelation zwischen den Ergebnissen sowohl für die Treg_{PCR}-Anteile vor RCT (Spearman-Korrelation; $\rho = 0,843$; $P < 0,001$ für 42 Patientinnen) als auch nach RCT (Spearman-Korrelation; $\rho = 0,871$; $P < 0,001$ für 36 Patientinnen) (Abbildung 19).

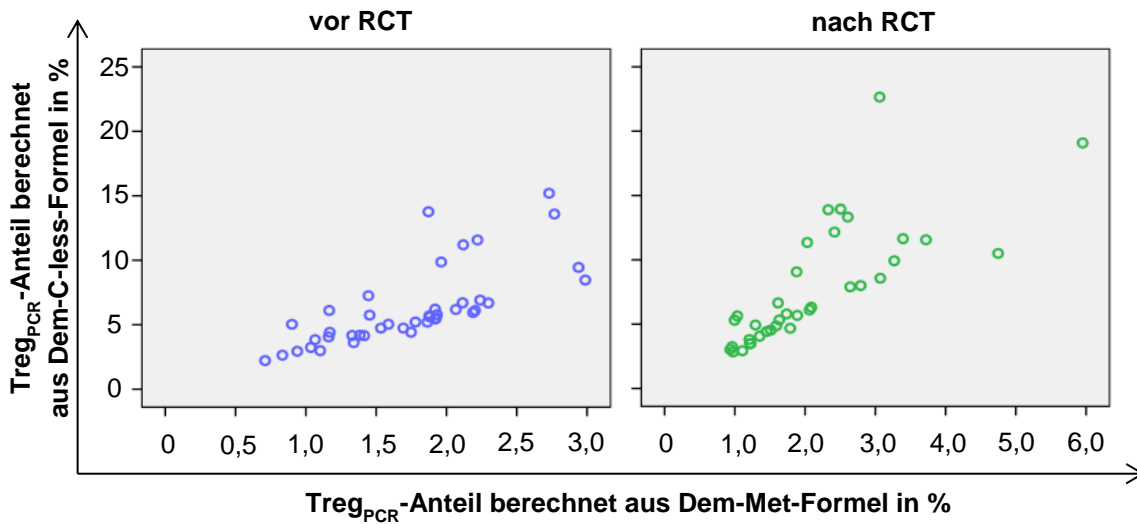


Abbildung 19: Streudiagramm der Treg_{PCR}-Anteile vor bzw. nach RCT

Der signifikante Unterschied zwischen den Treg_{PCR}-Anteilen vor bzw. nach RCT basiert auf den Unterschieden der detektierten Gesamtzellzahl der Proben. Dabei diente die detektierte Gesamt-DNA als Surrogatmarker für die Gesamtzellzahl einer Probe. Mit der C-less-PCR wurde stets ein geringerer Anteil an eingesetzter DNA gemessen als gemeinsam über die Dem- und Met-PCR, was zu einem verhältnismäßig größeren Treg_{PCR}-Anteil bei der Berechnung über die Dem-C-less-Formel führte. Die C-less-PCR detektierte nur 29 % bzw. 28 % der gemeinsam über die Dem- und Met-PCR bestimmten Gesamt-DNA für Proben vor bzw. nach RCT. Es handelte sich dabei um ein stabiles intraindividuelles Detektionsverhältnis zwischen der Gesamt-DNA, gemessen gemeinsam über die Dem- und Met-PCR bzw. allein über die C-less-PCR, sodass das Detektionsverhältnis der Proben vor und nach RCT einer Patientin sich nicht signifikant unterschied (Wilcoxon-Test, $P = 0,295$ für 32 Patientinnen).

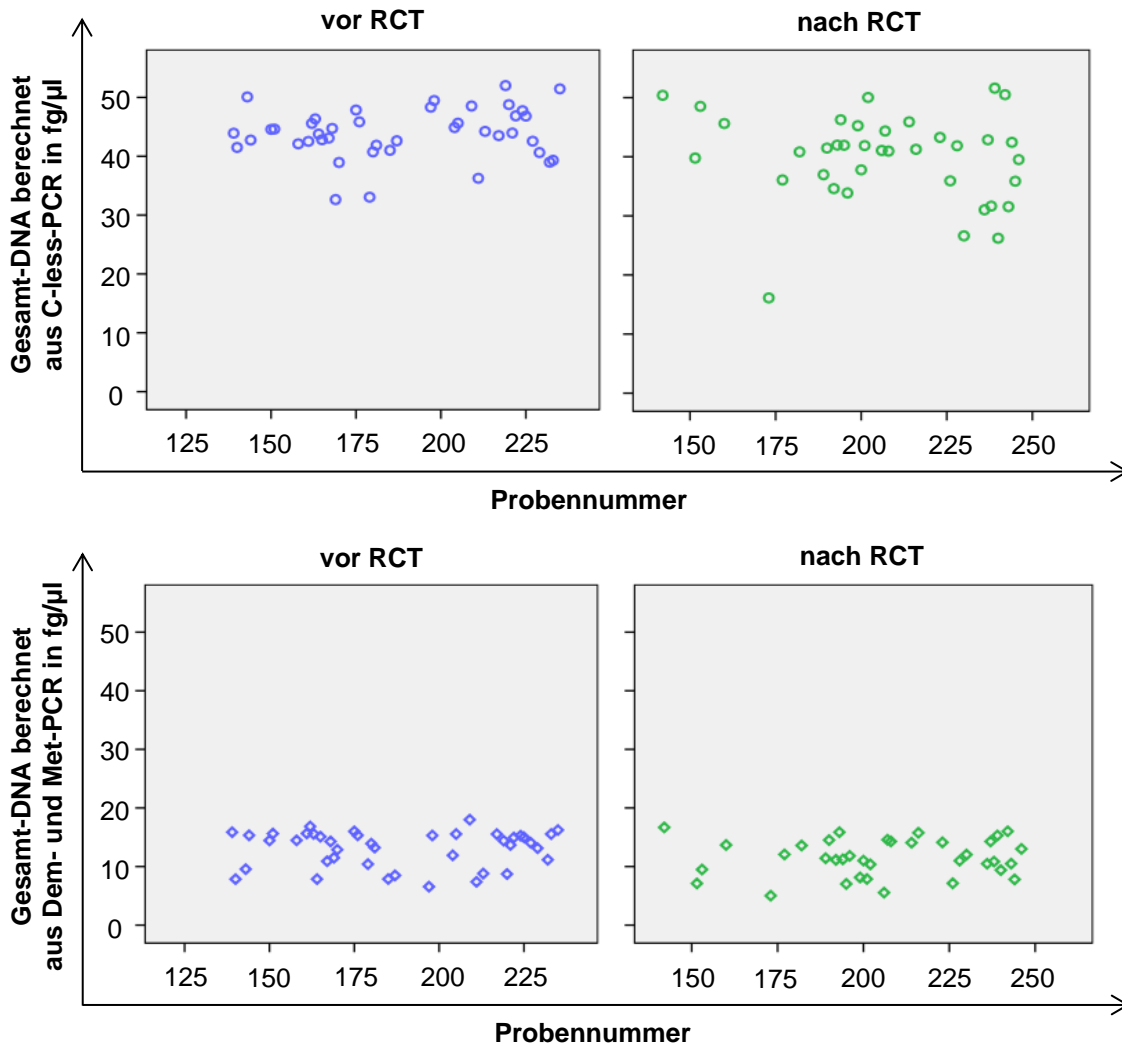


Abbildung 20: Streudiagramm der detektierten Gesamt-DNA der Proben vor und nach RCT

Im Durchschnitt lag die detektierte Gesamt-DNA bei 43,88 fg/µl (Dem- und Met-PCR) bzw. 13,10 fg/µl (C-less-PCR) für 42 Proben vor RCT und bei 39,83 fg/µl (Dem- und Met-PCR) bzw. 11,51 fg/µl (C-less-PCR) für 37 bzw. 36 Proben nach RCT.

Die weite Streuung der $Treg_{PCR}$ -Anteile vor und nach RCT, berechnet über die Dem-C-less-Formel, basiert auf dem wesentlich geringeren Anteil an detektierter Gesamt-DNA in der C-less-PCR. Dadurch hatten Abweichungen bei der Gesamt-DNA-Detektion stärkere Auswirkungen auf die Berechnung des Treg-Anteils, obwohl die über die C-less-PCR detektierte Gesamt-DNA mit 6,94 – 19,26 fg/µl für Proben vor RCT und 5,23 – 17,78 fg/µl für Proben nach RCT im Vergleich zur gemeinsam über die Dem- und Met-PCR detektierten Gesamt-DNA mit 35,34 – 52,41 fg/µl für Proben vor RCT und 24,87 – 54,79 fg/µl für Proben nach RCT weniger streute.

In den weiteren Betrachtungen wurden die Ergebnisse der Dem-Met-Formel für die epigenetisch quantifizierten Treg-Anteile verwendet, da hier die Gesamt-DNA einen geringen Einfluss auf die Berechnung des Treg_{PCR}-Anteils hatte. Treg_{PCR} bezieht sich damit in den nachfolgenden Abschnitten ausschließlich auf die epigenetisch quantifizierten Treg-Anteile aus der Dem-Met-Formel.

3.3.3 Vergleich der phänotypisch und epigenetisch quantifizierten Treg-Anteile

Die phänotypisch als CD3⁺CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Zellen charakterisierten Tregs wiesen einen durchschnittlichen Treg_{Flow}-Anteil von 1,6 % (\pm 0,84 %) vor RCT und 4,1 % (\pm 2,32 %) nach RCT, bezogen auf die lebenden CD3⁺CD4⁺ Zellen, auf. Die epigenetisch quantifizierten Treg-Anteile vor und nach RCT aus dem vorangegangenen Abschnitt unterschieden sich für die Treg_{PCR}-Anteile nach RCT signifikant von den Treg_{Flow}-Anteilen nach RCT (Wilcoxon-Test; $P < 0,001$ für 33 Patientinnen). Es zeigte sich eine signifikante, moderate, positiv monotone Korrelation zwischen den phänotypisch und epigenetisch quantifizierten Treg-Anteilen vor RCT (Spearman-Korrelation; $\rho = 0,506$; $P = 0,001$ für 39 Patientinnen). Hingegen gab es nur eine schwache, positiv monotone, aber signifikante Korrelation zwischen den phänotypisch und epigenetisch quantifizierten Treg-Anteilen nach RCT (Spearman-Korrelation; $\rho = 0,421$; $P = 0,015$ für 33 Patientinnen) (Abbildung 21).

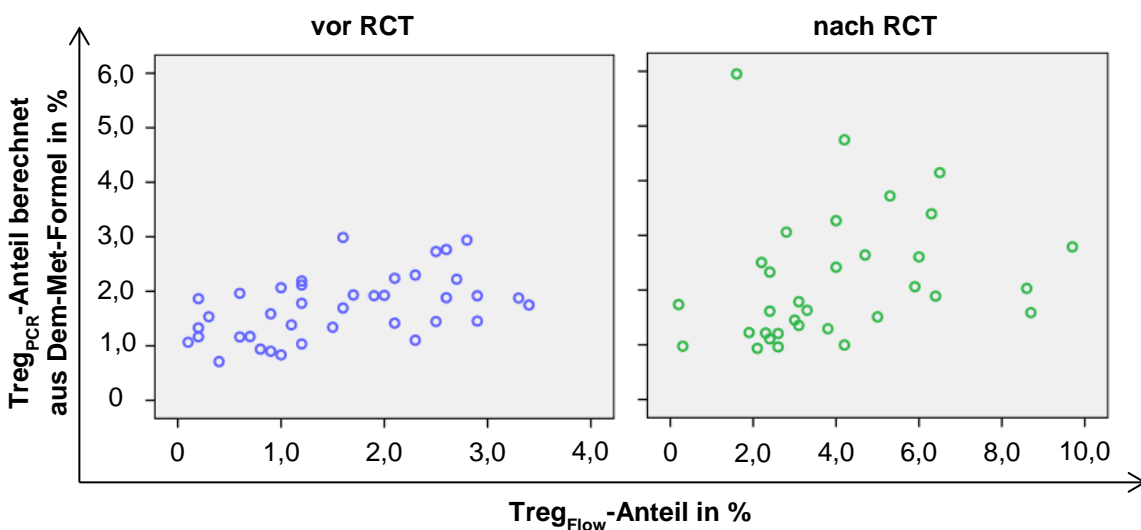


Abbildung 21: Streudiagramm der Treg_{Flow}- und Treg_{PCR}-Anteile vor bzw. nach RCT

3.4 Phänotypisch quantifizierte Tregs aus PBMCs

3.4.1 Übersicht der phänotypisch quantifizierten Treg-Anteile

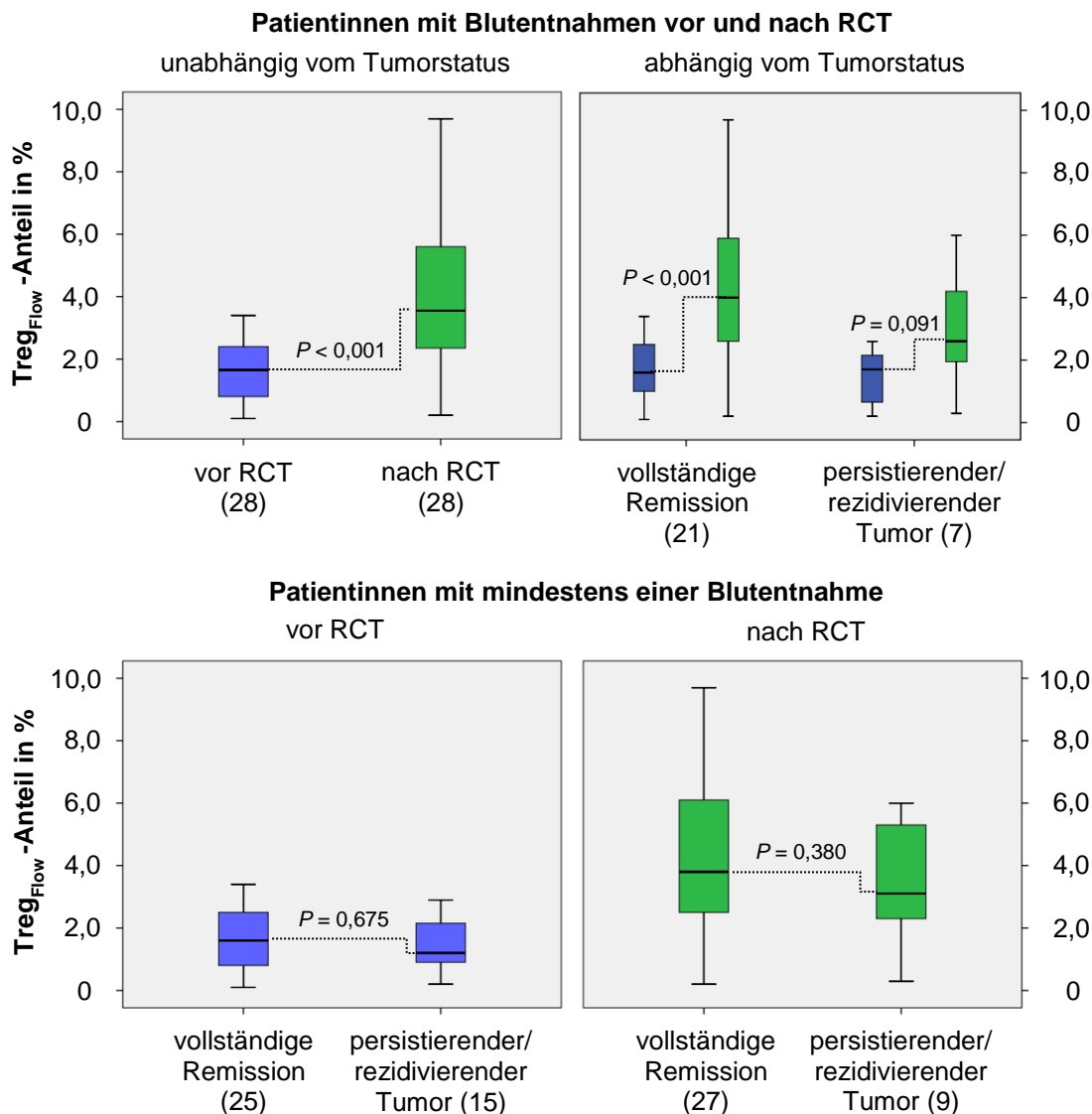


Abbildung 22: Übersicht der Treg_{Flow}-Anteile

In den Diagrammen sind das Signifikanzniveau und in Klammern die Patientenzahl der einzelnen Untergruppen angegeben.

Abhängig und unabhängig vom Blutentnahmezeitpunkt nach RCT waren für Patientinnen mit vollständiger Remission die Treg_{Flow}-Anteile vor RCT signifikant niedriger als nach RCT. Für Patientinnen mit persistierendem bzw. rezidivierendem Tumor nach RCT, bei denen innerhalb von 6 Monaten nach RCT Blut entnommen wurde, waren die Treg_{Flow}-Anteile nur mäßig signifikant niedriger als vor RCT. Hingegen zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei der Betrachtung unabhängig vom Blutentnahmezeitpunkt nach RCT für Patientinnen mit persistierendem bzw. rezidivierendem Tumor. Da im vor-

liegenden Patientenkollektiv Patientinnen mit vollständiger Remission überwiegen, trägt dieses zum statistisch signifikanten Unterschied der Treg_{Flow}-Anteile vor und nach RCT der gesamten Kohorte bei. Es zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Treg_{Flow}-Anteilen vor bzw. nach RCT der Patientinnen mit vollständiger Remission und persistierendem bzw. rezidivierendem Tumor nach RCT (Abbildung 22).

3.4.2 Tregs als Indikator für das prätherapeutische Tumorstadium

Abbildung 23 zeigt die Treg_{Flow}-Anteile vor RCT abhängig von verschiedenen klinischen Prognosefaktoren. Keinen signifikanten Unterschied gab es zwischen den Treg_{Flow}-Anteilen vor RCT abhängig vom FIGO-Stadium oder histologischen Grading des Tumors (Kruskal-Wallis-Test, $P(\text{FIGO}) = 0,728$; $P(\text{Grading}) = 0,971$). Hingegen zeigten die Treg_{Flow}-Anteile vor RCT einen signifikanten Zusammenhang mit dem histologischen Tumortyp und dem regionären Lymphknoten- und Fernmetastasenstatus (Kruskal-Wallis-Test; $P(\text{Tumortyp}) = 0,012$; $P(\text{NM-Status}) = 0,042$). Dabei unterschieden sich die Treg_{Flow}-Anteile vor RCT der Patientinnen mit seltenen Karzinomen signifikant von den Patientinnen mit Plattenepithel- oder Adenokarzinomen (Mann-Whitney-U-Test; $P(\text{seltene Karzinome; Plattenepithelkarzinom}) = 0,010$; $P(\text{seltene Karzinome; Adenokarzinom}) = 0,014$). Zwischen den Treg_{Flow}-Anteilen vor RCT der Patientinnen mit Plattenepithel- und Adenokarzinomen gab es wiederum keinen signifikanten Unterschied (Mann-Whitney-U-Test; $P(\text{Plattenepithelkarzinom; Adenokarzinom}) = 0,184$). Außerdem unterschieden sich die Treg_{Flow}-Anteile vor RCT der Patientinnen ohne regionäre Lymphknoten- oder Fernmetastasen signifikant von denen mit Fernmetastasen. Patientinnen mit regionären Lymphknotenmetastasen und ohne Fernmetastasen unterschieden sich weder signifikant von Patientinnen ohne regionäre Lymphknoten- oder Fernmetastasen noch von denen mit Fernmetastasen (Mann-Whitney-U-Test; $P(\text{N0M0; M1}) = 0,010$; $P(\text{N0M0; N1M0}) = 0,191$; $P(\text{N1M0; M1}) = 0,195$).

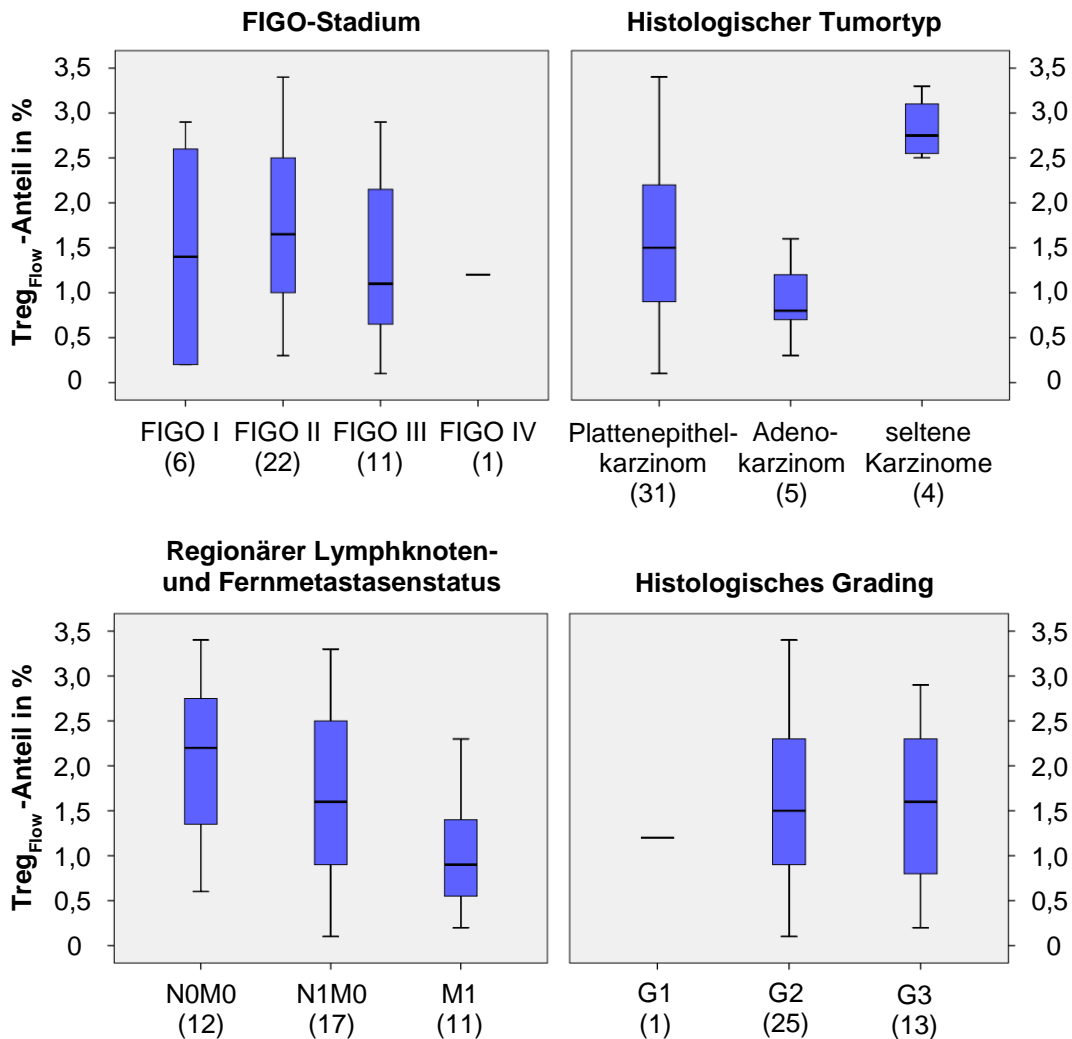


Abbildung 23: Treg_{Flow}-Anteile vor RCT abhängig von verschiedenen Prognosefaktoren

Für eine Patientin war die Tumordifferenzierung nicht bekannt, sie ist im Diagramm nicht aufgeführt. In Klammern ist die Patientenanzahl der einzelnen Untergruppen angegeben.

Zur Evaluation des prognostischen Werts der Treg_{Flow}-Anteile vor RCT als Indikator für das Vorliegen von Fernmetastasen wurde eine empirische ROC-Kurve erstellt (Abbildung 24). Mit einer AUC von 0,718 als Maß für die Testgüte haben die Treg_{Flow}-Anteile vor RCT einen mäßigen diagnostischen Wert zur Detektion von Patientinnen mit Fernmetastasen (95%-KI: 0,555 - 0,881; $P = 0,035$). Unter der Bedingung einer möglichst geringen Anzahl an falsch negativen Testergebnissen könnte der Grenzwert für die Treg_{Flow}-Anteile vor RCT anhand einer Mindestsensitivität von $\geq 90\%$ festgelegt werden. Beispielsweise werden 91 % aller Patientinnen mit Fernmetastasen bei einem Grenzwert des Treg_{Flow}-Anteils $\leq 2,20\%$ detektiert. Es wird jedoch ein hoher Anteil an falsch positiven Testergebnissen toleriert (Spezifität von 37,9 %).

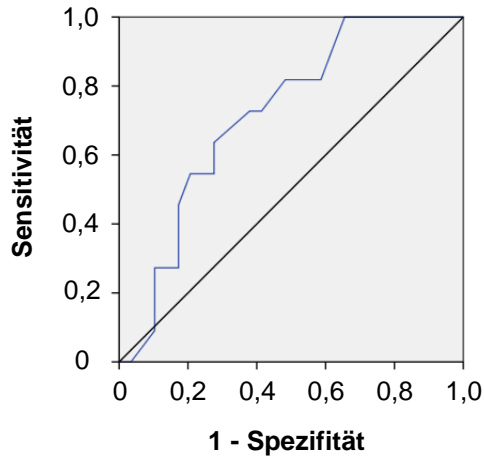


Abbildung 24: Empirische ROC-Kurve der Treg_{Flow}-Anteile vor RCT

Die ROC-Kurve wurde aus den Treg_{Flow}-Anteilen vor RCT von 29 Patientinnen ohne Fernmetastasen und 11 Patientinnen mit Fernmetastasen erstellt.

3.4.3 Tregs als Prognosefaktor für das erkrankungsfreie Überleben

Klinische Daten zum erkrankungsfreien Überleben der Patientinnen sind Abschnitt 3.2.3.1 zu entnehmen. Die Treg_{Flow}-Anteile vor als auch nach RCT zeigten keinen signifikanten Einfluss auf das erkrankungsfreie Überleben (Abbildung 25).

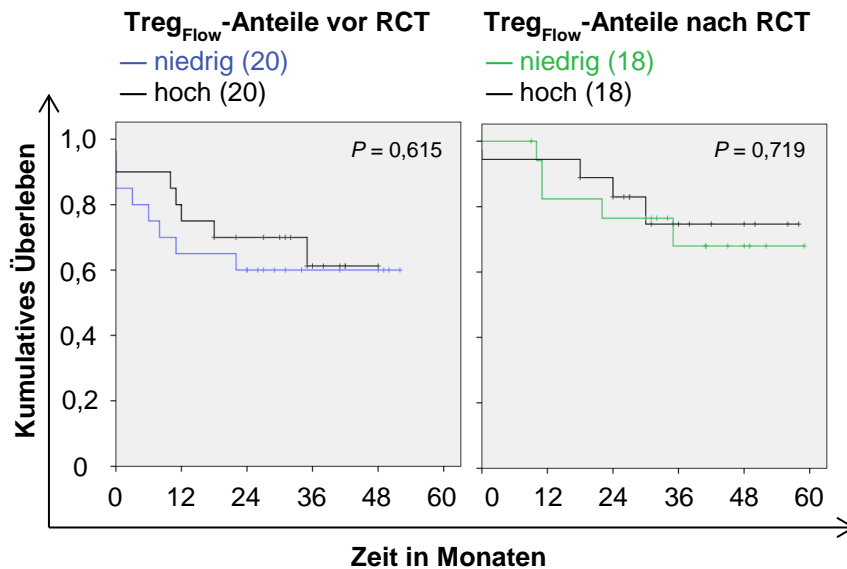


Abbildung 25: Kaplan-Meier-Kurven des erkrankungsfreien Überlebens abhängig von den Treg_{Flow}-Anteilen

In den Diagrammen sind das Signifikanzniveau und in Klammern die Patientenzahl der einzelnen Untergruppen angegeben. Senkrechte Striche in den Kurven kennzeichnen zensierte Daten.

3.4.4 Tregs als Prognosefaktor für das Gesamtüberleben

Klinische Daten zum Gesamtüberleben der Patientinnen sind bereits im Abschnitt 3.2.3.2 aufgeführt. Die Treg_{Flow}-Anteile vor als auch nach RCT zeigten keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben (Abbildung 26).

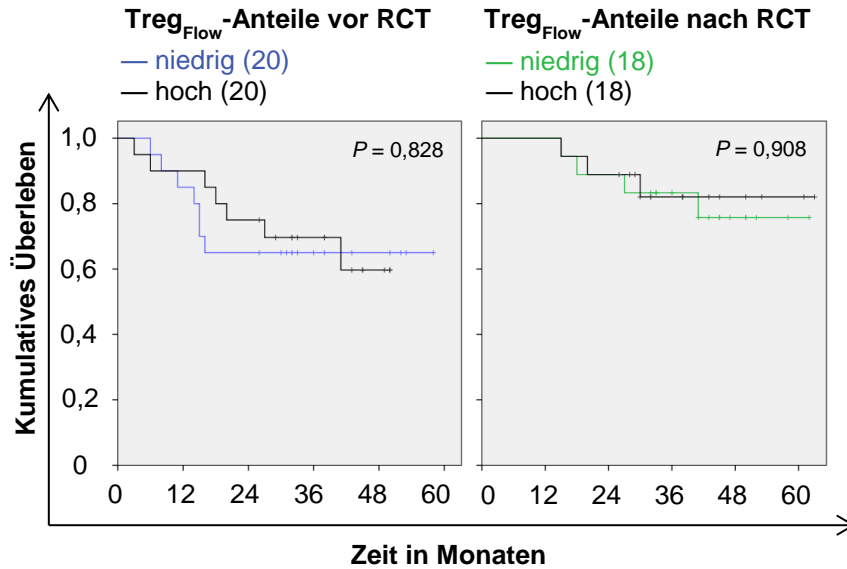


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens abhängig von den Treg_{Flow}-Anteilen

In den Diagrammen sind das Signifikanzniveau und in Klammern die Patientenzahl der einzelnen Untergruppen angegeben. Senkrechte Striche in den Kurven kennzeichnen zensierte Daten.

3.5 Epigenetisch quantifizierte Tregs aus PBMCs

3.5.1 Übersicht der epigenetisch quantifizierten Treg-Anteile

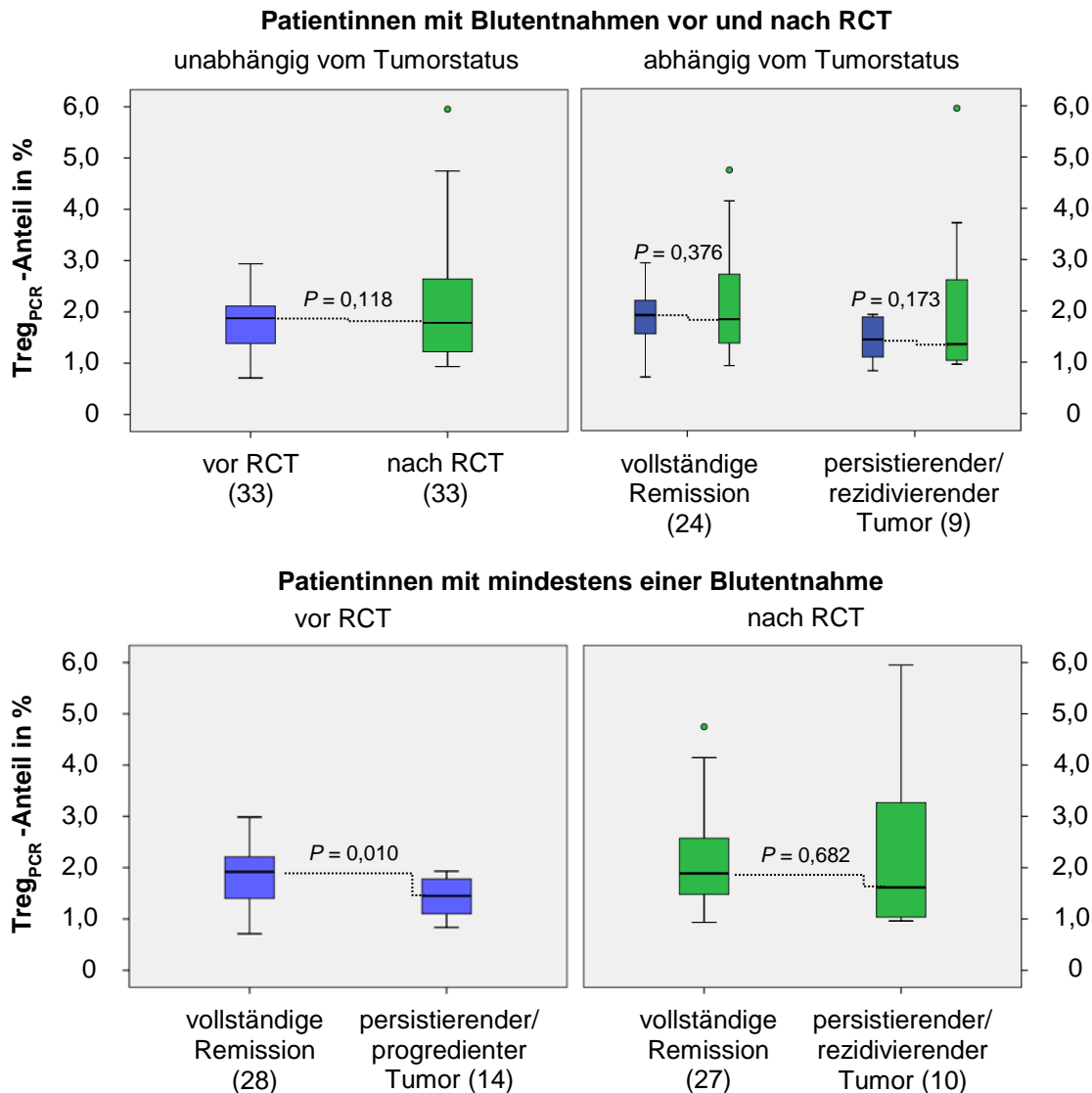


Abbildung 27: Übersicht der Treg_{PCR}-Anteile

In den Diagrammen sind das Signifikanzniveau und in Klammern die Patientenzahl der einzelnen Untergruppen angegeben.

Es zeigte sich weder abhängig vom Tumorstatus der Patientinnen oder Blutentnahmezeitpunkt nach RCT noch unabhängig davon ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Treg_{PCR}-Anteilen vor und nach RCT. Patientinnen mit vollständiger Remission hatten aber signifikant höhere Treg_{PCR}-Anteile vor RCT im Vergleich zu Patientinnen mit persistierendem bzw. rezidivierendem Tumor. Dagegen zeigte sich für die Treg_{PCR}-Anteile nach RCT sowohl abhängig als auch unabhängig vom Zeitpunkt der

Blutentnahme kein signifikanter Unterschied zwischen Patientinnen mit vollständiger Remission und persistierendem bzw. rezidivierendem Tumor nach RCT (Abbildung 27).

3.5.2 Tregs als Indikator für das prätherapeutische Tumorstadium

Abbildung 28 zeigt die Treg_{PCR}-Anteile vor RCT abhängig von verschiedenen klinischen Prognosefaktoren. Es zeigte sich eine nicht signifikante Abnahme der Treg_{PCR}-Anteile vor RCT mit steigendem FIGO-Stadium (Kruskal-Wallis-Test; $P = 0,082$). Zwischen den Treg_{PCR}-Anteilen vor RCT bestand abhängig vom histologischen Tumortyp oder histologischen Grading des Tumors kein signifikanter Unterschied (Kruskal-Wallis-Test; $P(\text{Tumortyp}) = 0,902$; $P(\text{Grading}) = 0,469$). Hingegen zeigten die Treg_{PCR}-Anteile vor RCT einen signifikanten Zusammenhang mit dem regionären Lymphknoten- und Fernmetastasenstatus (Kruskal-Wallis-Test; $P(\text{NM-Status}) = 0,003$). Dabei unterschieden sich die Treg_{PCR}-Anteile vor RCT der Patientinnen ohne Fernmetastasen unabhängig von ihrem regionären Lymphknotenstatus signifikant von solchen mit Fernmetastasen. Bei den Patientinnen ohne Fernmetastasen und unterschiedlichem Lymphknotenstatus unterschieden sich die Treg_{PCR}-Anteile vor RCT nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test; $P(\text{N0M0}; \text{M1}) = 0,003$; $P(\text{N1M0}; \text{M1}) = 0,002$; $P(\text{N0M0}; \text{N1M0}) = 0,873$) (Abbildung 28).

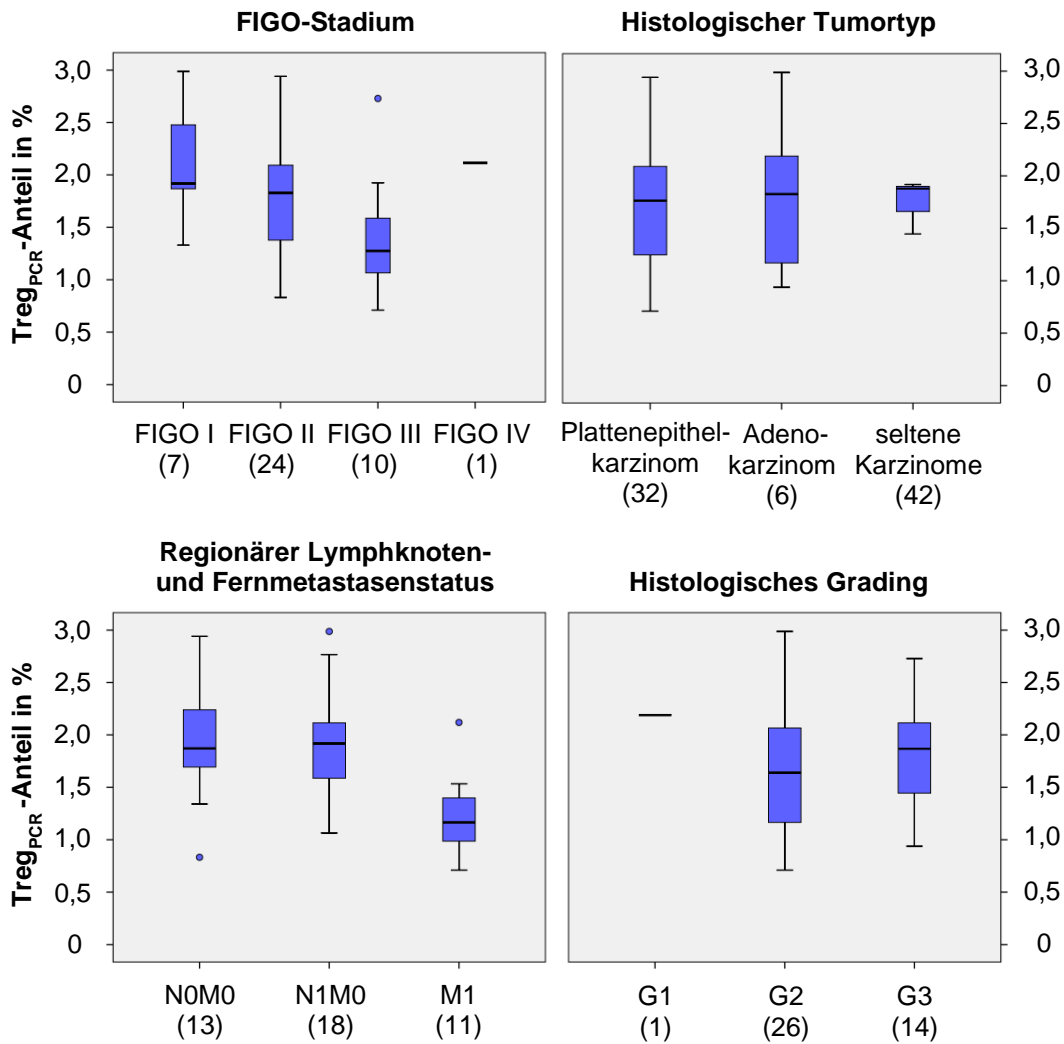


Abbildung 28: Treg_{PCR}-Anteile abhängig von verschiedenen Prognosefaktoren

Für eine Patientin war die Tumordifferenzierung nicht bekannt, sie ist im Diagramm nicht aufgeführt. In Klammern ist die Patientenanzahl der einzelnen Untergruppen angegeben.

Zur Evaluation des prognostischen Werts der Treg_{PCR}-Anteile vor RCT als Indikator für das Vorliegen von Fernmetastasen wurde eine empirische ROC-Kurve erstellt (Abbildung 29). Mit einer AUC von 0,853 als Maß für die Testgüte haben die Treg_{PCR}-Anteile einen hohen diagnostischen Wert zur Detektion von Patientinnen mit Fernmetastasen (95%-KI: 0,718 - 0,989; $P = 0,001$). Unter der Bedingung einer möglichst geringen Anzahl an falsch negativen Ergebnissen könnte der Grenzwert für die Treg_{PCR}-Anteile vor RCT anhand einer Mindestsensitivität von $\geq 90\%$ festgelegt werden. Beispielsweise werden 91 % aller Patientinnen mit Fernmetastasen bei einem Grenzwert des Treg_{PCR}-Anteils $\leq 1,56\%$ detektiert und nur ein kleiner Anteil an falsch-positiven Testergebnissen toleriert (Spezifität von 77 %).

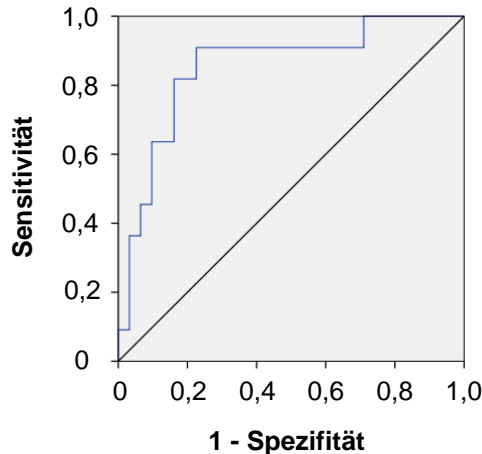


Abbildung 29: Empirische ROC-Kurve der Treg_{PCR}-Anteile vor RCT

Die ROC-Kurve wurde aus den Treg_{PCR}-Anteilen von 31 Patientinnen ohne Fernmetastasen und 11 Patientinnen mit Fernmetastasen erstellt.

3.5.3 Tregs als Prognosefaktor für das erkrankungsfreie Überleben

Analog zu Abschnitt 3.4.3 erfolgte die Untersuchung eines Einflusses der epigenetisch quantifizierten Treg-Anteile auf das erkrankungsfreie Überleben. Patientinnen mit einem hohen Treg_{PCR}-Anteil vor RCT blieben signifikant länger erkrankungsfrei als solche mit einem niedrigen Treg_{PCR}-Anteil vor RCT. Der Treg_{PCR}-Anteil nach RCT hatte dagegen keinen signifikanten Einfluss auf das erkrankungsfreie Überleben (Abbildung 30).

Zur weiteren Betrachtung wurden das FIGO- und das Fernmetastasenstadium (vgl. Abschnitt 3.2.3.1) sowie der Treg_{PCR}-Anteil vor RCT einer multivariaten Cox-Regression unterzogen. In die multivariate Cox-Regression konnten 42 der 49 Patientinnen mit vollständigem Datensatz eingeschlossen werden, darunter 14 Patientinnen mit einem persistierenden oder wiederaufgetretenen Tumor. Sowohl über die schrittweise bedingte Vorwärts- als auch Rückwärtsselektion wurde nur der Treg_{PCR}-Anteil vor RCT in das Cox-Regressionsmodell aufgenommen. Damit ist der Treg_{PCR}-Anteil vor RCT ein unabhängiger Prognosefaktor mit signifikantem Einfluss auf das erkrankungsfreie Überleben. Das Risiko (Hazard) einer Patientin an einem persistierenden oder rezidivierenden Tumor nach RCT zu erkranken sinkt pro Prozentpunkt des Treg_{PCR}-Anteils um den Faktor 0,3 (multivariate Cox-Regression; $P = 0,009$; 95%-KI: 0,089 - 0,736).

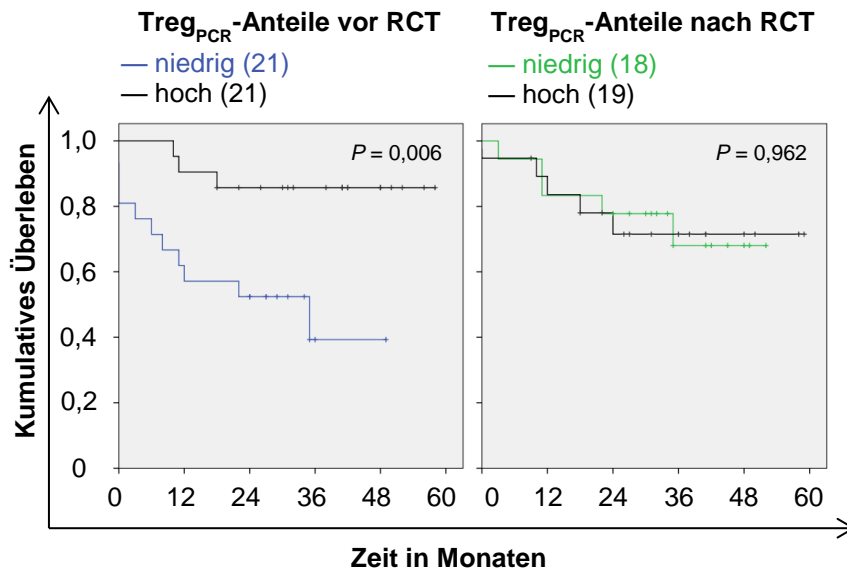


Abbildung 30: Kaplan-Meier-Kurven des erkrankungsfreien Überlebens abhängig von den $Treg_{PCR}$ -Anteilen

In den Diagrammen sind das Signifikanzniveau und in Klammern die Patientenzahl der einzelnen Untergruppen angegeben. Senkrechte Striche in den Kurven kennzeichnen zensierte Daten.

3.5.4 Tregs als Prognosefaktor für das Gesamtüberleben

Analog zu Abschnitt 3.4.4 erfolgte die Untersuchung eines Einflusses der epigenetisch quantifizierten Treg-Anteile auf das Gesamtüberleben. Patientinnen mit einem hohen $Treg_{PCR}$ -Anteil vor RCT lebten signifikant länger als solche mit einem niedrigen $Treg_{PCR}$ -Anteil vor RCT. Der $Treg_{PCR}$ -Anteil nach RCT hatte hingegen keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben (Abbildung 31).

Zur weiteren Bewertung wurden das FIGO-Stadium (vgl. Abschnitt 3.2.3.2) und der $Treg_{PCR}$ -Anteil vor RCT einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse unterzogen. In die multivariate Cox-Regression konnten 42 der 49 Patientinnen mit vollständigem Datensatz eingeschlossen werden, darunter 13 Patientinnen mit einem tumorassoziierten Tod. Nach der schrittweise bedingten Vorwärts- als auch Rückwärtsselektion wurde nur der $Treg_{PCR}$ -Anteil vor RCT in das Cox-Regressions-Modell aufgenommen. Damit ist der $Treg_{PCR}$ -Anteil vor RCT ein unabhängiger Prognosefaktor mit signifikantem Einfluss auf das Gesamtüberleben beim Zervixkarzinom. Das Risiko (Hazard) einer Patientin an ihrem Tumor zu versterben sinkt pro Prozentpunkt des $Treg_{PCR}$ -Anteils vor RCT um den Faktor 0,2 (multivariate Cox-Regression; $P = 0,007$; 95%-KI: 0,073 - 0,684).

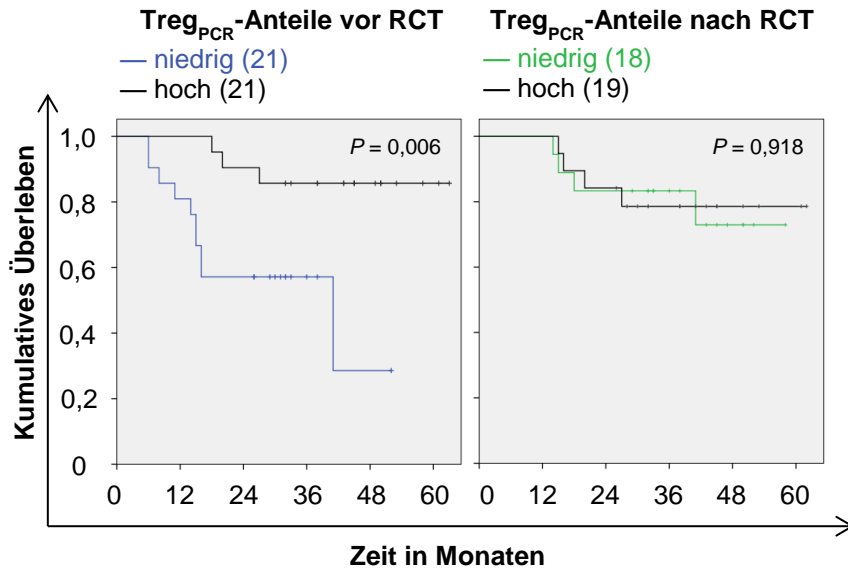


Abbildung 31: Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtüberlebens abhängig von den $Treg_{PCR}$ -Anteilen

In den Diagrammen sind das Signifikanzniveau und in Klammern die Patientenanzahl der einzelnen Untergruppen angegeben. Senkrechte Striche in den Kurven kennzeichnen zensierte Daten.

3.6 Vergleich der statistischen Ergebnisse der phänotypisch und epigenetisch quantifizierten Treg-Anteile

Abhängig von der Art der Quantifizierung der Treg-Anteile zeigten sich statistisch abweichende Ergebnisse und ein anderer Verlauf der Treg-Anteile vor und nach RCT. Nur bei der kombinierten Analyse des regionären Lymphknoten- und Fernmetastasenstatus mit den $Treg_{Flow}$ - bzw. $Treg_{PCR}$ -Anteilen vor RCT zeigte sich jeweils ein signifikanter Zusammenhang. Die $Treg_{Flow}$ -Anteile vor RCT unterschieden sich zudem abhängig vom histologischen Tumortyp. Die $Treg_{PCR}$ -Anteile vor RCT dagegen nahmen mit steigendem FIGO-Stadium nicht signifikant ab, unterschieden sich signifikant zwischen Patientinnen mit vollständiger Remission und solchen mit persistierendem bzw. rezidivierendem Tumor nach RCT und sind ein unabhängiger Prognosefaktor mit signifikantem Einfluss auf das erkrankungsfreie Überleben und Gesamtüberleben beim Zervixkarzinom (Tabelle 12).

Tabelle 12: Statistische Ergebnisse der Treg_{Flow}/PCR-Anteile vor bzw. nach RCT

	Signifikanzniveau (** → $P < 0,05$; * → $P < 0,10$; – → $P \geq 0,10$)			
	Treg-Anteile vor RCT		Treg-Anteile nach RCT	
	Treg _{Flow}	Treg _{PCR}	Treg _{Flow}	Treg _{PCR}
FIGO-Stadium	–	*		
Regionärer Lymphknoten- und Fernmetastasenstatus	**	**		
Histologischer Tumortyp	**	–		
Histologisches Grading	–	–		
Tumorstatus nach RCT (vollständige Remission vs. persistierender/rezidivierender Tumor)	–	**	–	–
Erkrankungsfreies Überleben	–	**	–	–
Gesamtüberleben	–	**	–	–

Auch der Verlauf der Treg-Anteile vor und nach RCT unterschied sich abhängig von der Art der Quantifizierung. Unabhängig und abhängig vom Tumorstatus der Patientinnen nach RCT war der Treg_{Flow}-Anteil nach RCT höher als vor RCT, wobei dieser Unterschied nur für Patientinnen mit persistierendem bzw. rezidivierendem Tumor nicht signifikant war. Hingegen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Treg_{PCR}-Anteilen vor und nach RCT (Tabelle 13).

Tabelle 13: Statistische Ergebnisse zum Verlauf der Treg_{Flow}/PCR-Anteile vor und nach RCT

	Signifikanzniveau (** → $P < 0,05$; * → $P < 0,10$; – → $P \geq 0,10$)			
	Treg _{Flow} -Anteile		Treg _{PCR} -Anteile	
	vor RCT	nach RCT	vor RCT	nach RCT
Unabhängig vom Tumorstatus	**		–	
Abhängig vom Tumorstatus				
• vollständige Remission	**		–	
• persistierender/rezidivierender Tumor	*		–	

4 DISKUSSION

4.1 Unterschiede der phänotypisch und epigenetisch quantifizierten Treg-Anteile

Die Angaben über den bisher ausschließlich phänotypisch bestimmten, durchschnittlichen Anteil an im Blut zirkulierenden Tregs von Zervixkarzinompatientinnen schwanken zwischen 0,83 % und 6,8 % für Patientinnen im FIGO-Stadium IA - IIB vor einer Therapie [105, 106, 116] und liegen damit zum Teil deutlich über dem in dieser Studie bestimmten durchschnittlichen Wert von 1,6 % (Treg_{Flow}-Anteil) vor RCT für Patientinnen im FIGO-Stadium I - IV. Unabhängig von möglichen Unterschieden in den Patientenkollektiven führt das Fehlen eines Treg-spezifischen Markers und einer einheitlichen Markerkombination zu einer eingeschränkten Vergleichbarkeit der relativen Anteile an phänotypisch quantifizierten Tregs in unterschiedlichen Studien [82, 117, 118]. Über uneinheitliche Markerkombinationen werden verschiedene Treg-(Sub-)Populationen bestimmt, deren Grad an Unterscheidung überwiegend unbekannt ist [82, 118]. Hinzu kommen Interassay-Abweichungen durch nicht eindeutige, zum Teil willkürliche Festlegungen von Populationsgrenzen, beispielsweise bei der Abgrenzung von CD25^{high} oder CD127^{-low} Zellen [118, 119], oder durch unterschiedliche Strategien zur Festlegung der Populationsgrenzen [82, 120].

In der vorliegenden Arbeit wurden phänotypisch quantifizierte Tregs über den CD3⁺CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg-Phänotyp nachgewiesen. In vergleichbaren Studien wurde dagegen auf den Oberflächenmarker CD3 verzichtet. Die höchsten relativen Treg-Anteile wurden in solchen Studien ermittelt, in denen die Populationsgrenzen mittels Isotypenkontrollen definiert wurden [105, 106]. Isotypenkontrollen stellen als Negativkontrolle das Ausmaß an unspezifischen Bindungen der Antikörper dar und können zu einer Verfälschung der Ergebnisse durch Überschätzung oder Unterschätzung führen [120, 121]. Das Verwenden von Negativ-Populationen, wie beispielsweise von CD3⁺CD4⁻ Zellen oder CD3⁻CD4⁻ Zellen, welche kein FOXP3 exprimieren, wird hingegen als sehr zuverlässige Methode zur Festlegung von Zellpopulationsgrenzen angesehen [120]. Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit benutzt und zusätzlich um FMO-Kontrollen [110] erweitert, um Populationsgrenzen objektiv festlegen zu können. Eine ähnliche Methode verwendeten Heusinkveld et al. mittels FOXP3-negativen

und -positiven Klonen [116], welche den niedrigsten Treg-Anteil unter allen vergleichbaren Studien ermittelten.

Im Gegensatz zur phänotypischen Quantifizierung der Tregs gilt die epigenetische Quantifizierung über den Nachweis der Treg-spezifische Demethylierung des FOXP3i1 als hochspezifische und verlässlichere Methode mit einer besseren Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Studien, sogar unter immunsupprimierender oder -stimulierender Therapie [95, 100, 102]. In der vorliegenden Arbeit wurde das erste Mal der im Blut zirkulierende Treg-Anteil von Zervixkarzinompatientinnen über eine methylierungsspezifische Analyse quantifiziert und mit den Ergebnissen aus der phänotypischen Quantifizierung verglichen.

Zwischen den Anteilen der phänotypisch als $CD3^+CD4^+CD25^+FOXP3^+$ definierten Tregs_{Flow} und der epigenetisch über den Nachweis von demethyliertem FOXP3i1 definierten Tregs_{PCR} bestand eine signifikante, positiv monotone Korrelation von moderater bis geringer Stärke für die Werte vor bzw. nach RCT. Nettenstrom et al. wiesen eine stärkere Korrelation zwischen Anteilen phänotypisch als $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{-/low}$ quantifizierter Tregs und epigenetisch quantifizierter Tregs nach. Sowohl die Stärke der Korrelation als auch das Signifikanzniveau nahmen jedoch durch das Hinzufügen des Markers FOXP3 oder Ersetzen des Markers CD127 durch FOXP3 ab [117]. Demzufolge unterscheiden sich die $CD3^+CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Zellen von den $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{-/low}$ Zellen. Bereits Klein et al. zeigten, dass diese beiden Treg-Phänotypen nicht dieselbe Zellpopulation repräsentieren, aber eine gleiche Anzahl an Tregs anfärben [118]. Laut Nettenstrom et al. werden Tregs exakter durch den $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{-/low}$ Phänotyp abgebildet, da sie am stärksten mit der Demethylierung des FOXP3i1 korrelieren (Pearson-Korrelation; $\rho = 0,72$; $P = 0,0009$) [117]. Die in dieser Arbeit phänotypisch und epigenetisch quantifizierten Tregs sind damit sich überschneidende Zellpopulationen, repräsentieren aber nicht exakt dieselbe Zellpopulation, was die nur moderate bis geringe Korrelation der unterschiedlich quantifizierten Treg-Anteile vor und nach RCT erklären kann.

Der Unterschied zwischen den phänotypisch und epigenetisch quantifizierten Tregs basiert auf der Heterogenität der Tregs und der fehlenden Spezifität der phänotypischen Treg-Marker (vgl. Abschnitte 1.2.1 und 1.2.2). So kann FOXP3 von konventionellen

T-Zellen exprimiert werden und wiederum von Tregs herunterreguliert werden. Die Treg-spezifische Demethylierung des FOXP3i1 bleibt hingegen auch bei sich ändernder Umgebung unabhängig von der FOXP3-Expression erhalten [122]. Sogenannte latente Tregs haben ihren spezifischen Phänotyp partiell verloren, besitzen aber weiterhin die Treg-spezifische Demethylierung des FOXP3i1. Miyao et al. wiesen in Mäusen latente FOXP3⁻ Tregs nach, welche unter Aktivierung erneut FOXP3 exprimierten [122]. Tatura et al. entdeckten latente humane Tregs in CD4⁺ Zellpopulationen mit geringer oder sogar fehlender CD25-Expression [102]. Nettenstrom et al. sahen dagegen eine nicht ausreichende Sensitivität der durchflusszytometrischen Detektion von FOXP3 als mögliche Ursache für eine schlechtere Korrelation zwischen den FOXP3-enthaltenden Treg-Phänotypen und der Demethylierung des FOXP3i1.

Dass die phänotypisch und epigenetisch charakterisierten Tregs nicht exakt dieselbe Zellpopulation repräsentieren, erklärt die zum Teil abweichenden Ergebnisse der statistischen Analysen zwischen den unterschiedlich quantifizierten Treg-Anteilen. Auch der unterschiedliche Verlauf der Treg-Anteile vor und nach RCT abhängig von der Art der Quantifizierung kann darauf zurückgeführt werden (vgl. Abschnitt 3.6).

Limitiert wird die Aussagekraft der Ergebnisse für die Treg-Anteile nach RCT durch die sehr variablen Blutentnahmezeitpunkte, die zwischen der Abnahme direkt am letzten Tag der RCT und 76 Wochen nach Abschluss der RCT lagen. Der variable Blutentnahmezeitpunkt nach RCT scheint auch Einfluss auf die Korrelation der unterschiedlich quantifizierten Treg-Anteile nach RCT zu haben. So gab es keine signifikante Korrelation zwischen den Treg_{Flow}- und Treg_{PCR}-Anteilen nach RCT von Proben mit Blutentnahme unter einem halben Jahr nach Abschluss der RCT (Spearman-Rho; $\rho = 0,270$; $P = 0,236$). Es bestand aber eine signifikante, starke, positiv monotone Korrelation zwischen den unterschiedlich quantifizierten Treg-Anteilen nach RCT für Proben mit Blutentnahme über einem halben Jahr nach Abschluss der RCT (Spearman-Rho; $\rho = 0,720$; $P = 0,008$). Unabhängig von der starken Korrelation der Treg-Anteile nach RCT für Proben mit Blutentnahme über einem halben Jahr nach Abschluss der RCT blieb der unterschiedliche Verlauf der Treg-Anteile vor und nach RCT abhängig von der Art der Quantifizierung bestehen. (Diese Ergebnisse sind in der vorliegenden Arbeit nicht aufgeführt.) Die schlechtere Korrelation der unterschiedlich quantifizierten Treg-Anteile nach RCT, insbesondere für Proben mit Blutentnahmen innerhalb des ersten

Halbjahres nach RCT, könnte auf dem unterschiedlich starken Einfluss der Therapie abhängig vom Zeitpunkt der Blutentnahme nach RCT und dem damit zusammenhängenden Immunstatus der Patientinnen basieren. Dabei könnten therapieabhängig Zell-(Sub-)Populationen mit bestimmten Oberflächenmarkern und damit bestimmte Phänotypen, darunter auch Treg-Subtypen, selektiv hoch- oder runterreguliert werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten Tatura et al., die ebenfalls nur eine geringe Korrelation bei Sepsispatienten in unterschiedlichen Krankheitsphasen zeigten [102], sowie Brandhorst et al., die keine Korrelation bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mit unterschiedlichem Aktivitätszustand und unter unterschiedlicher Immuntherapie zeigten [103]. Cao et al. beschrieben eine Veränderung des Treg-Phänotyps durch Gamma-Strahlen, die unter anderem zu einer abnehmenden Expression von FOXP3 führt [123]. Gleichsam kann ein unterschiedlicher Immunstatus der Patientinnen vor Therapie die Korrelation der Treg-Anteile vor RCT negativ beeinflusst und den Unterschied zwischen den Zellpopulationen vergrößert haben.

Letztlich unterscheiden sich die phänotypisch und epigenetisch definierten Treg-Anteile auch in Größe und Art ihrer Bezugzellpopulationen, was die Korrelation ebenfalls beeinflusst haben kann. Einerseits können Schwankungen in der Treg-Population bei einer kleineren Bezugzellpopulation wie der $CD3^+CD4^+$ Zellpopulation für Tregs_{Flow} besser abgebildet werden. Andererseits wirken sich Schwankungen in der kleineren Bezugzellpopulation stärker auf den relativen Treg-Anteil aus. Umgekehrtes gilt für eine größere Bezugzellpopulation wie den gesamten PBMCs für Tregs_{PCR}. Dieser technische Bias spiegelt sich in der weiteren Streuung der Ergebnisse für die phänotypisch quantifizierten Treg-Anteile mit fast doppelt so großer Standardabweichung sowohl für Werte vor RCT als auch nach RCT im Vergleich zu den epigenetisch quantifizierten Treg-Anteilen wider. Unspezifische Antikörperbindungen an apoptotischen oder toten Zellen könnten ebenfalls die durchflusszytometrische Messung durch falsch positive Ergebnisse beeinflussen. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit apoptotische und tote Zellen über die Streustrahlung im *Forward-Side-Scatter*-Diagramm und mit Hilfe des *Live/Dead® Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit* ausgeschlossen (Abschnitt 2.3). Um eine Verfälschung der epigenetischen Ergebnisse durch DNA-Degradation der nach der Bisulfitbehandlung als Einzelstränge vorliegenden, instabileren DNA zu vermeiden, erfolgte noch am selben Tag der Bisulfitbehandlung die methyl-

ierungsspezifische quantitative *Real-Time*-PCR. Durch diese Maßnahmen konnten weitere technische Bias minimiert werden.

4.2 Bedeutung der Tregs vor und nach RCT beim Zervixkarzinom

4.2.1 Tregs vor RCT als Indikator für das prätherapeutische Tumorstadium

Für einige Tumore gibt es abhängig vom Tumorstadium einen signifikanten Unterschied an im Blut zirkulierenden Tregs vor Therapie. In Bezug auf das Zervixkarzinom gibt es diesbezüglich bisher kaum Studien. Zhang et al. konnten für das Zervixkarzinom keine signifikanten Unterschiede an im Blut zirkulierenden Treg-Anteilen abhängig von dem klinischen Tumorstadium, der Infiltrationstiefe, den Lymphknotenmetastasen, der Blutgefäßinvasion, der Tumorgröße und dem histologischen Tumortyp feststellen. Hingegen gab es eine signifikante, positive Korrelation zwischen der histologischen Differenzierung des Zervixkarzinoms und den zirkulierenden Tregs mit einem zunehmenden Treg-Anteil bei abnehmender Differenzierung [106].

In der vorliegenden Arbeit wurde weder für phänotypisch noch epigenetisch quantifizierte Tregs ein Zusammenhang zwischen den Treg-Anteilen vor Therapie und der histologischen Differenzierung des Zervixkarzinoms gefunden. Ursache dafür kann die fehlende Standardisierung zur Erhebung histopathologischer Prognoseparameter sein. Die histologische Differenzierung mit vielen verschiedenen Grading-Systemen zählt dabei wegen fehlender standardisierter Kriterien und der Heterogenität der Tumore zu den kontroversesten dieser Parameter [15]. Der beobachtete fehlende Zusammenhang sowohl der Treg_{Flow}- als auch Treg_{PCR}-Anteile vor RCT mit dem FIGO-Stadium und dem Treg_{PCR}-Anteil vor RCT mit dem Lymphknotenstatus unabhängig vom Fernmetastasenstatus der Patientinnen (Ergebnisse nicht in der Arbeit aufgeführt: Mann-Whitney-U-Test; $P(N0; N1$ für Treg_{PCR}-Anteile vor RCT) = 0,138) bestätigt dagegen die negativen Ergebnisse von Zhang et al. Diese Ergebnisse sind nicht unerwartet. Die verwendete klinische FIGO-Klassifikation ist vergleichsweise ungenau und ein operatives Staging würde häufig zu einer höheren Stadieneingruppierung führen [13]. Nur 28 Patientinnen (57,1 %) der vorliegenden Studie erhielten eine histologische Aufarbeitung der Lymphknoten im Rahmen eines operativen Stagings in Form einer pelvinen und paraaortalen Lymphonodektomie. Bei allen anderen Patientinnen erfolgte eine klinische Evaluation mittels CT, MRT oder PET-CT, deren Sensitivität gemäß einer patientenbasierten Datenanalyse nur bei 50 %, 56 % bzw. 82 % und Spezifität bei 92 %, 91 % bzw. 95 % für

die Detektion von Lymphknotenmetastasen bei Zervixkarzinompatientinnen liegen [124]. Der signifikant höhere Anteil an Tregs_{Flow} von Patientinnen mit seltenen Karzintypen im Vergleich zu Patientinnen mit Plattenepithel- oder Adenokarzinomen in dieser Studie ist interessant, kann aber aufgrund der geringen Fallzahl von vier Patientinnen mit seltenen Karzinomen nicht abschließend bewertet werden, sondern muss in einer größeren Kohorte untersucht werden.

Für den bisher noch nicht untersuchten Zusammenhang zwischen den im Blut zirkulierenden Tregs vor Therapie und dem Fernmetastasenstatus zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang sowohl für phänotypisch als auch epigenetisch quantifizierte Treg-Anteile. Dieses traf sowohl für die alleinige Analyse des Fernmetastasenstatus (Ergebnisse nicht in der Arbeit aufgeführt: Mann-Whitney-U-Test; $P(M0; M1$ für Treg_{Flow}-Anteile vor RCT) = 0,035 und $P(M0; M1$ für Treg_{PCR}-Anteile vor RCT) = 0,001) als auch die kombinierte Analyse aus regionärem Lymphknoten- und Fernmetastasenstatus zu. Über die verlässlichere und vom Immunstatus unabhängige epigenetische Quantifizierung der zirkulierenden Tregs (vgl. Abschnitt 4.1) scheint eine bessere Unterscheidung zwischen Patientinnen ohne und mit Fernmetastasen möglich. So gab es für die Treg_{Flow}-Anteile vor RCT nur einen signifikanten Unterschied zwischen Patientinnen mit Fernmetastasen zu solchen ohne lokale Lymphknoten- und ohne Fernmetastasen (Abschnitt 3.4.2). Dagegen unterschieden sich die Treg_{PCR}-Anteile vor RCT von Patientinnen mit Fernmetastasen signifikant sowohl zu Patientinnen ohne lokale Lymphknoten- und ohne Fernmetastasen als auch zu denen mit lokalen Lymphknoten- und ohne Fernmetastasen (Abschnitt 3.5.2).

Unter der Voraussetzung, dass Marker mit einer AUC über 0,7 potentielle diagnostische Tests zur Unterscheidung von Tumorpatienten und gesunden Probanden darstellen [125], könnte der Anteil an im Blut zirkulierenden Tregs vor RCT mit einer AUC von 0,718 für die Treg_{Flow}-Anteile und mit einer AUC von 0,853 für die Treg_{PCR}-Anteile ein potentieller Marker für eine Fernmetastasierung beim Zervixkarzinom sein. Erneut scheint die epigenetische Quantifizierung der Tregs geeigneter, was auf die im Abschnitt 4.1 beschriebenen Gründe zurückzuführen ist. Unabhängig von der Art der Quantifizierung der zirkulierenden Tregs wiesen Patientinnen mit einem geringen Treg-Anteil häufiger Fernmetastasen auf. Ein hoher Anteil an zirkulierenden Tregs scheint demzufolge günstiger für Zervixkarzinompatientinnen zu sein bzw. führt eine Fernmetas-

tasierung zu einem Abfall der zirkulierenden Tregs. Dieses Ergebnis ist unerwartet, denn für den Treg-Anteil in Lymphknoten zeigte sich in früheren Studien ein umgekehrtes Bild: Lymphknotenmetastasen, die in paraaortaler Lokalisation die häufigste Form der Fernmetastasen in dieser Arbeit waren, besaßen signifikant mehr Tregs als metastasenfremde Lymphknoten und wurden mitverantwortlich für die Etablierung des systemischen Tumormunescape gemacht [60, 126]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass durch eine Analyse der zirkulierenden Tregs jene Patientinnen, bei denen bisher kein klinischer oder bildmorphologischer Verdacht auf eine Fernmetastasierung bestand, für ein zusätzliches operatives Staging ausgewählt werden können. Dazu müsste eine einheitliche, am besten epigenetische Quantifizierung der Tregs festgelegt, die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in einer prospektiven Studie und anhand eines größeren Patientenkollektives bestätigt und ein entsprechender Grenzwert für eine Fernmetastasierung festgelegt werden. Nicht diagnostizierte Lymphknotenmetastasen sind eine der Fehlerquellen des klinischen Stagings. Eine signifikante Prognoseverbesserung durch ein genaueres operatives Staging beim Zervixkarzinom zeigten Gold et al. in ihrer retrospektiven Studie [127]. Der Nachweis eines Prognose- und Überlebensvorteil eines genaueren operativen Stagings in einer randomisierten Studie von Marnitz et al. ist jedoch noch ausstehend [128].

4.2.2 Tregs vor RCT als Prognosefaktor

In der vorliegenden Arbeit wurde das erste Mal der prognostische Wert der zirkulierenden Tregs in Bezug auf das erkrankungsfreie Überleben und das Gesamtüberleben von Zervixkarzinompatientinnen untersucht. Dabei erwiesen sich die epigenetisch quantifizierten Tregs vor RCT als unabhängiger Prognosefaktor für beide Überlebensparameter mit einer besseren Prognose bei steigendem Treg_{PCR} -Anteil. Außerdem hatten Patientinnen mit vollständiger Tumorremission einen signifikant höheren Treg_{PCR} -Anteil vor RCT im Vergleich zu solchen mit Tumorpersistenz oder -rezidiv. Analog zur Beobachtung im Abschnitt 4.2.1 scheint für Zervixkarzinompatientinnen ein höherer Anteil an im Blut zirkulierenden Tregs vor RCT günstiger zu sein. Ähnliche Ergebnisse zum erkrankungsfreien Überleben und Gesamtüberleben gibt es für Patienten mit einem HPV-positiven Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle oder des Rachens [129]. Die phänotypisch quantifizierten Tregs vor RCT zeigten hingegen keinen Einfluss auf das Überleben der Zervixkarzinompatientinnen und es gab keinen Unterschied zwischen den $\text{Treg}_{\text{Flow}}$ -Anteilen vor RCT von Patientinnen mit vollständiger Tumorremission und sol-

chen mit persistierendem oder rezidivierendem Tumor. Die abweichenden Ergebnisse der unterschiedlich quantifizierten Treg-Anteile wurden bereits in Abschnitt 4.1 diskutiert. Durch das Hinzufügen der Marker Ki67 oder CD45RA zur Charakterisierung des Aktivitätsstatus der phänotypisch als $CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{low}FOXP3^+$ definierten Tregs konnten Santegoets et al. eine Assoziation der Tregs mit dem Gesamtüberleben von Ovarialkarzinompatientinnen nach Rezidiv nachweisen, bei Messungen ohne diese Marker hingegen nicht [82]. Durch die Verwendung zusätzlicher Aktivitätsmarker bei der phänotypischen Quantifizierung der Tregs entsprechend der Empfehlungen von Santegoets et al. hätten die Ergebnisse der epigenetisch quantifizierten Tregs vor RCT in Bezug auf das Überleben möglicherweise bestätigt werden können.

Ebenso wie der im Blut zirkulierende Treg-Anteil ist die Anzahl lokaler tumorinfiltrierender Tregs beim Zervixkarzinom signifikant höher im Vergleich zu gesunden Kontrollen [61, 126]. Unter der Annahme, dass die im Blut zirkulierenden Tregs ein Abbild der lokalen, tumorinfiltrierenden Tregs darstellen [130], müsste ein hoher Anteil an lokalen, tumorinfiltrierenden Tregs mit einer besseren Prognose für die Patientinnen einhergehen. Aber nur Patientinnen mit einem histologisch gesicherten Adenokarzinom, zu denen 14 % der Patientinnen in dieser Arbeit zählten, zeigten ein signifikant besseres erkrankungsfreies Überleben und erkrankungsspezifisches Gesamtüberleben bei einer hohen Gesamtanzahl an tumorinfiltrierenden Tregs [131]. Dagegen war bei Zervixkarzinompatientinnen ohne Unterscheidung der histologischen Subtypen und damit einem dominierenden Anteil an Plattenepithelkarzinomen eine hohe Anzahl an lokalen, tumorinfiltrierenden Tregs mit einer signifikant schlechteren Prognose assoziiert [132, 133]. Nur im Zusammenhang mit den tumorinfiltrierenden $CD8^+$ Zellen als $CD8^+/Treg$ -Ratio stellten die lokalen, tumorinfiltrierenden Tregs einen unabhängigen Prognosefaktor beim Zervixkarzinom dar [132, 134]. In der Metaanalyse von 2015 von Shang et al. besaßen die lokalen, tumorinfiltrierenden Tregs des Zervixkarzinoms verglichen mit anderen soliden Tumoren sogar die stärkste Assoziation mit einer schlechten Prognose für das Gesamtüberleben mit einer Odds ratio von 5,11 (95%-KI: 2,87 - 9,11) bei einer jedoch hohen Heterogenität zwischen den Zervixstudien [135].

Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit erfolgte die Quantifizierung der lokalen, tumorinfiltrierenden Tregs in den aufgeführten Studien ausschließlich durch eine phänotypische Charakterisierung. Ein weiterer Unterschied ist die Art der Therapie der Studienpatienten-

tinnen. Die Patientinnen der vorliegenden Studie wurden mittels primär kombinierter Radiochemotherapie behandelt. Dagegen erhielten die Patientinnen der anderen Studien überwiegend eine primär operative Therapie mit zum Teil adjuvanter Strahlentherapie. Bereits Lissoni et al. zeigten, dass sowohl der absolute als auch der relative Anteil im Blut zirkulierender Tregs durch die Art der Therapie unterschiedlich beeinflusst wird [107]. Selbiges bestätigten Visser et al. für unterschiedlich therapierte Zervixkarzinompatientinnen. Abhängig von der Therapie unterschied sich dabei der posttherapeutische Verlauf der Treg-Anteile [4]. Die lokale Strahlentherapie des Zervixkarzinoms führt zu einer Veränderung des lokalen Tumormilieus. So scheinen nach der Radiotherapie die radioresistenten Tregs im Zervixkarzinom zu dominieren [136]. Hingegen bleibt die Treg-Anzahl in tumordrainierenden Lymphknoten unabhängig von der Art der neoadjuvanten Therapie (alleinige Chemotherapie, Niedrig- oder Hochdosis-RCT) gleich. Tregs zeigen jedoch eine signifikant unterschiedliche Expression von Neuropillin-1 [137], einem Treg-Marker für eine effizientere Immunsuppression in tumordrainierenden Lymphknoten [138]. Demzufolge könnte die unterschiedliche Beeinflussung der Tregs durch die Therapie zu einer Veränderung ihres prognostischen Werts abhängig von der Art der Therapie führen.

Des Weiteren scheint die Lokalisation der betrachteten Tregs, selbst innerhalb des Tumor(mikromillieu)s, einen wichtigen Einfluss auf den prognostischen Wert von Tregs zu haben [62, 63]. Laut Whiteside et al. beeinflussen umgebende Faktoren und darunter auch Infektionen, welche die Immunantwort und damit auch die Bildung, die Rekrutierung und das Überleben von Tregs modulieren, den prognostischen Wert lokaler, tumorinfiltrierender Tregs [139, 139]. Dementsprechend können anti-inflammatorische Tregs, welche chronische Entzündungen als Grundlage eines Tumors eindämmen, und immunsuppressive Tregs, welche die Anti-Tumorimmunantwort verhindern und den Tumorprogress begünstigen, unterschieden werden [45, 139]. Letztlich beeinflusst wohl auch der molekulare Subtyp innerhalb der Tumorentität den prognostischen Wert der Tregs [63]. Punt et al. führten den abweichenden prognostischen Wert der lokalen, tumorinfiltrierenden Tregs zwischen Patientenkohorten mit ausschließlichem Adenokarzinom und solchen mit überwiegendem Anteil an Plattenepithelkarzinomen auf die unterschiedliche lokale Immunantwort aufgrund der divergenten molekularen Konstitution der beiden Subtypen zurück [131]. Daneben korreliert der prognostische Wert der Tregs auch mit dem Tumorstadium [63, 135]. Analog zur Umgebung des Tumors beeinflusst

laut Schmidt et al. der Entzündungsstatus des Patienten den prognostischen Wert zirkulierender Tregs sogar innerhalb einer Tumorentität [140]. Aufgrund der relativ kleinen Fallzahl wurde in der vorliegenden Arbeit keine Subgruppenanalyse hinsichtlich des prognostischen Potentials der zirkulierenden Tregs abhängig vom histologischen Tumortyp, dem Tumorstadium oder anhand eines Entzündungsparameters durchgeführt.

Andererseits könnten die im Blut zirkulierenden Tregs nicht das Abbild der Peripherie darstellen, sondern in einem reziproken Zusammenhang mit den lokalen, tumorinfiltrierenden Tregs stehen, was wiederum den abweichenden prognostischen Wert abhängig von der betrachteten Lokalisation erklären würde. Bereits Zhang et al. vermuteten, dass die lokalen, tumorinfiltrierenden Tregs aus dem peripheren Blut stammen [106]. Demzufolge hätten Zervixkarzinompatientinnen mit einer guten Prognose und einem hohen Anteil an im Blut zirkulierenden Tregs nur eine geringe Treg-Anzahl im Tumorgewebe. Umgekehrt hätten solche mit einer hohen Treg-Anzahl im Tumorgewebe einen entsprechend niedrigen Anteil an im Blut zirkulierenden Tregs und besäßen eine schlechtere Prognose. Laut Wu et al. nahm der Anteil an lokalen, tumorinfiltrierenden Tregs beim Zervixkarzinom mit steigendem Tumorstadium zu und es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Treg-Anteilen von Patienten ohne und mit regionären Lymphknotenmetastasen [141]. Gleichzeitig haben Patientinnen mit einer hohen lokalen Treg-Anzahl im Tumorgewebe eine signifikant schlechtere Prognose [132, 133]. Passend dazu nahm der Anteil an zirkulierenden $Treg_{PCR}$ mit zunehmendem Tumorstadium in der vorliegenden Arbeit ab (Abschnitt 3.5.2) und Patientinnen mit einem hohen zirkulierenden $Treg_{PCR}$ -Anteil hatten ein besseres Überleben (Abschnitt 3.5.3 und 3.5.4). Ein ähnlicher reziproker Zusammenhang könnte auch zwischen den im Blut zirkulierenden Tregs und den lokalen, lymphknotenständigen Tregs bestehen (Abschnitt 4.2.1). Um den Zusammenhang zwischen den im Blut zirkulierenden Tregs und den gewebeständigen Tregs beim Zervixkarzinom zu klären, würde sich eine zusätzliche, vorzugsweise epigenetische Quantifizierung der Tregs in Tumorproben der Studienpatientinnen eignen (vgl. Abschnitt 4.1).

Im Rahmen einer immunmodulatorischen Therapie bieten Tregs einen attraktiven Angriffspunkt [2]. Dabei existiert eine Vielzahl an Möglichkeiten Tregs und deren Funktion zu blockieren, unter anderem auch durch die Inhibition von Immun-Checkpoints, die in Tregs vermehrt exprimiert sein können [45, 142]. Für das fortgeschrittene, rezurren-

oder metastasierte Zervixkarzinom laufen derzeit mehrere klinische Phase I- bis II-Studien mit den Immun-Checkpoint-Inhibitoren Anti-CTLA-4(*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*)-Antikörpern und Anti-PD-1(*programmed cell death protein 1*)-Antikörpern, welche bereits erfolgreich beim Melanom und Lungentumor getestet wurden [143–145]. Im murinen Zervixkarzinommodell von Tuve et al. wurde durch eine alleinige systemische Gabe von Anti-CTLA-4-Antikörpern, Anti-CD25-Antikörpern und *low-dose* Cyclophosphamid zur Treg-Inhibition bzw.-Depletion kein signifikanter Einfluss auf das Tumorstadium festgestellt [146]. Loddenkemper et al. dagegen konnten in ihrem murinen Zervixkarzinommodell mit einer einmaligen systemischen Gabe eines Anti-GFTR(*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related protein*)-Antikörpers zur Blockade der Treg-Suppression das Überleben der Tiere verbessern und in 70 % der Fälle eine komplette und permanente Tumoreradikation erzielen [147]. Die Ergebnisse der laufenden klinischen Studien könnten zur Abschätzung des prognostischen Werts der Tregs beim Zervixkarzinom und zur Klärung des Potentials einer Treg-inhibierenden bzw. -depletierenden Therapie beim Zervixkarzinom beitragen. Die Wirkung der Immun-Checkpoint-Inhibitoren ist jedoch nicht alleine auf eine Beeinflussung der Tregs zurückzuführen [145].

4.2.3 Tregs nach RCT als Prognosefaktor

Neben der vorliegenden Arbeit führten Visser et al. eine Längsschnittstudie zu im Blut zirkulierenden Tregs bei Zervixkarzinompatientinnen durch. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen, die einen zeitlich stabilen Treg-Verlauf besaßen, veränderte sich der Treg-Anteil im Blut der Zervixkarzinompatientinnen abhängig von der Therapie. Patientinnen mit einer RCT zeigten im Vergleich zu chirurgisch therapierten Patientinnen keinen Abfall des Treg-Anteils während oder nach der Therapie unter den Ausgangswert vor Therapie [4].

Bei Betrachtung des gesamten Patientenkollektives gab es in der vorliegenden Arbeit ebenfalls keinen Abfall des im Blut zirkulierenden Treg_{Flow⁻} bzw. Treg_{PCR}-Anteils nach Abschluss der RCT. Der phänotypisch quantifizierte Treg-Anteil war nach RCT sogar signifikant höher als vor RCT für Patientinnen mit einer vollständigen Remission, was auf 73 % der Studienpatientinnen zutraf, und damit auch auf das gesamte Patientenkollektiv unabhängig vom Tumorstatus nach RCT. Dagegen variierte der Verlauf der epigenetisch quantifizierten Treg-Anteile vor und nach RCT von Patientin zu Patientin, so-

dass der Treg_{PCR}-Anteil vor und nach RCT bei Betrachtung des gesamten Patientenkollektives und abhängig vom Tumorstatus nach RCT insgesamt unverändert blieb. Die Gründe für die abweichenden Ergebnisse der unterschiedlich quantifizierten Treg-Anteile wurden bereits im Abschnitt 4.1 diskutiert. Weder für die Treg_{Flow}- noch für die Treg_{PCR}-Anteile nach RCT konnte ein Zusammenhang zum Tumorstatus nach RCT oder zu den untersuchten Überlebensparametern der Patientinnen nachgewiesen werden. An dieser Stelle sei nochmals auf die Limitation durch den sehr variablen Blutentnahmezeitpunkt nach RCT hingewiesen, weshalb diese Ergebnisse nicht weiter interpretiert werden. Visser et al. führten die fehlende Abnahme ihrer phänotypisch quantifizierten Tregs nach RCT auf eine Hochregulation der Tregs zur Wahrung der Immunhomeostasis zurück, da durch die RCT und dem damit verbundenen Gewebeuntergang und der Zellapoptose das Immunsystem aktiviert wird [4]. Außerdem sind Tregs radioresistenter als andere Lymphozyten. Abhängig von der Therapie, der Art der Bestrahlung, der Bestrahlungsdosis und dem verwendeten Modell können Tregs jedoch beeinflusst werden [107, 108, 148]. Gemäß Persa et al. führt eine Bestrahlung im Rahmen einer Tumorthherapie sogar zu einer gesteigerten Treg-Suppressionskapazität, wogegen eine Bestrahlung unter physiologischen Bedingungen die Treg-Suppression inhibiert oder keinen Einfluss auf diese hat [108]. Folglich kann abhängig von der Therapie der prognostische Wert der Tregs nach Therapie, insbesondere nach RCT, im Vergleich zu dem vor Therapie verändert sein. Empfehlenswert wäre deshalb eine prospektive Studie mit am besten epigenetischer Quantifizierung der Tregs (vgl. Abschnitt 4.1) direkt nach Abschluss der RCT und in einem definierten Zeitraum nach RCT. So kann der Einfluss der RCT auf die Tregs, die Radioresistenz der im Blut zirkulierenden Tregs und der prognostische Wert der zirkulierenden Tregs nach RCT verlässlich untersucht werden.

4.3 Schlussfolgerung

Über die phänotypisch als CD3⁺CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Tregs_{Flow} und die epigenetisch über den Nachweis von demethyliertem FOXP3i1 definierten Tregs_{PCR} wird nicht dieselbe Treg-Zellpopulation quantifiziert. Die epigenetische Quantifizierung bildet dabei verlässlichere, vom Immunstatus unabhängige und zwischen Studien besser vergleichbare Ergebnisse der im Blut zirkulierenden Treg-Anteile bei Zervixkarzinompatientinnen ab. Bei der phänotypischen Quantifizierung der Tregs fehlt dagegen bisher ein eindeutiger Treg-spezifischer Marker bzw. eine einheitliche Markerkombination.

In der vorliegenden Studie wurde ein hoher Anteil im Blut zirkulierender Tregs vor RCT als prognostisch günstiger Biomarker beim primären Zervixkarzinom identifiziert. Patientinnen mit einem hohen Treg_{Flow}⁻ bzw. Treg_{PCR}-Anteil vor RCT zeigten signifikant seltener Fernmetastasen. Der Treg_{Flow}⁻ und Treg_{PCR}-Anteil können damit als Indikator für eine Fernmetastasierung genutzt werden. Patientinnen mit einem hohen Treg_{PCR}-Anteil vor RCT zeigten zudem ein signifikant besseres erkrankungsfreies Überleben und Gesamtüberleben. Der Treg_{PCR}-Anteil ist damit auch ein unabhängiger Prognosefaktor für beide Überlebensparameter, der Treg_{Flow}⁻-Anteil hingegen nicht. Einschränkend sei auf die (tumor)unspezifische Bestimmung der im Blut zirkulierenden Tregs der Zervixkarzinompatientinnen hingewiesen. Außerdem wurde im Sinne des explorativen Charakters der vorliegenden Arbeit nur eine kleine, repräsentative Gruppe an Zervixkarzinompatientinnen mit primärer RCT untersucht. Nicht alle Prognosefaktoren konnten mit diesem Patientenkollektiv bestätigt werden, wie beispielsweise der Lymphknotenstatus. Zum einen gab es kein einheitliches Staging, sondern ein rein klinisches und ein operatives (Lymphknoten-)Staging, und zum anderen handelte es sich bei einigen Prognosefaktoren um Einschlusskriterien für eine RCT oder es erfolgte abhängig davon eine Therapieanpassung, wodurch der prognostische Wert beeinflusst werden konnte.

Dies ist die erste Studie zum prognostischen Wert der im Blut zirkulierenden Tregs beim primären Zervixkarzinom. Die Ergebnisse aus den laufenden klinischen Studien zur immunmodulatorischen Therapie beim Zervixkarzinom, welche auch Tregs beeinflusst, werden zur weiteren Klärung des prognostischen Werts beitragen. Für zukünftige Studien wäre eine einheitliche und verlässliche Bestimmung der Tregs in Bezug auf die Art ihrer Quantifizierung und ihrer Lokalisation wichtig. Zusätzlich sollte auf ein vergleichbares Patientenkollektiv, insbesondere im Hinblick auf den Tumor (Stadium und Histologie) und die Art der Therapie (RCT versus Operation) geachtet werden.

Literaturverzeichnis

- [1] WHO Media centre. *Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>
Aktualisierungsdatum: 03/2015, Überprüfungsdatum: 13.09.2015.
- [2] Conesa-Zamora P. *Immune responses against virus and tumor in cervical carcinogenesis: Treatment strategies for avoiding the HPV-induced immune escape*. *Gynecol Oncol* 2013; 131: 480–488.
- [3] Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. *Regulatory T Cells and Immune Tolerance*. *Cell* 2008; 133: 775–787.
- [4] Visser J, Nijman HW, Hoogenboom BN, Jager P, van Baarle D, Schuurin E, Abdulahad W, Miedema F, van der Zee AG, Daemen T. *Frequencies and role of regulatory T cells in patients with (pre)malignant cervical neoplasia*. *Clin Exp Immunol* 2007; 150: 199–209.
- [5] *Krebs in Deutschland 2009/2010*. 9. Ausgabe, Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.), Berlin 2013.
- [6] Kraywinkel K, Bertz J, Laudi A, Wolf U. *Epidemiologie und Früherkennung häufiger Krebserkrankungen in Deutschland*. 3(4), Robert Koch-Institut (Hrsg.), GBE kompakt, Berlin 2012.
- [7] Chen T, Jansen L, Gondos A, Emrich K, Holleczeck B, Luttmann S, Waldmann A, Brenner H. *Survival of cervical cancer patients in Germany in the early 21st century: a period analysis by age, histology, and stage*. *Acta Oncol* 2012; 51: 915–921.
- [8] Krams M, Frahm SO, Kellner U, Mawrin C, Schüller S. *Kurzlehrbuch Pathologie*. 2., aktualisierte Aufl., Thieme, Stuttgart 2013.
- [9] Tavassoli FA, Devilee P. *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. IARC Press, Lyon 2003.
- [10] Gallup DG. *The Spread and Staging of Cervical Cancer*. GLOWM 2008.
- [11] Schneider A. *Einführung in Ätiologie, Epidemiologie, Klinik, Diagnostik, Staging, Therapie, Prognose, Prävention sowie Nachsorge präkanzeröser und invasiver*

Veränderungen der Cervix uteri. <http://www2.uni-jena.de/ufk/CDKolposkopiekursJena/Zervixkapitel/folder/start.htm>

Aktualisierungsdatum: 22.02.2002, Überprüfungsdatum: 25.03.2016.

- [12] Benedet JL ; Bender HG ; Jones HW, 3rd ; Pecorelli S ; Ngan HYS. *Staging Classifications and Clinical Practice Guidelines for Gynaecological Cancers.* https://www.researchgate.net/publication/242550274_Staging_Classifications_and_Clinical_Practice_Guidelines_for_Gynaecologic_Cancers
Aktualisierungsdatum: 10.10.2006, Überprüfungsdatum: 25.05.2017.
- [13] Pecorelli S, Zigliani L, Odicino F. *Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix.* Int J Gynaecol Obstet 2009; 105: 107–108.
- [14] Horn LC, Schierle K, Schmidt D, Ulrich U, Liebmann A, Wittekind C. *Aktuelle TNM/FIGO-Stadieneinteilung für das Zervix- und Endometriumkarzinom sowie maligne Müller-Mischtumoren. Fakten und Hintergründe.* Pathologe 2011; 32: 239–243.
- [15] Singh N, Arif S. *Histopathologic parameters of prognosis in cervical cancer - a review.* Int J Gynecol Cancer 2004; 14: 741–750.
- [16] Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF). *S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Patientin mit Zervixkarzinom: Langversion 1.0.* AWMF Registernummer: 032/033OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>
Aktualisierungsdatum: 09/2014, Überprüfungsdatum: 18.09.2015.
- [17] Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJF, Peto J, Meijer CJLM, Muñoz N. *Human Papillomavirus is a Necessary Cause of Invasive Cervical Cancer Worldwide.* J Pathol 1999; 189: 12–19.
- [18] Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV. *The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer.* J Clin Pathol 2002; 55: 244–265.
- [19] Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shan KV. *Prevalence of Human Papillomavirus in Cervical Cancer: a Worldwide Perspective.* J Natl Cancer Inst 1995; 87: 796–802.

- [20] Franco EL, Harper DM. *Vaccination against human papillomavirus infection: a new paradigm in cervical cancer control*. *Vaccine* 2005; 23: 2388–2394.
- [21] de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. *Classification of papillomaviruses*. *Virology* 2004; 324: 17–27.
- [22] Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. *Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer*. *Vaccine* 2006; 24 (Suppl 3): 1–10.
- [23] International Agency for Research on Cancer. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Biological Agents, Volume 100 B, a Review of Human Carcinogens*. IARC, Lyon 2012.
- [24] de Sanjose S, Quint WGV, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, Tous S, Felix A, Bravo LE, Shin HR, Vallejos CS, de Ruiz PA, Lima MA, Guimera N, Clavero O, Alejo M, Llombart-Bosch A, Cheng-Yang C, Tatti SA, Kasamatsu E, Iljazovic E, Odida M, Prado R, Seoud M, Grce M, Usubutun A, Jain A, Suarez GAH, Lombardi LE, Banjo A, Menéndez C, Domingo EJ, Velasco J, Nessa A, Chichareon SCB, Qiao YL, Lerma E, Garland SM, Sasagawa T, Ferrera A, Hammouda D, Mariani L, Pelayo A, Steiner I, Oliva E, Meijer CJLM, Al-Jassar WF, Cruz E, Wright TC, Puras A, Llave CL, Tzardi M, Agorastos T, Garcia-Barriola V, Clavel C, Ordi J, Andújar M, Castellsagué X, Sánchez GI, Nowakowski AM, Bornstein J, Muñoz N, Bosch FX. *Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study*. *The Lancet Oncology* 2010; 11: 1048–1056.
- [25] Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJF, Meijer CJLM. *Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer*. *N Engl J Med* 2003; 348: 518–527.
- [26] Kjaer SK, Chackerian B, van den Brule AJC, Svare EI, Paull G, Walbomers JMM, Schiller JT, Bock JE, Sherman ME, Lowy DR, Meijer CLM. *High-Risk Human Papillomavirus Is Sexually Transmitted: Evidence from a Follow-Up Study of Virgins Starting Sexual Activity (Intercourse)*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 101–106.
- [27] Syrjänen K, Hakama M, Saarikoski S, Väyrynen M, Yliskoski M, Syrjänen S, Kataja V, Castrén O. *Prevalence, Incidence, and Estimated Life-time Risk of Cervical*

- Human Papillomavirus Infections in a Nonselected Finnish Female Population. Sex Transm Dis* 1990; 17: 15–19.
- [28] Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. *Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 Continents: Meta-Analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Findings. J Infect Dis* 2010; 202: 1789–1799.
- [29] Mao C, Hughes JP, Kiviat N, Kuypers J, Lee SK, Adam DE, Koutsky LA. *Clinical findings among young women with genital human papillomavirus infection. Am J Obstet Gynecol* 2003; 188: 677–684.
- [30] Rodríguez AC, Schiffman M, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A, Castle PE, Solomon D, Burk R. *Rapid Clearance of Human Papillomavirus and Implications for Clinical Focus on Persistent Infections. J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 513–517.
- [31] Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, Rush BB, Glass AG, Schiffman M. *The Elevated 10-Year Risk of Cervical Precancer and Cancer in Women With Human Papillomavirus (HPV) Type 16 or 18 and the Possible Utility of Type-Specific HPV Testing in Clinical Practice. J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1072–1079.
- [32] Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, Stevens CE, Paavonen J, Beckmann AM, DeRouen TA, Galloway DA, Vernon D, Kiviat NB. *A Cohort Study of the Risk of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2 or 3 in Relation to Papillomavirus Infection. N Engl J Med* 1992; 327: 1272–1278.
- [33] Winer RL, Kiviat NB, Hughes JP, Adam DE, Lee SK, Kuypers JM, Koutsky LA. *Development and Duration of Human Papillomavirus Lesions, after Initial Infection. J Infect Dis* 2005; 191: 731–738.
- [34] Horn LC, Klostermann K. *Präkanzerosen der Cervix uteri: Morphologie und Molekularpathologie. Pathologe* 2011; 32 (Suppl 2): 242–254.
- [35] Deligeoroglou E, Giannouli A, Athanasopoulos N, Karountzos V, Vatopoulou A, Dimopoulos K, Creatsas G. *HPV Infection: Immunological Aspects and Their Utility in Future Therapy. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 2013; 2013: 540850.
- [36] Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. *Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. Virus Res* 2002; 89: 191–199.

- [37] Landoni F, Maneo A, Colombo A, Placa F, Milani R, Perego P, Favini G, Ferri L, Mangioni C. *Randomised study of radical surgery versus radiotherapy for stage Ib-IIa cervical cancer*. *Lancet* 1997; 350: 535–540.
- [38] Chemoradiotherapy for Cervical Cancer Meta-analysis Collaboration. *Reducing Uncertainties About the Effects of Chemoradiotherapy for Cervical Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Individual Patient Data From 18 Randomized Trials*. *Journal of Clinical Oncology* 2008; 26: 5802–5812.
- [39] Wang N, Guan QL, Wang K, Zhou X, Gao C, Yang HT, Ni TG. *Radiochemotherapy versus radiotherapy in locally advanced cervical cancer: a meta-analysis*. *Arch Gynecol Obstet* 2011; 283: 103–108.
- [40] Rosa DD, Medeiros LRF, Edelweiss MI, Pohlmann PR, Stein AT. *Adjuvant platinum-based chemotherapy for early stage cervical cancer*. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 6: CD005342.
- [41] Kaidar-Person O, Bortnyak-Abdah R, Amit A, Berniger A, Ben-Yosef R, Kuten A. *Current principles for radiotherapy in cervical cancer*. *Med Oncol* 2012; 29: 2919–2922.
- [42] Viani GA, Manta GB, Stefano EJ, de Fendi LI. *Brachytherapy for cervix cancer: low-dose rate or high-dose rate brachytherapy - a meta-analysis of clinical trials*. *J Exp Clin Cancer Res* 2009; 28: 47.
- [43] Wang X, Liu R, Tian JH, Yang K, Wang J, Jiang L, Hao XY. *High dose rate versus low dose rate intracavity brachytherapy for locally advanced uterine cervix cancer*. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; 10: CD007563.
- [44] Welters MJP, Piersma SJ, van der Burg SH. *T-regulatory cells in tumour-specific vaccination strategies*. *Expert Opin Biol Ther* 2008; 8: 1365–1379.
- [45] Wolf D, Sopper S, Pircher A, Gastl G, Wolf AM. *Treg(s) in Cancer: Friends or Foe?* *J. Cell. Physiol.* 2015; 230: 2598–2605.
- [46] Corthay A. *How do Regulatory T Cells Work?* *Scand J Immunol* 2009; 70: 326–336.
- [47] Peterson RA. *Regulatory T-Cells: Diverse Phenotypes Integral to Immune Homeostasis and Suppression*. *Toxicologic Pathology* 2012; 40: 186–204.

- [48] Li Z, Li D, Tsun A, Li B. *FOXP3⁺ regulatory T cells and their functional regulation*. Cell Mol Immunol 2015; 12: 558–565.
- [49] Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, Campbell DJ, Ghosh S, Hori S, Jiang S, Kuchroo VK, Mathis D, Roncarolo MG, Rudensky A, Sakaguchi S, Shevach EM, Vignali DAA, Ziegler SF. *Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature*. Nat Immunol 2013; 14: 307–308.
- [50] Shevach EM, Thornton AM. *tTregs, pTregs, and iTregs: Similarities and Differences*. Immunol Rev 2014; 259: 88–102.
- [51] Huehn J, Beyer M. *Epigenetic and transcriptional control of Foxp3⁺ regulatory T cells*. Semin Immunol 2015; 27: 10–18.
- [52] Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. *Conversion of Peripheral CD4⁺CD25⁻ Naive T Cells to CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells by TGF-beta Induction of Transcription Factor Foxp3*. J Exp Med 2003; 198: 1875–1886.
- [53] Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. *How regulatory T cells work*. Nat Rev Immunol 2008; 8: 523–532.
- [54] Schmidt A, Oberle N, Krammer PH. *Molecular mechanisms of Treg-mediated T cell suppression*. Front. Immun. 2012; 3: 51.
- [55] Chen X, Du Y, Lin X, Qian Y, Zhou T, Huang Z. *CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in tumor immunity*. International Immunopharmacology 2016; 34: 244–249.
- [56] Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ. *Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target*. Immunology 2008; 124: 13–22.
- [57] Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S. *Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state*. Int Immunol 1998; 10: 1969–1980.
- [58] Thornton AM, Shevach EM. *Suppressor Effector Function of CD4⁺CD25⁺ Immunoregulatory T Cells Is Antigen Nonspecific*. The Journal of Immunology 2000; 164: 183–190.

- [59] Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. *Ex Vivo Isolation and Characterization of CD4⁺CD25⁺ T Cells with Regulatory Properties from Human Blood*. J Exp Med 2001; 193: 1303–1310.
- [60] Battaglia A, Buzzonetti A, Baranello C, Ferrandina G, Martinelli E, Fanfani F, Scambia G, Fattorossi A. *Metastatic tumour cells favour the generation of a tolerogenic milieu in tumour draining lymph node in patients with early cervical cancer*. Cancer Immunol Immunother 2009; 58: 1363–1373.
- [61] Adurthi S, Krishna S, Mukherjee G, Bafna UD, Devi U, Jayshree RS. *Regulatory T cells in a Spectrum of HPV-Induced Cervical Lesions: Cervicitis, Cervical Intraepithelial Neoplasia and Squamous Cell Carcinoma*. Am J Reprod Immunol 2008; 60: 55–65.
- [62] Ménétrier-Caux C, Gobert M, Caux C. *Differences in Tumor Regulatory T-Cell Localization and Activation Status Impact Patient Outcome*. Cancer Res 2009; 69: 7895–7898.
- [63] deLeeuw RJ, Kost SE, Kakal JA, Nelson BH. *The prognostic Value of FoxP3⁺ Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Cancer: a critical review of the literature*. Clinical Cancer Research 2012; 18: 3022–3029.
- [64] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol 1995; 155: 1151–1164.
- [65] Kuniyasu Y, Takahashi T, Itoh M, Shimizu J, Toda G, Sakaguchi S. *Naturally anergic and suppressive CD25⁺CD4⁺ T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation*. Int Immunol 2000; 12: 1145–1155.
- [66] Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. *Human CD25⁺CD4⁺ T Regulatory Cells Suppress Naive and Memory T Cell Proliferation and Can Be Expanded In Vitro without Loss of Function*. J Exp Med 2001; 193: 1295–1302.
- [67] Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. *CD4⁺CD25^{high} Regulatory Cells in Human Peripheral Blood*. J Immunol 2001; 167: 1245–1253.

- [68] Chen X, Oppenheim JJ. *Resolving the identity myth: Key markers of functional CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells*. International Immunopharmacology 2011; 11: 1489–1496.
- [69] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. *Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3*. Science 2003; 299: 1057–1061.
- [70] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. *Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells*. Nat Immunol 2003; 4: 330–336.
- [71] Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, Maeda M, Onodera M, Uchiyama T, Fujii S, Sakaguchi S. *Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells*. Int Immunol 2004; 16: 1643–1656.
- [72] Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. *Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse*. Nat Genet 2001; 27: 68–73.
- [73] Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, Levy-Lahad E, Mazzella M, Goulet O, Perroni L, Bricarelli FD, Byrne G, McEuen M, Proll S, Appleby M, Brunkow ME. *X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy*. Nat Genet 2001; 27: 18–20.
- [74] Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3*. Nat Genet 2001; 27: 20–21.
- [75] Barzaghi F, Passerini L, Bacchetta R. *Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x-linked syndrome: a paradigm of immunodeficiency with autoimmunity*. Front Immunol 2012; 3: 211.
- [76] Devaud C, Darcy PK, Kershaw MH. *Foxp3 expression in T regulatory cells and other cell lineages*. Cancer Immunol Immunother 2014; 63: 869–876.

- [77] Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EIH, Huizinga TWJ, Toes REM. *Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4⁺ T cells*. Eur J Immunol 2007; 37: 129–138.
- [78] Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, DeRoos P, Ho WY, Stray-Pedersen A, Ocheltree EL, Greenberg PD, Ochs HD, Rudensky AY. *Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development*. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103: 6659–6664.
- [79] Ziegler SF. *FOXP3: Not just for regulatory T cells anymore*. Eur J Immunol 2007; 37: 21–23.
- [80] Morgan ME, van Bilsen JHM, Bakker AM, Heemskerk B, Schilham MW, Hartgers FC, Elferink BG, van der Zanden L, de Vries RRP, Huizinga TWJ, Ottenhoff THM, Toes REM. *Expression of FOXP3 mRNA Is Not Confined to CD4⁺CD25⁺ T Regulatory Cells in Humans*. Hum Immunol 2005; 66: 13–20.
- [81] Lastovicka J. *The Phenotypic Markers of CD4⁺CD25⁺ T Regulatory Lymphocytes*. Res Immunol 2013; 2013: 1–14.
- [82] Santegoets SJAM, Dijkgraaf EM, Battaglia A, Beckhove P, Britten CM, Gallimore A, Godkin A, Gouttefangeas C, de Gruijl TD, Koenen HJPM, Scheffold A, Shevach EM, Staats J, Taskén K, Whiteside TL, Kroep JR, Welters MJP, van der Burg SH. *Monitoring regulatory T cells in clinical samples: consensus on an essential marker set and gating strategy for regulatory T cell analysis by flow cytometry*. Cancer Immunol Immunother 2015; 64: 1271–1286.
- [83] Snyder-Cappione J. *How To Differentiate T-Regulatory Cells (Tregs) By Flow Cytometry*. <https://expertcytometry.com/how-to-differentiate-tregs-t-regulatory-cells-by-flow-cytometry/>
Aktualisierungsdatum: 06.01.2016, Überprüfungsdatum: 15.02.2016.
- [84] Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. *CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells*. J Exp Med 2006; 203: 1701–1711.
- [85] Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B.

- Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells.* J Exp Med 2006; 203: 1693–1700.
- [86] Yu N, Li X, Song W, Li D, Yu D, Zeng X, Li M, Leng X, Li X. *CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} T Cells: A More Specific Treg Population in Human Peripheral Blood.* Inflammation 2012; 35: 1773–1780.
- [87] Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, Roncarolo MG, Levings MK. *Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production.* Int Immunol 2007; 19: 345–354.
- [88] Aerts NE, Dombrecht EJ, Ebo DG, Bridts CH, Stevens WJ, De Clerck LS. *Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis.* Cell Immunol 2008; 251: 109–115.
- [89] Hamilton JP. *Epigenetics: Principles and Practice.* Dig Dis 2011; 29: 130–135.
- [90] Nordheim A, Knippers R. *Molekulare Genetik.* 10., vollständig überarbeitete und erweiterte Aufl., Thieme, Stuttgart 2015.
- [91] Gibney ER, Nolan CM. *Epigenetics and gene expression.* Heredity (Edinb) 2010; 105: 4–13.
- [92] Huehn J, Polansky JK, Hamann A. *Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage?* Nat Rev Immunol 2009; 9: 83–89.
- [93] Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, Schlawe K, Chang HD, Bopp T, Schmitt E, Klein-Hessling S, Serfling E, Hamann A, Huehn J. *Epigenetic Control of the foxp3 Locus in Regulatory T Cells.* PLoS Biol 2007; 5: e38.
- [94] Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, Peng XP, Forbush K, Rudensky AY. *Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate.* Nature 2010; 463: 808–812.
- [95] de Vries IJM, Castelli C, Huygens C, Jacobs JFM, Stockis J, Schuler-Thurner B, Adema GJ, Punt CJA, Rivoltini L, Schuler G, Coulie PG, Lucas S. *Frequency of Circulating Tregs with Demethylated FOXP3 Intron 1 in Melanoma Patients Receiving Tumor Vaccines and Potentially Treg-Depleting Agents.* Clinical Cancer Research 2011; 17: 841–848.

- [96] Baron U, Floess S, Wieczorek G, Baumann K, Grützkau A, Dong J, Thiel A, Boeld TJ, Hoffmann P, Edinger M, Türbachova I, Hamann A, Olek S, Huehn J. *DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3⁺ conventional T cells*. Eur J Immunol 2007; 37: 2378–2389.
- [97] Toker A, Engelbert D, Garg G, Polansky JK, Floess S, Miyao T, Baron U, Düber S, Geffers R, Giehr P, Schallenberg S, Kretschmer K, Olek S, Walter J, Weiss S, Hori S, Hamann A, Huehn J. *Active Demethylation of the Foxp3 Locus Leads to the Generation of Stable Regulatory T Cells within the Thymus*. J Immunol 2013; 190: 3180–3188.
- [98] Stockis J, Fink W, François V, Connerotte T, de Smet C, Knoops L, van der Bruggen P, Boon T, Coulie PG, Lucas S. *Comparison of stable human Treg and Th clones by transcriptional profiling*. Eur J Immunol 2009; 39: 869–882.
- [99] Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, Floess S, Garbe A, Baron U, Olek S, Hamann A, von Boehmer H, Huehn J. *DNA methylation controls Foxp3 gene expression*. Eur J Immunol 2008; 38: 1654–1663.
- [100] Wieczorek G, Asemissen A, Model F, Turbachova I, Floess S, Liebenberg V, Baron U, Stauch D, Kotsch K, Pratschke J, Hamann A, Loddenkemper C, Stein H, Volk HD, Hoffmüller U, Grützkau A, Mustea A, Huehn J, Scheibenbogen C, Olek S. *Quantitative DNA Methylation Analysis of FOXP3 as a New Method for Counting Regulatory T Cells in Peripheral Blood and Solid Tissue*. Cancer Res 2009; 69: 599–608.
- [101] Sehouli J, Loddenkemper C, Cornu T, Schwachula T, Hoffmüller U, Grützkau A, Lohneis P, Dickhaus T, Gröne J, Kruschewski M, Mustea A, Turbachova I, Baron U, Olek S. *Epigenetic quantification of tumor-infiltrating T-lymphocytes*. Epigenetics 2014; 6: 236–246.
- [102] Tatura R, Zeschmig M, Adamzik M, Probst-Kepper M, Buer J, Kehrmann J. *Quantification of Regulatory T Cells in Septic Patients by Real-Time PCR-Based Methylation Assay and Flow Cytometry*. PLoS ONE 2012; 7: e49962.
- [103] Brandhorst G, Petrova DT, Weigand S, Eberle C, von Ahsen N, Schmitz J, Schultze FC, Raddatz D, Karaus M, Oellerich M, Walson PD. *Lack of correlation between Treg quantification assays in inflammatory bowel disease patients*. World J Gastroenterol 2015; 21: 3325–3329.

- [104] Liu J, Lluís A, Illi S, Layland L, Olek S, von Mutius E, Schaub B. *T Regulatory Cells in Cord Blood - FOXP3 Demethylation as Reliable Quantitative Marker*. PLoS ONE 2010; 5: e13267.
- [105] Chen Z, Ding J, Pang N, Du R, Meng W, Zhu Y, Zhang Y, Ma C, Ding Y. *The Th17/Treg balance and the expression of related cytokines in Uygur cervical cancer patients*. Diagn Pathol 2013; 8: 61.
- [106] Zhang Y, Ma D, Zhang Y, Tian Y, Wang X, Qiao Y, Cui B. *The imbalance of Th17/Treg in patients with uterine cervical cancer*. Clin Chim Acta 2011; 412: 894–900.
- [107] Lissoni P, Brivio F, Fumagalli L, Messina G, Meregalli S, Porro G, Rovelli F, Vigore L, Tisi E, D'Amico G. *Effects of the Conventional Antitumor Therapies Surgery, Chemotherapy, Radiotherapy and Immunotherapy on Regulatory T Lymphocytes in Cancer Patients*. Anticancer Res 2009; 29: 1847–1852.
- [108] Persa E, Balogh A, Sáfrány G, Lumnitzky K. *The effect of ionizing radiation on regulatory T cells in health and disease*. Cancer Letters 2015; 368: 252–261.
- [109] Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. *Der Experimentator: Immunologie*. 2. Aufl., Elsevier, München 2006.
- [110] Baumgarth N, Roederer M. *A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping*. J Immunol Methods 2000; 243: 77–97.
- [111] Mülhardt C. *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. 5. Aufl., Elsevier, München 2006.
- [112] Hayatsu H. *Discovery of bisulfite-mediated cytosine conversion to uracil, the key reaction for DNA methylation analysis - A personal account*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 2008; 84: 321–330.
- [113] Weisenberger DJ, Trinh BN, Campan M, Sharma S, Long TI, Ananthnarayan S, Liang G, Esteva FJ, Hortobagyi GN, McCormick F, Jones PA, Laird PW. *DNA methylation analysis by digital bisulfite genomic sequencing and digital MethyLight*. Nucleic Acids Res 2008; 36: 4689–4698.
- [114] Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. *The MIQE*

Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clin Chem 2009; 55: 611–622.

- [115] Applied Biosystems. *Real-Time PCR: Understanding C_T*. <http://sequencingfacility.med.monash.edu.au/pdf/understanding.pdf>
Aktualisierungsdatum: 05/2008, Überprüfungsdatum: 24.04.2017.
- [116] Heusinkveld M, Welters MJP, van Poelgeest MIE, van der Hulst JM, Melief CJM, Fleuren GJJ, Kenter GG, van der Burg SH. *The detection of circulating human papillomavirus-specific T cells is associated with improved survival of patients with deeply infiltrating tumors.* Int J Cancer 2011; 128: 379–389.
- [117] Nettenstrom L, Alderson K, Raschke EE, Evans MD, Sondel PM, Olek S, Seroogy CM. *An Optimized Multi-parameter Flow Cytometry Protocol for Human T Regulatory Cell Analysis on Fresh and Viably Frozen Cells, Correlation with Epigenetic Analysis, and Comparison of Cord and Adult Blood.* J Immunol Methods 2013; 387: 81–88.
- [118] Klein S, Kretz CC, Krammer PH, Kuhn A. *CD127^{low/-} and FoxP3⁺ Expression Levels Characterize Different Regulatory T-Cell Populations in Human Peripheral Blood.* J Invest Dermatol 2010; 130: 492–499.
- [119] Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. *FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system.* Nat Rev Immunol 2010; 10: 490–500.
- [120] Presicce P, Moreno-Fernandez ME, Lages CS, Orsborn KI, Chougnet CA. *Association of two clones allows for optimal detection of human FOXP3.* Cytometry A 2010; 77: 571–579.
- [121] Law JP, Hirschhorn DF, Owen RE, Biswas HH, Norris PJ, Lanteri MC. *The importance of Foxp3 antibody and fixation/permeabilization buffer combinations in identifying CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells.* Cytometry A 2009; 75: 1040–1050.
- [122] Miyao T, Floess S, Setoguchi R, Luche H, Fehling HJ, Waldmann H, Huehn J, Hori S. *Plasticity of Foxp3⁺ T Cells Reflects Promiscuous Foxp3 Expression in Conventional T Cells but Not Reprogramming of Regulatory T Cells.* Immunity 2012; 36: 262–275.

- [123] Cao M, Cabrera R, Xu Y, Liu C, Nelson D. *Gamma irradiation alters the phenotype and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells*. *Cell Biol Int* 2009; 33: 565–571.
- [124] Choi HJ, Ju W, Myung SK, Kim Y. *Diagnostic performance of computer tomography, magnetic resonance imaging, and positron emission tomography or positron emission tomography/computer tomography for detection of metastatic lymph nodes in patients with cervical cancer: Meta-analysis*. *Cancer Science* 2010; 101: 1471–1479.
- [125] Lofton-Day C, Model F, de Vos T, Tetzner R, Distler J, Schuster M, Song X, Lesche R, Liebenberg V, Ebert M, Molnar B, Grützmann R, Pilarsky C, Sledziwski A. *DNA Methylation Biomarkers for Blood-Based Colorectal Cancer Screening*. *Clin Chem* 2008; 54: 414–423.
- [126] Nakamura T, Shima T, Saeki A, Hidaka T, Nakashima A, Takikawa O, Saito S. *Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer*. *Cancer Science* 2007; 98: 874–881.
- [127] Gold MA, Tian C, Whitney CW, Rose PG, Lanciano R. *Surgical Versus Radiographic Determination of Para-aortic Lymph Node Metastases Before Chemoradiation for Locally Advanced Cervical Carcinoma: A Gynecologic Oncology Group Study*. *Cancer* 2008; 112: 1954–1963.
- [128] Marnitz S, Martus P, Köhler C, Stromberger C, Asse E, Mallmann P, Schmidberger H, Affonso Júnior RJ, Nunes JS, Sehouli J, Budach V. *Role of Surgical Versus Clinical Staging in Chemoradiated FIGO Stage IIB-IVA Cervical Cancer Patients - Acute Toxicity and Treatment Quality of the Uterus-11 Multicenter Phase III Intergroup Trial of the German Radiation Oncology Group and the Gynecologic Cancer Group*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2016; 94: 243–253.
- [129] Lukesova E, Boucek J, Rotnaglova E, Salakova M, Koslabova E, Grega M, Eckschlager T, Rihova B, Prochazka B, Klozar J, Tachezy R. *High Level of Tregs Is a Positive Prognostic Marker in Patients with HPV-Positive Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinomas*. *BioMed Research International* 2014; 2014: 1–11.
- [130] Green VL, Michno A, Stafford ND, Greenman J. *Increased prevalence of tumour infiltrating immune cells in oropharyngeal tumours in comparison to other subsites:*

relationship to peripheral immunity. Cancer Immunol Immunother 2013; 62: 863–873.

- [131] Punt S, van Vliet ME, Spaans VM, de Kroon CD, Fleuren GJ, Gorter A, Jordanova ES. *FoxP3⁺ and IL-17⁺ cells are correlated with improved prognosis in cervical adenocarcinoma.* Cancer Immunol Immunother 2015; 64: 745–753.
- [132] Jordanova ES, Gorter A, Ayachi O, Prins F, Durrant LG, Kenter GG, van der Burg SH, Fleuren GJ. *Human Leukocyte Antigen Class I, MHC Class I Chain-Related Molecule A, and CD8⁺/Regulatory T-Cell Ratio: Which Variable Determines Survival of Cervical Cancer Patients?* Clin Cancer Res 2008; 14: 2028–2035.
- [133] Shah W, Yan X, Jing L, Zhou Y, Chen H, Wang Y. *A reversed CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes and a high percentage of CD4⁺FOXP3⁺ regulatory T cells are significantly associated with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the cervix.* Cell Mol Immunol 2011; 8: 59–66.
- [134] Piersma SJ, Jordanova ES, van Poelgeest MIE, Kwappenberg KMC, van der Hulst JM, Drijfhout JW, Melief CJM, Kenter GG, Fleuren GJ, Offringa R, van der Burg SH. *High Number of Intraepithelial CD8⁺ Tumor-Infiltrating Lymphocytes Is Associated with the Absence of Lymph Node Metastases in Patients with Large Early-Stage Cervical Cancer.* Cancer Res 2007; 67: 354–361.
- [135] Shang B, Liu Y, Jiang SJ, Liu Y. *Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3⁺ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis.* Sci Rep 2015; 5: 15179.
- [136] Qinfeng S, Depu W, Xiaofeng Y, Shah W, Hongwei C, Yili W. *In Situ Observation of the Effects of Local Irradiation on Cytotoxic and Regulatory T Lymphocytes in Cervical Cancer Tissue.* Radiat Res 2013; 179: 584–589.
- [137] Battaglia A, Buzzonetti A, Martinelli E, Fanelli M, Petrillo M, Ferrandina G, Scambia G, Fattorossi A. *Selective Changes in the Immune Profile of Tumor-Draining Lymph Nodes After Different Neoadjuvant Chemoradiation Regimens for Locally Advanced Cervical Cancer.* Int J Radiat Oncol Biol Phys 2010; 76: 1546–1553.
- [138] Battaglia A, Buzzonetti A, Monego G, Peri L, Ferrandina G, Fanfani F, Scambia G, Fattorossi A. *Neuropilin-1 expression identifies a subset of regulatory T cells in*

- human lymph nodes that is modulated by preoperative chemoradiation therapy in cervical cancer. Immunology* 2008; 123: 129–138.
- [139] Whiteside TL. *What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why? Semin Cancer Biol* 2012; 22: 327–334.
- [140] Schmidt MA, Förtsch C, Schmidt M, Rau TT, Fietkau R, Distel LV. *Circulating regulatory T cells of cancer patients receiving radiochemotherapy may be useful to individualize cancer treatment. Radiother Oncol* 2012; 104: 131–138.
- [141] Wu MY, Kuo TY, Ho HN. *Tumor-infiltrating lymphocytes contain a higher proportion of FOXP3⁺ T lymphocytes in cervical cancer. J Formos Med Assoc* 2011; 110: 580–586.
- [142] Chaudhary B, Elkord E. *Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment and Cancer Progression: Role and Therapeutic Targeting. Vaccines (Basel)* 2016; 4: 28.
- [143] Skeate JG, Woodham AW, Einstein MH, Da Silva DM, Kast WM. *Current therapeutic vaccination and immunotherapy strategies for HPV-related diseases. Hum Vaccin Immunother* 2016; 12: 1418–1429.
- [144] Lee SJ, Yang A, Wu TC, Hung CF. *Immunotherapy for human papillomavirus-associated disease and cervical cancer: review of clinical and translational research. J Gynecol Oncol* 2016; 27: e51.
- [145] Buchbinder EI, Desai A. *CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. Am J Clin Oncol* 2016; 39: 98–106.
- [146] Tuve S, Chen BM, Liu Y, Cheng TL, Touré P, Sow PS, Feng Q, Kiviat N, Strauss R, Ni S, Li ZY, Roffler SR, Lieber A. *Combination of Tumor Site-Located CTL-Associated Antigen-4 Blockade and Systemic Regulatory T-Cell Depletion Induces Tumor-Destructive Immune Responses. Cancer Res* 2007; 67: 5929–5939.
- [147] Loddenkemper C, Hoffmann C, Stanke J, Nagorsen D, Baron U, Olek S, Huehn J, Ritz JP, Stein H, Kaufmann AM, Schneider A, Cichon G. *Regulatory (FOXP3⁺) T cells as target for immune therapy of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. Cancer Science* 2009; 100: 1112–1117.
- [148] Liu S, Sun X, Luo J, Zhu H, Yang X, Guo Q, Song Y, Sun X. *Effects of radiation on T regulatory cells in normal states and cancer: mechanisms and clinical implications. Am J Cancer Res* 2015; 5: 3276–3285.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Elvira Katrin Siewert, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Untersuchung der regulatorischen T-Zellen als Prognosefaktor bei der Behandlung von Patientinnen mit einem primären Zervixkarzinom und einer primär kombinierten Radiochemotherapie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „*Uniform Requirements for Manuscripts* (URM)“ des ICMJE-www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Elvira Siewert

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Ingeborg Tinhofer-Keilholz für die Bereitstellung des Themas und ihre wissenschaftliche Betreuung mit den neuen Anregungen und Ideen und den wertvollen Diskussionen bei der Bearbeitung des Themas. Allen Mitarbeitern des strahlenbiologischen Labors und allen Beteiligten aus der Klinik für Radioonkologie und Strahlentherapie der Charité bin ich sehr dankbar für die Unterstützung sowie die angenehme und konstruktive Zusammenarbeit. Dabei möchte ich die anhaltende Hilfestellung sowohl methodischer als auch wissenschaftlicher Art von Robert Konschak und die enge Zusammenarbeit im Labor mit meinem ehemaligen Mitdoktoranden Herrn Nils Alexander Steinhorst hervorheben. Frau Prof. Dr. Simone Marnitz-Schulze danke ich für ihre fachliche Unterstützung insbesondere bei klinischen Fragen. Außerdem gilt mein Dank Herrn Dr. Konrad Neumann für die zielgerichtete statistische Beratung.

Besonders möchte ich an dieser Stelle auch meiner Familie, Robert und Katrin Siewert und meinem Freund Patrick Reinhold, für die unermüdliche Stärkung und Motivierung sowie die mehrfachen Durchsichten dieser Arbeit danken. Derselbe Dank geht an Freunde, mit denen ein wissenschaftlicher und persönlicher Austausch bestand.