

Aus der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Michael Roden

Funktionsbereich Spezielle Endokrinologie

Ärztlicher Leiter: Univ.-Prof. Dr. Matthias Schott

Mechanismen der Antitumorimmunität bei papillärem Schilddrüsenkarzinom und deren Einfluss auf den klinischen Verlauf

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Anne Konstanze Charlotte Kuebart

(2020)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Matthias Schott

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Andreas Krieg

Meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Margret Ehlers,* Anne Kuebart,* Hubertus Hautzel, Juergen Enczmann, Anna-Carina Reis, Matthias Haase, Stephanie Allelein, Till Dringenberg, Christine Schmid und Matthias Schott (2016), *Epitope-Specific Antitumor Immunity Suppresses Tumor Spread in Papillary Thyroid Cancer. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, (102) 2154-2161

* geteilte Erstautorenschaft

Zusammenfassung

Das papilläre Schilddrüsenkarzinom (PTC von „*papillary thyroid carcinoma*“) zählt zu den differenzierten Schilddrüsenkarzinomen und zeigt weltweit eine steigende Inzidenz. Lymphozytäre Infiltrationen im Tumorparenchym sowie Begleitthyreoiditiden beeinflussen den klinischen Verlauf des PTCs scheinbar positiv, daher rückt aktuell v.a. die Erforschung immunologischer Vorgänge dieses Malignoms in den Fokus. Um das therapeutische Potenzial dieser körpereigenen Antitumorimmunität zu evaluieren ist es unabdingbar, zugrunde liegende Mechanismen und Abhängigkeiten von patientenspezifischen Faktoren zu erfassen.

Zytotoxische T-Zellen (CTLs, von „*Cytotoxic T Lymphocytes*“) gelten durch ihre Fähigkeit, Tumorzellen zu lysieren, als wichtige Vermittler von Antitumorimmunität. In dieser Arbeit wurde Blut von PTC-Patienten daher auf das Vorliegen von Schilddrüsen-spezifischen CTLs untersucht. Dazu wurden mittels Nutzung der Datenbank SYFPEITHI je drei Epitope der Schilddrüsen-spezifischen Proteine Thyreoglobulin (TG1-3) und Thyreoperoxidase (TPO1-3) ausgewählt, die hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens an MHC-Moleküle als hoch immunogen betrachtet werden können. Das Vorkommen dieser, für die o.g. Epitope spezifischen, CTLs bei PTC-Patienten wurde anschließend mittels Tetrameranalysen quantitativ erfasst. Anschließend wurde das Proliferationsverhalten dieser spezifischen CTLs nach Inkubation mit den o.g. Epitopen erfasst. Der Einfluss individueller Patientenmerkmale auf Antitumorimmunität wurde mittels HLA-DR und -DQ Typisierung des PTC-Kollektivs geprüft und mit den klinischen Verläufen der PTCs korreliert. Ferner erfolgten allgemeine Blutanalysen der T-Zellsubpopulationen von PTC-Patienten, Hashimoto Thyreoiditis Patienten und Kontrollen (HP von „*healthy patient*“) zur Erstellung eines detaillierten immunologischen Profils.

Die Ergebnisse aus den oben beschriebenen Analysen lassen sich in fünf Kernaussagen zusammenfassen. Erstens konnten erstmalig Schilddrüsen-spezifische CTLs bei PTCs nachgewiesen werden. Zweitens zeigen die Schilddrüsen-spezifischen CTLs ein HLA-abhängiges Proliferationsverhalten. Drittens zeigt auch der klinische Verlauf der PTCs eine Abhängigkeit von zugrundeliegenden HLA-Allelen. Diese Ergebnisse zusammenfassend ist eine negative Korrelation von Proliferationsfähigkeit der CTLs und Prävalenz von Organmetastasen erkennbar. HLA-DQB1*03 positive PTC-Patienten zeigen stärker proliferierende CTLs und weisen signifikant weniger Fernmetastasen auf als PTC-Patienten ohne dieses Merkmal ($p < 0,05$). Dementgegen weisen DRB1*03 positive PTC-Patienten sowohl deutlich schwächer proliferierende CTLs als auch häufiger Fernmetastasen ($p < 0,05$) auf, verglichen mit DRB1*03 negativen PTC-Patienten. So lässt sich viertens eine von den Schilddrüsen-spezifischen CTLs ausgehende zentrale protektive Rolle hinsichtlich der Ausbildung von Organmetastasen postulieren. Fünftens zeigt die außerdem durchgeführte T-Zellsubpopulationsanalyse zahlreiche Unterschiede zwischen PTC-Patienten und Kontrollen, insbesondere zeigen PTC-Patienten signifikant erhöhte Anteile regulierender T-Zellen (Treg-Zellen) im Blut ($p < 0,001$).

Die hier erlangten Ergebnisse sind insofern von klinischer Relevanz, als dass der HLA-Genotyp DQB1*03, durch seine signifikante Assoziation mit epitopspezifischer Antitumorimmunität und verbessertem klinischen Verlauf, zukünftig als relevantes Prognosekriterium fungieren könnte. Die hier nachgewiesene positive Korrelation von epitopspezifischen CTLs und verbessertem *Outcome* bietet außerdem die Grundlage, gewebsspezifische CTLs bei PTCs hinsichtlich ihres therapeutischen Nutzens weiter zu evaluieren, z.B. im Sinne eines adoptiven Zelltransfers bzw. einer dendritischen Zelltherapie. Angesichts der außerdem mittels T-Zellsubpopulationsanalyse nachgewiesenen signifikant erhöhten Treg Zell-Level kann insbesondere *Checkpoint*-Inhibitoren durch ihre hemmenden Wirkungen gegenüber regulierenden T-Zellen und der Stimulation epitopspezifischer T-Zellen eine therapeutische Effizienz bei bislang therapieresistenten PTCs attribuiert werden.

Summary

Papillary Thyroid cancer (PTC) is the most common thyroid malignancy. In recent years, the incidence has increased alarmingly worldwide. As PTC's immunological characteristics like lymphoid infiltrations and accompanying thyroiditis seem to influence its clinical outcome positively, this response of the immunological system is assumed to represent antitumor immunity. To elucidate whether a therapeutically induced enhancement of this antitumor immunity might be beneficial, it is necessary to obtain precise insights of its underlying mechanisms and their dependencies of patient-specific factors.

A potential mechanism of antitumor immunity is the recognition and destruction of tumor cells by cytotoxic T lymphocytes (CTLs). To examine the blood of PTC patients in respect to thyroid specific CTLs, the data base SYFPEITHI was used to determine highly immunogenic epitopes of the thyroid-specific proteins thyroperoxidase (TPO) and thyroglobulin (Tg) regarding their binding tendency towards major histocompatibility complexes. The occurrence of CTLs specific for these six thyroid specific epitopes (TPO1-3 and Tg1-3) were determined by tetramer analysis. Subsequently, the proliferation of these CTLs was tested after incubation with thyroid specific epitopes. HLA-DR and -DQ typing was used to determine the impact of individual factors on antitumor immunity. Additionally, to evaluate general immunological influences of PTC, T Cell subpopulations were analyzed from the blood of PTC patients, Hashimoto thyroiditis patients and controls.

Five main results were obtained out of these conducted experiments. Firstly, for the first time, CTLs recognizing specifically TPO or thyroglobulin Tg epitopes were detected in PTC patients. Secondly, the proliferation of thyroid-specific CTLs after stimulation with TPO or Tg epitopes was shown to be dependent on HLA genotype. Thirdly, HLA alleles, in detail DRB1*03 and DQB1*03, were also found to influence the clinical course of PTCs. Taken together these three results, a negative correlation of proliferation ability of thyroid-specific CTLs and the occurrence of distant metastases was observed. HLA-DQB1*03 positive PTC patients show higher proliferation levels and less distant metastases compared to PTC patients missing this allelic variant. In contrast, CTLs of DRB1*03 positive PTC patients proliferate distinctly less than patients without this allele. However, distant metastases are occurring significantly more often in PTCs of DRB1*03 positive patients ($p < 0,05$). Fourthly, considering this negative correlation of CTLs' proliferation capacity and the occurrence of distant metastases, it can be supposed that responsiveness of CTLs to thyroid epitopes is a crucial antitumor immunity mechanism to prevent distant metastases. Fifthly, regarding the T cell subpopulations profile of PTC patients, results are demonstrating multiple differences compared to controls. Especially regulatory T cells (Treg) are found to be highly upregulated in PTC patients ($p < 0,001$).

These results are clinically relevant. HLA typing might become a useful prognostic tool as HLA-DQB1*03 is found to be associated with stronger epitope specific antitumor immunity and improved clinical outcome. Based on the verification of epitope-specific T cells and their correlation with improved clinical outcome, the therapeutic use of these tissue-specific T cells can be even considered in relation to new therapeutic strategies, as adoptive cell transfers or dendritic cell therapy. Finally, the results of T cell subpopulation analysis are indicating a promising perspective for checkpoint inhibitors in the therapy of PTC. In particular, the promising potential of CTLA-4 inhibitors as a therapeutic agent in therapy-resistant PTCs should be investigated in future studies as they are known to inhibit Treg cells and have stimulating effects on epitope-specific T cells.

Abkürzungsverzeichnis

| | | |
|--------------------------|-------|---|
| ACT | | <i>adoptive cell transfer</i> |
| Ak | | Antikörper |
| APC | | Allophycocyanin |
| APC-Ak | | Allophycocyanin-Antikörper |
| BRAF | | <i>B-type Raf kinase</i> |
| CD3 | | <i>cluster of differentiation 3</i> |
| CPT TM | | <i>Cell Preparation TubeTM</i> |
| CTL | | zytotoxische T-Zelle von <i>cytotoxic T Lymphocyte</i> |
| CTLA-4 Gen | | <i>Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 Gen</i> |
| CTLA-4-Inhibitor | | <i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4-Inhibitor</i> |
| DN T-Zelle | | Doppelnegative T-Zelle |
| epitopspezifische CTLs | | epitopspezifische zytotoxische T-Zellen |
| Erylyse-Puffer | | Erythrozyten-Lyse-Puffer |
| FACS | | <i>fluorescence activated cell sorting</i> |
| FCS | | <i>fetal calf serum</i> |
| FET | | <i>Fisher's Exact Test</i> |
| FITC | | Fluorescein-Isothiocyanat |
| FITC-Ak | | Fluorescein Isothiocyanat-Antikörper |
| FOXP3 | | <i>Forkhead-Box-Protein P3</i> |
| fsc | | Vorwärtsstreuwinkel von <i>forward scatter</i> |
| FTC | | follikuläres Schilddrüsenkarzinom von <i>follicular thyroid cancer</i> |
| HLA | | humanes Leukozytenantigen |
| HLA-System | | humanes Leukozytenantigen-System |
| HP | | Gesunde Kontrollperson von <i>healthy patient</i> |
| HT | | Hashimoto Thyreoiditis |
| IFN γ | | Interferon- γ |
| Il-10 | | Interleukin-10 |
| Il-15 | | Interleukin-15 |
| Il-17 | | Interleukin-17 |
| Il-2 | | Interleukin-2 |
| Il-4 | | Interleukin-4 |
| Il-7 | | Interleukin-7 |
| KI | | Konfidenzintervall |
| MACS | | <i>magnetic-activated cell sorting</i> |
| MHC | | <i>major histocompatibility complex</i> |
| n.s. | | nicht signifikant |
| NKT-Zelle | | Natürliche Killer-T-Zelle |
| NK-Zelle | | Natürliche Killerzelle |
| OR | | <i>odds ratio</i> |
| PBMCs | | Periphere mononukleäre Blutzellen von <i>peripheral blood mononuclear cells</i> |
| PBS | | Phosphatgepufferte Salzlösung von <i>phosphate buffered saline</i> |
| PD-1 | | <i>programmed cell death protein 1</i> |
| PD-1-Signalweg-Inhibitor | | <i>programmed cell death 1-Signalweg-Inhibitor</i> |
| PE | | Phycoerythrin |
| Pe-Ak | | Phycoerythrin-Antikörper |
| PerCP | | Peridinin Chlorophyll Protein |
| PerCP-Ak | | Peridinin Chlorophyll Protein-Antikörper |
| PTC | | papilläres Schilddrüsenkarzinom von <i>papillary thyroid cancer</i> |
| PTPN22 Gen | | <i>Protein tyrosine phosphatase nonreceptor-Type 22 Gen</i> |
| ssc | | Seitenstreuwinkel von <i>side scatter</i> |
| TAA | | Tumorantigenassoziierte T-Zellen |
| TCR | | T-Zell-Rezeptor von <i>T cell receptor</i> |

| | |
|--------------------|---|
| Tg | Thyreoglobulin |
| Th17-Zellen | T17-Helferzelle |
| Th1-Zellen | T1-Helferzellen |
| Th2-Zellen | T2-Helferzellen |
| Th-Zellen | T-Helferzellen |
| TIM3 | <i>T cell immunoglobulin mucin 3</i> |
| TKI | Tyrosinkinaseinhibitor |
| TNF α | Tumornekrosefaktor α |
| TPO | Thyreoperoxidase |
| Treg-Zellen | regulatorische T-Zellen |
| TSH | Thyreotropin von <i>thyroid-stimulating hormone</i> |
| VEGF | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> |
| Z.n. | Zustand nach |

Inhalt

| | |
|--|-----|
| Zusammenfassung | I |
| Summary | II |
| Abkürzungsverzeichnis | III |
| Inhalt..... | V |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Papilläres Schilddrüsenkarzinom | 1 |
| 1.1.1 Allgemeines | 1 |
| 1.1.2 Risikofaktoren..... | 1 |
| 1.1.3 Pathologie | 3 |
| 1.1.4 Diagnose | 4 |
| 1.1.5 Therapie | 4 |
| 1.2 Autoimmunität bei PTC als Zeichen für Antitumorimmunität | 5 |
| 1.2.1 Erstbeschreibung und Epidemiologie..... | 5 |
| 1.2.2 Hashimoto Thyreoiditis | 6 |
| 1.2.3 Kausale Zusammenhänge der Koinzidenz..... | 7 |
| 1.3 Antitumorimmunität..... | 9 |
| 1.3.1 Die These der Antitumorimmunität..... | 9 |
| 1.3.2 T-Zell-vermittelte Antitumorimmunität | 10 |
| 1.3.3 Antitumorimmunität und epitopspezifische T-Zellen..... | 13 |
| 1.3.4 HLA-abhängige Tumorimmunität | 14 |
| 1.4 Ziele der Arbeit | 15 |
| 2 Material und Methoden | 16 |
| 2.1 Material..... | 16 |
| 2.1.1 Patientenkollektive..... | 16 |
| 2.1.2 Verbrauchsmaterialien..... | 17 |
| 2.1.3 Tetramere..... | 18 |
| 2.1.4 Antikörper | 18 |
| 2.1.5 Puffer und Medien | 20 |
| 2.1.6 Weitere Substanzen | 20 |

| | | |
|--------|--|----|
| 2.1.7 | Geräte | 21 |
| 2.1.8 | Software | 21 |
| 2.2 | Methoden | 22 |
| 2.2.1 | Gewinnung/Isolation peripherer mononukleärer Zellen | 22 |
| 2.2.2 | HLA-A2 Typisierung..... | 22 |
| 2.2.3 | Analyse der T-Zellsubpopulationen..... | 22 |
| 2.2.4 | Durchflusszytometrie | 23 |
| 2.2.5 | Auswertung der T-Zellsubpopulationsanalyse..... | 24 |
| 2.2.6 | Identifikation regulatorischer T-Zellen mittels intrazellulärer Färbung..... | 25 |
| 2.2.7 | Tetrameranalyse zur Bestimmung Schilddrüsen-spezifischer T-Zellen | 26 |
| 2.2.8 | Stimulation zytotoxischer T-Zellen mit Schilddrüsen-spezifischen Epitopen.... | 26 |
| 2.2.9 | Ki-67 Proliferationsanalyse | 27 |
| 2.2.10 | HLA-Typisierung..... | 28 |
| 2.2.11 | Statistische Analyse..... | 28 |
| 3 | Ergebnisse..... | 30 |
| 3.1 | HLA-Typisierung der PTC-Patienten..... | 30 |
| 3.2 | T-Zellsubpopulationsanalyse | 33 |
| 3.2.1 | T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen | 33 |
| 3.2.2 | Verhältnisse der T-Helferzellen..... | 35 |
| 3.2.3 | Regulatorische T-Zellen..... | 36 |
| 3.2.4 | Erschöpfte T-Zellen | 36 |
| 3.2.5 | $\Gamma\delta$ T-Zellen | 38 |
| 3.3 | Schilddrüsen-spezifische zytotoxische T-Zellen..... | 39 |
| 3.4 | Proliferation Schilddrüsen-spezifischer T-Zellen | 41 |
| 3.5 | Einfluss des HLA-Phänotyps auf Proliferation Schilddrüsen-spezifischer T-Zellen. | 43 |
| 4 | Diskussion | 48 |
| 4.1 | Protektivität des HLA-DQB1*03 Phänotyps gegenüber Fernmetastasen | 48 |
| 4.2 | PTC beeinflusst T-Zellsubpopulationen signifikant..... | 50 |
| 4.3 | HLA-assoziierte Protektivität durch Schilddrüsen-spezifische T-Zellen | 53 |
| 4.4 | Limitationen | 56 |

| | | |
|-----|---------------------------|----|
| 4.5 | Schlussfolgerung | 58 |
| 4.6 | Ausblick | 59 |
| 5 | Literaturverzeichnis..... | 60 |
| 6 | Anhang | 69 |

1 Einleitung

1.1 Papilläres Schilddrüsenkarzinom

1.1.1 Allgemeines

Das papilläre Schilddrüsenkarzinom (PTC von *papillary thyroid cancer*) gehört zusammen mit dem follikulären Karzinom (FTC von *follicular thyroid cancer*) der Gruppe der differenzierten Schilddrüsenkarzinome an. Die tumorbildenden Zellen des PTCs entwickeln sich aus thyreoidalen Follikelepithelzellen. PTCs zeichnen sich durch langanhaltende klinische Inapparenz aus, viele Befunde sind zum Diagnosezeitpunkt Zufallsbefunde. Insgesamt weisen PTCs mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 95,8% und einer 20-Jahres-Überlebensrate von 87,6% eine sehr gute Prognose auf [1]. Insbesondere hinsichtlich dieser im Vergleich guten Prognose unterscheiden sie sich deutlich von den selteneren und undifferenzierten anaplastischen Karzinomen der Schilddrüse. Epidemiologische Daten zeigen weltweit einen rasanten Anstieg der Schilddrüsenkarzinome, mit einer Inzidenz von z.B. 4,56 auf 14,4 pro 100.000 Einwohner von 1974-2013 in den USA, der hauptsächlich auf das verstärkte Vorkommen von PTCs zurückzuführen ist [2]. Teilweise lässt sich dieser Anstieg auf verbesserte Diagnoseverfahren zurückführen. Zuvor nicht diagnostizierbare inapparente Mikrokarzinome können heutzutage mit zunehmender Verfügbarkeit von Ultraschalluntersuchungen und Feinnadelaspirationen und deren flächendeckenderem Einsatz besser detektiert werden. Die verfügbaren Daten zeigen aber einen Anstieg der Inzidenz unabhängig von der Tumorgröße [2]. Dieser deutet zusammen mit dem verzeichneten leichten Anstieg der Morbidität von 0,4 auf 0,46 pro 100.000 Personenjahre somit auf einen tatsächlichen Anstieg der Inzidenz des PTCs hin [2].

1.1.2 Risikofaktoren

Auf das PTC einwirkende Risikofaktoren können in exogene und endogene Risikofaktoren unterteilt werden. Exogene Risikofaktoren schließen die gesamten Umweltfaktoren ein, die auf das thyreoidale Gewebe einwirken. Endogene beziehen sich hingegen auf körpereigene Prädispositionen und Stoffwechselforgänge (s. Tab1.1).

Ionisierende Strahlung gilt als Hauptrisikofaktor für die Entstehung des PTCs. Sowohl nach direktem Kontakt mit ionisierender Strahlung via medizinischer Diagnostik und Therapien als auch nach verstärkter Aussetzung gegenüber ionisierender Strahlung in der Lebensumgebung wurde über erhöhte Inzidenzen von Schilddrüsenmalignomen, insbesondere PTCs berichtet [3]. Besonders das thyreoidale Gewebe im Kindesalter ist anfällig für die Ausbildung von

Malignomen durch Exposition gegenüber ionisierender Strahlung [4, 5]. Auch der Einfluss weiterer exogener Umweltfaktoren auf die PTC-Entstehung wird diskutiert. Insbesondere die erhöhte Aufnahme von Nitriten gilt als kritisch, da das PTC-Risiko bei Frauen darunter als bis zu doppelt so hoch beschrieben wird [6].

| Exogene Risikofaktoren | Endogene Risikofaktoren |
|-------------------------------------|---|
| Ionisierende Strahlung | Erhöhte Thyreotropin-Level |
| Erhöhte Iodaufnahme | Ggf. Autoimmun-/Hashimoto Thyreoiditis |
| Endokrine Disruptoren (Bisphenol A) | BRAF-Mutation |
| Nitrite | HLA-assoziierte Prädisposition |
| Geographische Besonderheiten | Metabolisches Syndrom, Insulinresistenz |
| Ionisierende Strahlung | Erhöhte Thyreotropin-Level |

Table 1.1 Risikofaktoren des papillären Schilddrüsenkarzinoms Die Risikofaktoren des papillären Schilddrüsenkarzinoms gliedern sich in exogene und endogene Einflüsse

Darüber hinaus stehen endokrine Disruptoren, z.B. Bisphenol A, in Verdacht einen Einfluss auf die Entstehung von PTCs zu nehmen [7]. Die Komplexität der Risikofaktoren wird überdies durch die Beobachtung verdeutlicht, dass u.a. vulkanische Weltregionen zu den Regionen mit der höchsten PTC Inzidenz gehören [8]. Ursächlich dafür werden erhöhte Schwermetallwerte im Trinkwasser diskutiert, die zugrunde liegenden Mechanismen sind derzeit Gegenstand der Forschung [8, 9]. Neben Schwermetallen wird eine erhöhte Iodaufnahme als externer Risikofaktor für die Entstehung eines PTCs diskutiert, da Regionen mit flächendeckender, prophylaktischer Iodaufnahme ein zu Gunsten der PTCs verschobenes Verhältnis von papillären gegenüber follikulären Karzinomen aufweisen [10, 11]. In Regionen mit hoher Iodaufnahme ist zugleich eine hohe Rate an *B-type RAF kinase* Mutationen (BRAF) nachgewiesen, die *per se* als endogener Risikofaktor gilt [12]. Diese für PTC-Patienten typische BRAF Mutation ist zugleich mit schlechterem klinischen *Outcome* vergesellschaftet [12, 13]. In Teilen kontrovers zu einer erhöhten Iodaufnahme als Risikofaktor gilt als weiterer endogener Risikofaktor des PTCs ein erhöhter Thyreotropin-Wert (TSH-Wert) [14, 15]. Vor diesem Hintergrund durchgeführte *in vitro* Studien konnten einen proliferierenden Effekt von TSH auf PTC-Zelllinien zeigen [16]. Die stimulierende Wirkung des TSH scheint auf PTC-Zellen via erhöhte *p21-activated kinases 4* Level zu wirken und so das invasive Potenzial der Krebszellen zu erhöhen [17]. Ob erhöhte TSH-Level einen direkt mutagenen Einfluss auf Thyrozyten ausüben, ist derzeit noch nicht bekannt.

Außer der genetischen Assoziation mit BRAF Mutationen wurden auch Allelvarianten im humanen Leukozytenantigen-System (HLA-System) hinsichtlich prädisponierender Genotypen evaluiert. Die Ergebnisse der diesbezüglich durchgeführten Studien imponieren inhomogen. Eine kürzlich durchgeführte Metaanalyse beschreibt eine signifikante Assoziation von PTCs und dem HLA-Allel DR1. Die große Studienheterogenität der zusammengefassten Studien schränkt die Aussagekraft dieser Beobachtung allerdings ein [18]. Neben erhöhten TSH-Leveln werden weitere Stoffwechseleigenschaften, z.B. Insulinresistenz bzw. das Vorliegen eines metabolischen Syndroms als weitere interne Risikofaktoren für die Entstehung eines PTCs diskutiert, insbesondere bei Frauen [19, 20]. Ein positiver Zusammenhang zwischen erhöhtem *Body Mass Index* und der Aggressivität des vorliegenden PTCs wurde ebenso beschrieben, definiert über fortgeschrittene TNM-Stadien und extrathyreoidale Invasion [21].

Die Rolle der Autoimmunthyreoiditis bei der Pathogenese des PTC ist seit langem Gegenstand der Diskussion und bislang noch nicht abschließend definiert. Autoimmunthyreoiditis und papilläres Schilddrüsenkarzinom treten bei Patienten oft parallel auf. Ob eine Autoimmunthyreoiditis das Entstehen eines PTC durch fortwährende lokale Entzündungsprozesse begünstigt, oder ob sie im Sinne einer Antitumorimmunität eine protektive Rolle gegen entartete Zellen einnimmt, wird in der Literatur weiterhin diskutiert (s. Tab. 1.3).

1.1.3 Pathologie

Das PTC wird in verschiedene Subtypen unterteilt, u.a. in eine großzellige Variante, eine diffus-sklerosierende, eine solide und eine follikuläre Variante. Sie weisen jeweils Unterschiede in Wachstumsverhalten, Prävalenz und *Outcome* auf. Die Lokalisation der PTCs im thyreoidalen Stroma ist variabel. Die durchschnittliche Tumorgöße liegt zwischen zwei bis drei Zentimetern [22]. Tumore sind von fester Konsistenz und können zystische Anteile sowie Kalzifikationen aufweisen [22]. Durch Invasion der Lymphgefäße treten multifokale PTCs sowie regionale Lymphknotenmetastasen auf [22]. Die Infiltration von venösen Gefäßen ist nicht typisch für diese Tumorentität. Studien weisen auf progredientere Vorgänge und somit aggressivere Varianten bei Vorliegen von intra- oder extrathyreoidalen Gefäßinvasionen hin [23]. Bei 5-7% der PTC-Patienten ist das Auftreten von Fernmetastasen beschrieben [22]. Charakteristisch für das papilläre Schilddrüsenkarzinom ist die Infiltration lymphatischer Zellen in tumorös verändertes Parenchym. Bei ca. 58% der PTCs werden lymphatische Infiltrate im Tumorgewebe beobachtet, während nur 20% der FTCs diese Infiltrate aufweisen [24].

1.1.4 Diagnose

Der Großteil der papillären Schilddrüsenkarzinome wird durch Routineuntersuchungen *via* Schilddrüsenultraschall diagnostiziert und mittels Szintigraphie und Feinnadelpunktion weiter risikostratifiziert. Selten liegen zum Diagnosezeitpunkt bereits klinisch manifeste Symptome wie Heiserkeit, Schluckstörungen, Umfangszunahme des Halses oder symptomatische zervikale Lymphknotenmetastasen vor. Die Diagnosesicherung erfolgt nach chirurgischer Ablation des Tumors durch histopathologische Examination des Tumorgewebes. Neben der TNM Klassifikation (Tumorstadium T1-T4b; Lymphknotenstatus N0-N1b; Metastasenstatus M0/M1) ist vor allem das Alter der Patienten prognostisch relevant (s. Tab.1.2) [25, 26].

| Alter bei Diagnosezeitpunkt | Tumorstatus | Lymphknotenstatus | Metastasenstatus | Tumorstadium |
|-----------------------------|-------------|-------------------|------------------|--------------|
| < 55 Jahren | Jegliches T | Jegliches N | M0 | I |
| | Jegliches T | Jegliches N | M1 | II |
| > 55 Jahren | T1 | N0 / NX | M0 | I |
| | T1 | N1 | M0 | II |
| | T2 | N0 / NX | M0 | I |
| | T2 | N1 | M0 | II |
| | T3a / T3b | Jegliches N | M0 | II |
| | T4a | Jegliches N | M0 | III |
| | T4b | Jegliches N | M0 | IVA |
| | Jegliches T | Jegliches N | M1 | IVB |

Tabelle 1.2 Staging Kriterien Staging Kriterien des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms nach TNM Klassifikation. Die hier aufgeführten Staging Kriterien wurden definiert durch das American Joint Committee on Cancer [26]

1.1.5 Therapie

Die chirurgische Resektion des PTCs ist vordringliches Therapieziel. Das Ausmaß der Resektion ist dabei primär abhängig von der Größe des Tumors, von dessen Lage (intra- vs. extrathyreoidale Lage), sowie von weiteren Tumormerkmalen, u.a. Gefäßinvasivität und Metastasenstatus. Bei solitären Mikrokarzinomen (PTC < 10mm) ist die Tumorablation mittels Hemithyreoidektomie möglich, bei allen größeren PTCs wird eine totale Thyreoidektomie empfohlen [27]. Eine zentrale Lymphknotendissektion sollte bei prognostisch ungünstigem Befund erfolgen. Ebenso sollten prä- bzw. intraoperativ diagnostizierte

Lymphknotenmetastasen mittels Lymphknotendisektion des betroffenen Kompartiments zur Risikoreduktion eines Lokalrezidivs entfernt werden [27]. Eine adjuvante Radioiodtherapie wird insbesondere in Deutschland standardmäßig empfohlen (Mikrokarzinome ausgenommen), mit dem Ziel, lokal verbliebenes bzw. metastatisch vorhandenes Schilddrüsengewebe zu eliminieren [28].

Niedrig differenzierte Karzinome mit eingeschränktem Iodmetabolismus zeigen sich nach Radioiodtherapie häufig therapierefraktär. Die Therapieoptionen dieser Entität galten lange Zeit als sehr eingeschränkt. Mittlerweile kann eine Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) erwogen werden, für die bei PTCs allerdings noch kein signifikanter Überlebensvorteil nachgewiesen werden konnte [27]. Allerdings können Nebenwirkungen der TKI-Therapie wie beispielsweise Hypertension, Fatigue, Hepatotoxizität, Geschmacksverlust und Gewichtsabnahme die Lebensqualität der Patienten deutlich einschränken [27]. Bei diesem ernstzunehmenden Nebenwirkungsprofil besteht aktuell die Empfehlung, TKI nur bei spezifischen Symptomen nach individueller Abwägung anzuwenden [27].

Diese bisher noch eingeschränkten Therapieoptionen der radioiodrefraktären PTCs machen insbesondere die Entwicklung neuer, alternativer Behandlungsstrategien notwendig. Aufgrund der im folgenden Abschnitt näher erläuterten Assoziation von PTCs mit Autoimmunthyreoiditiden, die prognostisch einen begünstigenden Effekt zu haben scheinen, werden daher aktuell Immunotherapeutika im Sinne von *Checkpointinhibitoren* als neue Therapieoption diskutiert und ihre Anwendbarkeit aktuell in Phase I Studien geprüft [29].

1.2 Autoimmunität bei PTC als Zeichen für Antitumorimmunität

1.2.1 Erstbeschreibung und Epidemiologie

Die Hypothese einer vorliegenden Antitumorimmunität bei PTCs gründet sich auf die vermehrt nachweisbaren lymphozytären Infiltrationen im Tumorparenchym, sowie das simultane Auftreten von Hashimoto Thyreoiditis und Schilddrüsenmalignomen. Das Phänomen dieser Komorbiditäten beschrieben Dailey *et al.* erstmals 1955. Sie beobachteten Autoinflammation im Sinne einer Hashimoto Thyreoiditis bei 17,7 % der PTC-Patienten [30]. In der Folge beschrieben viele Studien Zusammenhänge zwischen diesen beiden Schilddrüsenpathologien, mit zum Teil erheblich divergierenden Ergebnissen die Häufigkeit des simultanen Auftretens betreffend [31]. In einer kürzlich durchgeführten Metaanalyse wird ein simultanes Auftreten von PTC und HT bei ca. 23% beschrieben [32].

1.2.2 Hashimoto Thyreoiditis

Die Hashimoto Thyreoiditis (chronisch lymphozytäre Thyreoiditis, HT) stellt die häufigste Autoimmunerkrankung der Schilddrüse dar [33]. Haku Hashimoto beschrieb 1912 erstmalig das „*Struma lymphomatosa*“ mit charakteristischer Lymphozyteninfiltration und parenchymatöser sowie interstitieller Veränderung, einhergehend mit einer derben Konsistenz der Schilddrüse [34].

Bezüglich der Prävalenz existieren Unterschiede je nach Ethnie, Geschlechterverteilung und geographischer Lage der betrachteten Bevölkerung. In deutschen Regionen liegt die Prävalenz bei ca. 1,2 % [35]. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem vierzigsten und sechzigsten Lebensjahr, übereinstimmend liegt der Höhepunkt der Serumpositivität thyreoidaler Antikörper in diesem Altersintervall [36]. Einheitlich zeigen die Studien eine vielfach höhere Inzidenz bei Frauen [37]. Pathogenetisch ist bekannt, dass infiltrative und humorale Immunreaktionen eine lokale Inflammationsreaktion provozieren. Diese Inflammationsreaktion bedingt eine Destruktion der Thyreozyten und resultiert regelhaft in einer funktionellen Störung im Sinne einer Hypothyreose mit systemischen Symptomen wie u.a. Abgeschlagenheit, Leistungsknick, Gewichtszunahme und verstärkter Kälteintoleranz.

Die Diagnose der HT erfolgt bei entsprechender klinischer Symptomatik mittels Nachweises von Autoantikörpern und sonographischer Beurteilung des Schilddrüsenparenchyms [38]. Die, bei der HT typischerweise nachweisbaren Autoantikörper richten sich gegen die Proteine Thyreoperoxidase (TPO) und Thyreoglobulin (Tg). TPO ist ein transmembranäres Enzym. Es katalysiert den entscheidenden Schritt der Thyroxin- und Triiodthyroninproduktion, die Iodierung des Thyreoglobulins. Tg ist hingegen ein intraluminales Schilddrüsenprotein, das hauptsächlich der Speicherung der Schilddrüsenhormone dient. Als weiteres Diagnosemittel wird die Schilddrüsenultraschalluntersuchung eingesetzt. Dabei deutet ein echoarmes Schilddrüsenparenchym auf eine vorliegende HT hin [39].

Der ätiologische Hintergrund der HT ist bisher nicht vollständig evident. Familiäre Häufungen der HT deuten auf genetische Disposition bzw. auf für die Erkrankung prädisponierende Genotypen hin [33]. Diese können in Verbindung mit weiteren Risikofaktoren zu einem ‚*loss of tolerance*‘ des Immunsystems gegenüber der Schilddrüse führen und somit die Autoimmunerkrankung bedingen [40].

Die HT, wie ein Großteil der Autoimmunkrankheiten, ist mit spezifischen humanen Leukozytenantigen-Genotypen (HLA-Genotypen) assoziiert [41]. Die bislang mit kaukasischen HT-Patientenkollektiven assoziierten HLA-Genotypen zeigen einen Zusammenhang zwischen atrophischer HT und HLA-DRw3 [42], strumatöser HT und HLA-DR5 [43], sowie eine Assoziation der HT mit u.a. HLA-DR4 [44], -DRB1*04, -DQw7 und -DQB1*0301 [44, 45], -

DQA1*0301/2 [45] und -DQ7 [46] mit einem bis zu 4,7fach erhöhten relativen Risiko. Weitere, immunologisch relevante Gene, mit deren Polymorphismen eine Assoziation zur HT gezeigt wurde, sind u.a. das *cytotoxic T lymphocyte antigen-4* Gen (CTLA-4 Gen) [47], sowie das *protein tyrosine phosphatase nonreceptor-Type 22* Gen (PTPN22 Gen) [48]. Neben den genetischen Faktoren stehen Umweltfaktoren in der Diskussion, die Pathogenese der HT zu beeinflussen. Eine erhöhte Iodzufuhr [49], Hepatitis C-Infektionen, sowie das u.a. zur medikamentösen Therapie der Hepatitis C eingesetzte Interferon α [50, 51] und das bei der Therapie des malignen Melanoms eingesetzte Interleukin-2 [52] sind bisher mit vermehrtem Auftreten einer HT assoziiert.

Ein kurativer Ansatz der Hashimoto Thyreoiditis konnte bisher nicht entwickelt werden. Patienten, die sukzessive eine Hypothyreose entwickeln, werden bislang durch dauerhafte Substitution von Schilddrüsenhormonen in einen euthyreoten Stoffwechszustand geführt.

1.2.3 Kausale Zusammenhänge der Koinzidenz

PTC und Hashimoto Thyreoiditis weisen als Gemeinsamkeit starke lymphozytäre Infiltrationen im Parenchym auf. Die Beobachtung, dass papilläre Schilddrüsenkarzinome und Hashimoto Thyreoididen signifikant häufiger gemeinsam auftreten als andere thyreoidale Pathologien, lässt folgende Hypothesen zu:

- I. Lokalinflammatorische Vorgänge einer HT wirken prokarzinogen hinsichtlich PTCs.
- II. Eine HT bei präexistentem PTC ist Ausdruck von Antitumorimmunität.

Beide Hypothesen werden von aktuellen Studien weiterhin unterstützt (Tab1.3). Einerseits wird der Hashimoto Thyreoiditis eine prokarzinogene Wirkung auf das thyreoidale Struma zugesprochen [53, 54]. Diese Annahme beruht u.a. auf der Beobachtung einer signifikant erhöhten Inzidenz von Inzidentalkarzinomen in chronisch lymphatisch inflammatorisch verändertem Schilddrüsenparenchym. Chronische Inflammationen sind bei diversen Malignomen bereits anerkannte Risikofaktoren [55]. Im Fall des PTCs ist anzumerken, dass die bloße Beschreibung eines vermehrten Vorliegens des PTCs in HT veränderten Schilddrüsen den Aspekt der zeitlichen Entwicklung dieser beiden Pathologien nicht berücksichtigt. Da PTCs zu einem sehr langsamen Wachstum tendieren, ist es nicht auszuschließen, dass die Entwicklung einer HT als Reaktion auf ein bereits vorliegendes, latentes Mikrokarzinom folgt.

Im Gegensatz zur prädisponierenden Hypothese steht die Beobachtung, dass PTC-Patienten mit begleitender HT kleinere Tumore, geringere Invasivität, weniger Lymphknotenmetastasen und eine geringere Rate an Rezidiven aufweisen. Ein von einer HT begleitetes PTC weist klinisch eine verbesserte Prognose auf [56-58]. Dadurch lassen sich der HT ebenso protektive

Eigenschaften im Sinne einer durch sie verkörperte Antitumorimmunität zuordnen. Einschränkend muss an diesem Punkt berücksichtigt werden, dass PTCs aus unterschiedlichen Kausalitäten entstehen (s.o. Tab. 1.1.). Differierende Kausalitäten können Karzinome hervorrufen, die sich hinsichtlich ihrer Charakteristika unterscheiden. Ein sich ggf. auf dem Boden einer HT entwickelndes PTC könnte *per se* eine geringere Invasivität aufweisen als ein hereditäres oder durch exogene Einflüsse bedingtes PTC.

| Autor | n | HT vermittelte Antitumorimmunität | Prokarzinogener Einfluss der HT | Kein prognostischer Einfluss der HT |
|----------------------------------|----------|---|--|--|
| Song et al. 2018 [57] | 1369 | Verbesserte Prognose, weniger Persistenz/ Rekurrenz des Karzinoms | | |
| Liang et al. 2017 [56] | 1392 | Verbesserte Prognose, geringere Tumorgröße, weniger LNM | | |
| Selek et al. 2017 [58] | 577 | Geringeres Tumorstadium | | |
| Carvalho et al. 2017 [59] | 633 | | | Kein Einfluss auf Tumorrekurrenz |
| Zhu F et al. 2016 [60] | 277 | Geringere Anzahl von zentralen LNM | | |
| Zhu Y et al. 2016 [61] | 1276 | Geringere Inzidenz lateraler und zentraler LNM | | |
| Baser et al. 2015 [62] | 919 | Bei PTMC seltener Kapselinvasion, extrathyroidale Ausbreitung und LNM | | PTCs unabhängig der Größe zeigen keine histopatholog. Unterschiede |
| Iliadou et al. 2015 [63] | 108 | | Tendenz zu aggressiverem Wachstumsverhalten im Kindesalter | |
| Park et al. 2015 [64] | 653 | | | Kein Einfluss auf Tumorstadium, LNM |

Tabelle 1.3 Literaturübersicht Die hier aufgeführten Publikationen evaluieren den Einfluss einer Hashimoto Thyreoiditis (HT) auf ein vorliegendes papilläres Schilddrüsenkarzinom (PTC) bzw. papilläres Mikrokarzinom (PTMC), u.a. hinsichtlich Tumorgröße und Lymphknotenmetastasen (LNM). Aktuell unterstützt der Großteil der Publikationen die These der Antitumorimmunität und demnach einen positiven Einfluss der HT

Die beiden zunächst divergent wirkenden Annahmen des prädisponierenden, bzw. des protektiven Einflusses der HT lassen sich durch eine weitere Hypothese zusammenführen. Es ist zu prüfen, ob die Einflüsse dieser beiden Erkrankungen aufeinander von patientenspezifischen Attributen, wie u.a. HLA-Profilen abhängig sind. Somit ließe sich die Rolle der HT im Rahmen des PTCs weder als generell protektiv noch karzinogen ansehen, vielmehr wäre sie abhängig von den individuellen Voraussetzungen prokarzinogen oder protektiv.

Im Hinblick darauf, dass überwiegend von einer Verbesserung der Prognose von PTC-Patienten durch (HT-) Lymphozyteninfiltrationen berichtet wird, ist es letztendlich sowohl von klinischer als auch von therapeutischer Relevanz zu erforschen, ob Antitumorimmunitätsmechanismen nachweisbar sind und durch welche Mechanismen diese Protektivität vermittelt wird. Des Weiteren sollte die Frage nach individuellen Patientenspezifika beantwortet werden, die potenziell Einfluss auf die intrathyroidalen immunologischen Vorgänge nehmen können, z.B. HLA-Genotypen.

Der Nachweis antitumorimmunologischer Vorgänge als endogene Malignitätsabwehrmechanismen bei Patienten ließe in der Folge die Übertragung von bei anderen Malignomen bereits etablierten immuno-onkologischen Therapieansätzen zu. Diese Therapien zielen via Beeinflussung von Immunoregulationsmechanismen auf eine Verstärkung der Antitumorimmunität. Vielversprechend sind in dieser Hinsicht v.a. sogenannte Immuncheckpoint-Inhibitoren, z.B. *cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4*-Inhibitoren (CTLA-4-Inhibitoren) und *programmed cell death 1*-Signalweg-Inhibitoren (PD1-Inhibitoren) [65].

1.3 Antitumorimmunität

1.3.1 Die These der Antitumorimmunität

Die These der Antitumorimmunität gründet sich auf das Konzept der *immune surveillance* [66]. Diese Theorie basiert auf der Annahme, dass das menschliche Immunsystem, darunter auch T-Zellen, neben der Abwehr von körperfremden Pathogenen auch Tumorzellen als solche identifizieren kann und sie mittels Immunabwehrmechanismen eliminiert. Paul Ehrlich postulierte bereits 1909, dass der menschliche Körper über einen durch Zellen vermittelten Abwehrmechanismus verfügt, der neoplastische Zellen daran hindert, sich in Karzinome zu entwickeln [67]. Er gilt somit als einer der ersten Beschreiber der *immune surveillance* [68]. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass einige Malignome mit Lymphozyteninfiltrationen im Tumorgewebe eine signifikant bessere Prognose aufweisen als Malignome gleichen Stadiums

ohne Infiltrationen [69]. Dies spricht für einen immunologisch vermittelten hemmenden Einfluss auf das Tumorgewebe. Die Tumordinfiltration durch T-Zellen zeigt, dass neoplastische Zellen immunogene Eigenschaften besitzen und in der Lage sind, eine Immunantwort zu generieren. Indes gelten chronisch inflammatorische Vorgänge als Risikofaktoren gegenüber Karzinomen [70]. Inwiefern die beim PTC beobachteten Infiltrationen somit pro- oder antikanzerogen sind, scheint u.a. durch das Vorhandensein verschiedenster T-Zellsubpopulationen bzw. ihr Verhältnis zueinander beeinflusst zu werden. Die Frage nach einzelnen Tumorummunitätsmechanismen ist insofern komplex, als dass das Mikromilieu des Tumors malignomspezifisch modulierend auf die einzelnen Leukozyten zu wirken scheint. So wurden einigen Subpopulationen der T-Zellen sowohl die Tumorprogression unterstützende Eigenschaften, als auch antikanzerogenes Potenzial zugesprochen, wobei deren Ausrichtung von den das Mikromilieu beeinflussenden Zytokinen bzw. Chemokinen abhängig zu sein scheint [71]. Insgesamt wird zytotoxischen T-Zellen (CTLs von *cytotoxic T lymphocytes*) mit Kostimulation durch T-Helferzellen (Th-Zelle), sowie natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und natürlichen Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) ein hohes Potenzial zugesprochen, Antitumorummunität zu vermitteln [72].

1.3.2 T-Zell-vermittelte Antitumorummunität

Im Folgenden werden die in diesem Zusammenhang relevanten T-Zellsubpopulationen und ihre Funktionen, insbesondere hinsichtlich Tumorummunitätspotenzial in Bezug auf das PTC, vorgestellt. Allen T-Zellen gemein ist die Ausprägung eines T-Zell-Rezeptors (TCR) und eines *cluster of differentiation 3* (CD3) -Rezeptormoleküls. Dieser TCR besteht im Allgemeinen aus zwei Glykoproteinketten (α/β). Die weitere Unterscheidung der T-Zellen lässt sich anhand des Nachweises unterschiedlicher Oberflächenmoleküle treffen. Je nach Ausprägung weiterer Oberflächenmoleküle erfolgt die weitere Einteilung in Th-Zellen, CTLs, NKT-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen, sowie dysfunktionale T-Zellen, e.g. erschöpfte und anergische T-Zellen.

Th-Zellen exprimieren CD4 und lassen sich weiter in CD183 exprimierende T1-Helferzellen (Th1-Zellen), CD194 exprimierende T2-Helferzellen (Th2-Zellen), Interleukin-17 (IL-17) sekretierende T17-Helferzellen (Th17-Zellen) und IL-10 (IL-10) sekretierende regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen) differenzieren. Th-Zellen tragen durch Sezernierung von Zytokinen zur Stimulation der humoralen Immunantwort bei. Die Subgruppe der Th1-Zellen rekrutiert durch Interferon- γ (IFN γ) vermittelte NK-Zellen und unterstützt die zytotoxische Immunantwort der CTLs [73], sowie der Makrophagen, die ebenso *via* IFN γ Stimulation den lokal zytotoxischen M1 Phänotyp ausbilden. Th2-Zellen dagegen sind in der Lage, die humorale Immunantwort *via* Interleukin-4 (IL-4) Sekretion zu verstärken, sie werden aber die Tumorummunität betreffend mittlerweile als zweiseitig diskutiert [73]. Sie fördern zum einen mittels Aktivierung von

Makrophagen deren Ausprägung zum M2 Phänotyp. Makrophagen dieses Phänotyps supprimieren Immunantworten gegen den Tumor und unterstützen den Tumorprogress via verstärkter Angiogenese [74]. Andererseits wird vermutet, dass ihre stimulierende Wirkung auf die den Tumor infiltrierenden Granulozyten tumorhemmend wirkt [75]. Bei PTC-Patienten mit vorliegender HT, denen, wie oben beschrieben, häufig eine verbesserte Prognose zugesprochen wird, wurde ebenso bereits ein höheres Level an Th2-assoziierten Interleukinen nachgewiesen [76]. Daneben scheint insbesondere das Verhältnis von Th1/Th2-Zellen von besonderer Wichtigkeit, da bei manifesten Autoimmunvorgängen regelmäßig eine beeinträchtigte Balance dieses Verhältnisses beobachtet wird [77].

Th17-Zellen bilden eine weitere Subgruppe von Th-Zellen. Wichtigstes Effektormolekül ist Il-17, welches in Zusammenhang mit der Verhinderung von Infektionen durch Rekrutierung von Neutrophilen, aber auch, ebenfalls wie Th1-Zellen, in Verbindung mit der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen steht [78, 79]. Eine Studie untersuchte bereits Th17-Zellen und Il-17 in Hinblick auf thyreoidale Karzinome. Th17-Zellen scheinen in diesem Zusammenhang eine eher protektive Rolle einzunehmen, da Anzahl der Th17-Zellen aus peripherem Blut invers mit der vorliegenden Tumorgröße korrelierten [80].

Treg-Zellen, ebenso den Th-Zellen zugehörig, nehmen mit der Suppression von immunologischen Reaktionen eine besondere Rolle in der Tumorummunität ein. Unter physiologischen Bedingungen ist ihre Hauptaufgabe die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz [81]. Differenzierungsmerkmal ist die Ausprägung des Transkriptionsfaktors *Forkhead-Box-Protein P3* (FOXP3) und die Sekretion von Il-10. Kohärent mit der immunsuppressiven Wirkung der Treg-Zellen zeigen zahlreiche Studien ein erhöhtes Vorkommen von Treg-Zellen in Primärtumoren [82] und in peripherem Blut von an Malignomen erkrankten Patienten [83]. Eine kürzlich durchgeführte Metaanalyse zeigt, dass Treg-Zellen bei Malignomen von prognostischer Relevanz sind: eine höhere Anzahl Treg-Zellen bergen das Risiko eines verschlechterten *Outcomes* [84]. Angezogen und stimuliert durch tumoreigene Faktoren wie *CC-chemokine ligand 21* oder tumoreigener *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) schwächen Treg-Zellen die Tumorummunität, behindern eine effektive Immunität gegen das Tumorgewebe und fördern somit das Tumorwachstum [85]. In Korrelation dazu wurden auch im tumorösen PTC-Gewebe Treg-Zellen gefunden. Auch bei PTC-Patienten korreliert die Zahl der Treg-Zellen mit aggressiveren Varianten des PTCs [82, 86]. Nicht nur der erhöhte Anteil an Treg-Zellen scheint in diesem Zusammenhang von Bedeutung, vor allem die Verhältnisse von Th17-Zellen/Treg-Zellen und von Treg-Zellen/CTLs zeigen prognostische Relevanz. So korreliert ein hohes Verhältnis von Treg/CTLs im Tumorbett mit größeren Primärtumoren und tendenziell mehr Lymphknotenmetastasen, zusammengefasst mit einer eher negativen Beeinflussung des *Outcomes* [87].

CTLs exprimieren das Oberflächenmerkmal CD8 und lösen durch Sekretion von Perforinen und Granzymen den apoptotischen Zelltod in Zielzellen aus. Ihre Rolle im Rahmen der Tumormunität ist nachdrücklich hervorzuheben. Durch ihre Fähigkeit, Tumorzellen *via* ihrer Präsentation von gewebe- oder tumorspezifischen Antigenen auf *major histocompatibility complex* (MHC) I Molekülen gezielt zu erkennen und zu lysieren werden sie als wichtigste Zellgruppe der Tumormunität diskutiert. Die beim PTC beobachteten Infiltrationen beinhalten CTLs. Ihr *Impact* wird bislang kontrovers diskutiert. Bisher wurde sowohl ein Zusammenhang zwischen CTLs und verlängerter rezidivfreier Zeit gezeigt, als auch dementsgegen eine verkürzte tumorfreie Zeit bei verstärkter CTL Infiltration, da 68% der CTLs kein Granzym B enthielten und somit ineffektiv waren [88, 89]. Bei HT-Patienten konnten bereits epitopspezifische zytotoxische T-Zellen nachgewiesen werden, die sowohl TPO und Tg als Antigene erkennen als auch direkt zytotoxisch auf Thyreozyten wirken und somit an den das Schilddrüsenparenchym destruierenden Prozessen der Hashimoto Thyreoiditis beteiligt sind [90]. In Hinblick auf die bei HT und PTC vorliegenden Lymphozyteninfiltrationen stellt sich die Frage, inwiefern auch bei PTC-Patienten epitopspezifische T-Zellen vorliegen und zytotoxische T-Zellen ihre Bedeutsamkeit in der Tumormunität in diesem Fall nicht durch die Erkennung von tumorspezifischen Antigenen erlangen, sondern durch die Erkennung gewebespezifischer Peptide, die sowohl in Thyreozyten als auch in Zellen des PTCs zu finden sind.

Tumore entwickeln gewisse Mechanismen, mit Hilfe derer sie der *immune surveillance* des Körpers entgehen. Ein solcher *Escape*-Mechanismus des Tumors ist das Herbeiführen dysfunktionaler T-Lymphozyten. Dazu zählen anergische und erschöpfte T-Zellen (exhausted T-cells). Anergische Zellen entstehen durch solitäre Stimulation des TCR ohne costimulatorische Signale, während erschöpfte Lymphozyten dysfunktionale CD4+ oder CD8+ Lymphozyten darstellen, die sowohl eingeschränkte Effektorfunktionen aufweisen als auch inhibitorische Oberflächenmoleküle, e.g. PD-1, CTLA-4, *T cell immunoglobulin mucin 3* (Tim-3), exprimieren [91, 92]. Ihre Entstehung wird durch anhaltende antigenvermittelte TCR-Stimulation hervorgerufen. In regionalen Metastasen der differenzierten Schilddrüsenkarzinome konnten bereits erschöpfte T-Zellen nachgewiesen werden, die hauptsächlich die Fähigkeit, Effektorinterleukine zu sezernieren, verloren haben [91]. Ihre Proliferationsfähigkeit schien dagegen weitgehend erhalten [91].

CD4- und CD8- T-Zellen werden bei Ausprägung von CD56 zu den NKT-Zellen gezählt. Diese erkennen Lipidantigene und haben einen hohen Stellenwert in der *immune surveillance*. Sie können Tumorzellen direkt oder *via* Aktivierung von NK-Zellen lysieren [71]. In Zusammenhang mit PTCs wurden sie noch nicht eingehend beschrieben.

Prägen T-Zellen weder CD4 noch CD8 noch CD56 Oberflächenmoleküle aus, gelten diese Zellen als doppelnegative T-Zellen (DN T-Zellen). Kürzlich wurden DN T-Zellen erstmals als dominanter Zelltyp in den Lymphozyteninfiltraten des PTCs nachgewiesen [93]. Während sie bei diversen Malignomen bereits als Mediator der Tumorummunität beschrieben wurden [94], werden sie hinsichtlich des papillären Schilddrüsenkarzinoms als hemmender Einfluss auf die Tumorummunität gewertet [93].

$\Gamma\delta$ T-Zellen weisen statt des regulären $\alpha\beta$ T-Zellrezeptors einen $\gamma\delta$ Rezeptor auf. Sie nehmen unter den Populationen insofern eine besondere Rolle ein, als dass ihnen die Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem zugeschrieben wird [95]. Sie sind insbesondere nicht auf eine Aktivierung *via* Antigenpräsentation auf MHC I Moleküle angewiesen und sind in der Lage, auf Marker zellulären Stresses ebenso wie auf maligne Prozesse zu reagieren [96, 97]. Bei malignen Prozessen können $\gamma\delta$ Zellen *via* Sekretion von inflammatorischen Mediatoren wie IFN γ und Tumornekrosefaktor α (TNF α) indirekt Antitumorummunität verstärken, aber auch durch Freisetzung von Granzymen und Perforinen direkt die Apoptose in Tumorzellen auslösen [98]. Immer mehr klinische Studien werden mit dem Ziel durchgeführt, die $\gamma\delta$ Zellen zu aktivieren oder ihre Aktivität zu erhöhen, wie z.B. durch autologe Zelltherapien mittels Reinfusion der Zellen nach erfolgter Vervielfältigung *in vitro* [99]. Andererseits wurde bei verschiedenen Malignomen die verstärkte Infiltration des Tumorgewebes durch $\gamma\delta$ T-Zellen bisher als prognostisch ungünstiges Zeichen beschrieben [100]. Hier ist neben der Hypothese des *Tumorenhancements* durch $\gamma\delta$ Zellen vor allem die verstärkte Infiltration der Zellen als Reaktion auf einen schwerwiegenden Tumorprozess denkbar. $\Gamma\delta$ T-Zellen scheinen im Zusammenhang mit differenzierten Schilddrüsenkarzinomen bisher nicht näher analysiert worden zu sein.

1.3.3 Antitumorummunität und epitopspezifische T-Zellen

Das am besten erforschte Malignom mit einhergehender Antitumorummunität ist das maligne Melanom. Die Hypothese der Antitumorummunität wurde bei malignen Melanomen ähnlich wie beim PTC auf der Beobachtung beruhend formuliert, dass maligne Melanome begleitet von einer autoimmun bedingten Vitiligo als Komorbidität verbesserte Prognosen aufweisen [101]. Als Erklärungsansatz für dieses Phänomen konnten bei dem mit Vitiligo assoziierten malignen Melanom mittlerweile epitopspezifische zytotoxische T-Zellen (epitopspezifische CTLs) identifiziert werden [102].

Epitopspezifische CTLs können zum einen gegen gewebespezifische Epitope, zum anderen gegen tumorspezifische Epitope gerichtet sein [103]. Gewebespezifische CTLs erkennen im Beispiel Vitiligo u.a. Epitope, die durch Gene wie Melan-A/MART-1 codiert werden [103]. Diese Epitope werden in Melanozyten und auch in Melanomzellen exprimiert. In der Folge geht von

ihnen eine tumorhemmende Zytotoxizität gegenüber Melanomzellen aus, zeitgleich bedingt ihre Zytotoxizität gegenüber nicht entarteten Melanozyten eine Vitiligo. Tumorspezifische CTLs hingegen sind gegen Antigene gerichtet, die spezifisch auf Tumorzellen präsentiert werden. Die Präsentation dieser Antigene kann auf einer durch den Tumor verstärkten Expression von Genen beruhen, die unter physiologischen Bedingungen nicht exprimiert werden [103]. CTLs können aber auch gegen Antigene gerichtet sein, die durch stattgehabte Mutationen in Tumorzellen tumorspezifisch verändert sind [103], bisher u.a. im Rahmen von großzelligen Lungenkarzinomen und hämatoonkologischen Malignomen beschrieben [104-106].

Auf der Entdeckung und Charakterisierung dieser spezifischen tumorreaktiven T-Zellen sollen neue Methoden basieren, die diese körpereigene Antitumorimmunität therapeutisch gezielt nutzen. In dieser Hinsicht vielversprechend ist die Etablierung einer adoptiven Zelltherapie und weiterhin einer dendritischen Zelltherapie. Die adoptive Zelltherapie soll die Effektivität tumorspezifischer CTLs durch Applikation von *in vitro* stimulierten spezifischen CTLs erhöhen [107]. Die dendritische Zelltherapie soll durch die Applikation von *in vitro* mit Tumorantigenen gepulsten dendritischen Zellen dazu führen, dass dendritische Zellen Tumorantigene gegenüber dem adaptiven Immunsystem als körperfremd präsentieren und somit ein *Priming* der zytotoxischen Lymphozyten sowie T-Helferzellen mit resultierender effektiver Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen erfolgt [108, 109].

Mit dem Hintergrund, dass sowohl HT-Patienten als auch der Großteil der PTC-Patienten Lymphozyteninfiltrationen in der Schilddrüse aufweisen und bei HT-Patienten zirkulierende, gewebespezifische CTLs mit zytotoxischem Potenzial gegenüber Thyreozyten nachgewiesen wurden [90], soll in dieser Arbeit das Vorliegen gewebe- bzw. thyreoidspezifischer CTLs bei PTC-Patienten analysiert werden und mit patientenspezifischen Merkmalen sowie dem klinischem Verlauf der Patienten korreliert werden.

1.3.4 HLA-abhängige Tumormunität

Inwiefern oben beschriebene Mechanismen der Antitumorimmunität abhängig von der spezifischen, interindividuellen Ausprägung von HLA-Merkmalen sind, ist weitgehend unerforscht. MHC I und MHC II Komplexe nehmen eine entscheidende Rolle in der Präsentation von Tumorantigenen gegenüber CD8+ und CD4+ T-Zellen ein, somit ist ein Einfluss unterschiedlicher HLA-Allele mit möglicherweise dadurch bedingten Konformationsänderungen der Peptidbindungstasche denkbar.

1.4 Ziele der Arbeit

Konkret weisen viele Studien nach, dass ein PTC, das mit einer HT auftritt, ein verbessertes klinisches *Outcome* verglichen mit Karzinomen ohne Begleitthyreoiditis hat [56, 57]. Aus dieser Beobachtung resultiert die Hypothese, dass das Fortschreiten des PTCs durch diese Autoinflammation im Sinne einer Antitumorimmunität gehemmt wird.

Ziel der Arbeit ist es, mittels Analyse der T-Zellsubpopulationen und Prüfung der zytotoxischen T-Zellen auf Epitopspezifität Hinweise für Antitumorimmunitätsmechanismen zu eruieren. Um zunächst die T-Zellsubpopulationen zu charakterisieren, sollen diese bei PTC-Patienten, HT-Patienten und Kontrollen durchflusszytometrisch gemessen und miteinander verglichen werden. Bei HT-Patienten wurden bereits epitopspezifische CTLs für Epitope der Thyreoperoxidase (TPO1, TPO2, TPO3) und des Thyreoglobulins (Tg1, Tg2 und Tg3) mit zytotoxischem Potenzial gegenüber Thyreozyten nachgewiesen [90]. Analog dazu wird in dieser Dissertation das Vorliegen von epitopspezifischen CTLs bei PTC-Patienten untersucht, sowie deren Verhalten nach Stimulation mit den o.g. TPO und Tg Epitopen.

In der Literatur sind bereits zahlreiche für PTCs prädisponierende HLA-DR und -DQ Allelvarianten beschrieben. Diese Gene codieren HLA-Klasse-II-Moleküle und nehmen u.a. hinsichtlich Beeinflussung der Kostimulation von CTLs eine zentrale Rolle in der Tumorimmunität ein. Um den genetischen Einfluss der HLA-DR und -DQ Allelvarianten auf den Verlauf von PTCs und auf ggf. bestehende Antitumorimmunitätsmechanismen zu interpretieren, sollen die PTC-Patienten typisiert und HLA-Einflüsse auf den klinischen Verlauf der Patienten, sowie auf epitopspezifische CTLs erfasst werden. Mittels dieser Analyse soll die Frage beantwortet werden, ob die Hypothese einer Tumorimmunität bei PTCs um den Unterpunkt des Einflusses individueller patienteneigener Faktoren auf vorliegende Tumorimmunität bzw. deren Effektivität erweitert werden kann. Die Arbeitshypothese der Dissertation ist somit, dass das vorliegende HLA-Muster des betroffenen Patienten auf ablaufende Tumorimmunitätsprozesse Einfluss nimmt.

Mit dem Nachweis *outcome*-relevanter Antitumorimmunitätsmechanismen könnte zukünftig der Einsatz neuer Immunotherapeutika bei therapierefraktären PTCs ermöglicht werden. T-Zell *Checkpointinhibitoren* wie CTLA-4-Inhibitoren oder PD-1-Inhibitoren sind in der Lage, die Regulation der T-Zellen im Sinne einer Verstärkung der Immunantwort zu modulieren. Bei vorliegender Antitumorimmunität könnte diese demnach therapeutisch verstärkt werden. In der Therapie von malignen Melanomen, dem am besten erforschten Malignom mit einhergehender, bereits nachgewiesener, prognoserelevanter Antitumorimmunität, sind diese Therapeutika etabliert und für nicht resezierbare maligne Melanome zugelassen [65].

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenkollektive

Für die Analyse humaner T-Zellen hinsichtlich Quantifizierung der Subpopulationen und Bestimmung der Epitopspezifität wurden Blutproben von PTC-Patienten, HT-Patienten und gesunden Kontrollpersonen (HP) akquiriert. In die Analyse der T-Zellsubpopulationen wurden PTC-Patienten, HT-Patienten und schilddrüsengesunde Kontrollen eingeschlossen (s. Tab. 2.1). Nach schriftlich erhaltenem Einverständnis wurde ihnen jeweils ein *Cell Preparation TubeTM* (CPTTM) peripheren Blutes abgenommen. In die PTC-Gruppe wurden Patienten mit histologisch gesicherter Diagnose eines PTCs eingeschlossen, unabhängig von bereits erfolgter Therapie. Die meisten hier analysierten Patienten weisen sowohl Zustand nach (Z.n.) Thyreoidektomie, als auch Z.n. Radioiodtherapie auf.

| Analyse | Kohorte | Weitere Differenzierung | Anzahl (n) | Geschlecht (m/f) | Ø Alter (Jahren) |
|------------------------------|---------|--|------------|------------------|------------------|
| T-Zellsubpopulationen | PTC | | 94 | 27/67 | 52 |
| | | <i>davon aktiv, Tg > 0,2 ng/ml</i> | 15 | 6/9 | 52 |
| | | <i>davon Lymph- und/ oder Fernmetastasen</i> | 30 | 9/21 | 49 |
| | HT | | 51 | 11/40 | 46 |
| | HP | | 17 | 6/11 | 32 |
| Tetrameranalyse | PTC | | 97 | 25/72 | 53 |
| | | <i>davon aktiv, Tg > 0,2 ng/ml</i> | 11 | 4/7 | 56 |
| | | <i>davon Lymph- und/ oder Fernmetastasen</i> | 39 | 14/25 | 53 |
| | HT | | 14 | 3/11 | 51 |
| | HP | | 14 | 5/9 | 33 |

Tabelle 2.1 Metrische Daten der Kohorten Anzahl (n), Geschlechterverhältnis männlich/weiblich (m/f) und Durchschnittsalter in Jahren der analysierten Patienten mit papillärem Schilddrüsenkarzinom (PTC von „papillary thyroid cancer“), Hashimoto Thyreoiditis (HT) und Kontrollen (HP von „healthy person“)

Das PTC-Kollektiv wurde mittels Nachweises des Tumormarkers Tg differenziert in Patienten mit v.a. ein aktives Tumorleiden (Tg > 0,2 ng/ml) und Patienten in Remission (Tg unterhalb der Nachweisgrenze). Des Weiteren wurden innerhalb des PTC Kollektivs metastasierte PTCs

(laut TNM Klassifikation N1, N2 und/oder M1) mit nichtmetastasierten PTCs verglichen. Die Einschlusskriterien der HT-Kohorte erfüllten Patienten, die sowohl sonographisch diffus inhomogenes Schilddrüsenparenchym, als auch mindestens dreifach über die Norm erhöhte TPO-Ak (≥ 105 mIU/ml) und/oder Tg-Ak (≥ 120 mIU/ml) bei unauffälligen TSH-Ak ($\leq 0,3$ mIU/ml) aufwiesen. Als Kontrollen wurden Probanden mit bisher blander Schilddrüsenanamnese herangezogen. Der Durchführung dieser Studie wurde am 13.05.2013 durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität zugestimmt, Studiennummer 4244.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

| Materialien | Handelsname | Firma | Firmensitz |
|---------------------------------|--------------------------|----------------------|--------------------------------|
| 24 Well-Platte | Nunclon™ Delta Surface | Thermo Scientific | Roskilde, Dänemark |
| FACS-Röhrchen | FACS tubes | Sarstedt | Nümbrecht, Deutschland |
| Falcons | Cellstar® tubes | Greiner bio-one | Frickenhausen, Deutschland |
| Filter | PreSeperation Filter | Miltenyi Biotec | Bergisch Gladbach, Deutschland |
| Kulturplatten | Nunclon™Delta Surface | Thermo Scientific | Roskilde, Dänemark |
| Pipetten | Eppendorf Reference | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Pipetten | Costarstripette | Corning Incorporated | New York, USA |
| Pipettenspitzen | Tip-One | Starlab | Hamburg, Deutschland |
| Zählkammer nach Neubauer | Zählkammer nach Neubauer | Marienfeld-Superior | Marienfeld, Deutschland |
| Zellpräparationsröhrchen | CPT™-Röhrchen | BD Pharmingen | Franklin Lakes, USA |

Tabelle 2.2 Verbrauchsmaterialien

2.1.3 Tetramere

| Tetramer | Aminosäuresequenz | Hersteller |
|------------------|--------------------------|------------------------|
| TPO1 | LLIGGFAGL | Glycotpe Biotechnology |
| TPO2 | ALAVLSVTL | Glycotpe Biotechnology |
| TPO3 | ALSEDLLS | Glycotpe Biotechnology |
| Tg1 | GLLDQVAAL | Glycotpe Biotechnology |
| TG2 | GLREDLLSL | Glycotpe Biotechnology |
| TG3 | SLQDVPLAAL | Glycotpe Biotechnology |
| Ovalbumin | - | Biorbyt |

*Tabelle 2.3 **Tetramere** Die Firmensitze der genannten Hersteller befinden sich in Cambridge, GB (Biorbyt) und Heidelberg, D (Glycotpe Biotechnology)*

2.1.4 Antikörper

| Antikörper | Spezies | Isotyp | Fluorochrom | Hersteller |
|-------------------|----------------|---------------|--------------------|-------------------|
| | Maus | IgG1 | PerCP | BD |
| | Maus | IgG1 | PE | BD |
| | Maus | IgG1 K | APC | BD |
| | Maus | IgG2a | FITC | BD |
| | Maus | IgG2b | PE | BD |
| | Maus | IgM K | FITC | BD |
| | Maus | IgG2a | PE | BD |
| | Ratte | IgG2a | PE | BD |
| | Maus | IgG2b | APC | BD |
| | Maus | IgG2a | PerCP | BD |
| CCR4 | Maus-antiHuman | | APC | R&D Systems |
| CD107a | Maus-antiHuman | | PE | BD Pharmingen |
| CD14 | Maus-antiHuman | | PE | BD |
| CD183 | Maus-antiHuman | | PE | BD Pharmingen |
| CD197 | Maus-antiHuman | | PerCP | BD Pharmingen |

| Antikörper | Spezies | Isotyp | Fluorochrom | Hersteller |
|-------------------|----------------|---------------|--------------------|-------------------|
| CD1a | Maus-antiHuman | | PE | BD Pharmingen |
| CD272 | Maus-antiHuman | | PE | BD Pharmingen |
| CD279 | Maus-antiHuman | | FITC | BD Pharmingen |
| CD4 | Maus-antiHuman | | PE | Miltenyi Biotec |
| CD4 | Maus-antiHuman | | APC | BD Pharmingen |
| CD45 | Maus-antiHuman | | FITC | BD |
| CD45 | Maus-antiHuman | | PerCP | BD |
| CD45 | Maus-antiHuman | | PE | BD |
| CD45 | Maus-antiHuman | | APC | BD |
| CD45 | Maus-antiHuman | | FITC | BD |
| CD56 | Maus-antiHuman | | APC | BD Pharmingen |
| CD62L | Maus-antiHuman | | FITC | BD Pharmingen |
| CD8 | Maus-antiHuman | | APC | BD |
| FoxP3 | Maus-antiHuman | | APC | Miltenyi Biotec |
| HLA-A2 | Maus-antiHuman | | PE | BD |
| HLA-DR | Maus-antiHuman | | FITC | BD |
| IL-17 | Maus-antiHuman | | PE | BD Pharmingen |
| Ki-67 | Maus-antiHuman | | FITC | BD |
| PD1 | Maus-antiHuman | | FITC | BD Pharmingen |
| TCR αβ | Maus-antiHuman | | FITC | BD Pharmingen |
| TIM3 | Maus-antiHuman | | PE | R&D Systems |

Tabelle 2.4 Für Durchflusszytometrie genutzte Antikörper Verwendete Antikörper (Ak) mit den Fluorochromen Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) und Allophycocyanin (APC). Die Firmensitze der genannten Hersteller befinden sich in San Jose, USA (BD), Franklin Lakes, USA (BD Pharmingen), Minneapolis, USA (R&D Systems) und Bergisch Gladbach, Deutschland (Miltenyi Biotec)

2.1.5 Puffer und Medien

| Puffer/Medium | Konzentration | Hersteller |
|--|---------------|-----------------|
| Dulbecco's Phosphate Buffered Saline | 1x | Gibco |
| Erythrocyte-Lysis-Puffer | 1x | Qiagen |
| Cytofix/Cytoperm Puffer | 1x | BD Biosciences |
| Fixation/Permeabilization Solution Kit | 1x | BD Biosciences |
| MACS-Puffer | 1x | Miltenyi Biotec |
| Perm/Wash Puffer | 1x | BD Biosciences |
| RPMI Medium 1640+Glutamax™ | 1x | Gibco |
| TF Diluent Puffer | 1x | BD Biosciences |

Tabelle 2.5 Puffer und Medien Die Firmensitze der genannten Hersteller befinden sich in Saranac, USA (Gibco), Hilden, D (Qiagen), Franklin Lakes, USA (BD Biosciences), Bergisch Gladbach, D (Miltenyi Biotec)

2.1.6 Weitere Substanzen

| Substanz | Bezeichnung | Hersteller |
|----------|---------------------------------|-------------------------|
| II-2 | Recombinant Human II-2 Protein | R&D Systems |
| II-7 | Recombinant Human II-7 Protein | R&D Systems |
| II-15 | Recombinant Human II-15 Protein | R&D Systems |
| DMSO 50% | HyBRI-MAX D2650 | Sigma Aldrich |
| TPO1 | LLIGGFAGL | Glycotope Biotechnology |
| TPO2 | ALAVLSVTL | Glycotope Biotechnology |
| TPO3 | ALSEDLLS | Glycotope Biotechnology |
| Tg1 | GLLDQVAAL | Glycotope Biotechnology |
| TG2 | GLREDLLSL | Glycotope Biotechnology |
| TG3 | SLQDVPLAAL | Glycotope Biotechnology |

Tabelle 2.6 Weitere Substanzen Interleukine (II) 2, 7 und 15, Dimethylsulfoxid (DMSO) und verwendete Epitope der Thyreoidperoxidase (TPO 1-3) und des Thyreoglobulins (Tg1-3). Die Firmensitze der genannten Hersteller befinden sich in Minneapolis, USA (R&D Systems), St. Louis, USA (Sigma Aldrich), Heidelberg, D (Glycotope Biotechnology)

2.1.7 Geräte

| Gerät | Gerätebezeichnung | Hersteller | Firmensitz |
|----------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------|
| Brutschrank | HeraCell® | Heraeus | Hanau, D |
| Pipettierhilfe | Pipetus® | Hirschmann Laborgeräte | Eberstadt, D |
| Durchflusszytometer | FACSCalibur® | BD | San Jose, USA |
| Mikroskop | Lichtmikroskop | Hund | Wetzlar, D |
| Sterilbank | HeraSafe® | Heraeus | Hanau, D |
| Zentrifuge | ROTIXA/RP® | Hettich | Tuttlingen, D |
| Zentrifuge | Universal30RF® | Hettich | Tuttlingen, D |

Tabelle 2.7 Verwendete Geräte

2.1.8 Software

| Anwendung | Software | Hersteller | Firmensitz |
|--------------------------------|----------------------|-------------------|-------------------|
| Facs Calibur | CellQuest Pro™ | BD | San Jose, USA |
| Statistische Auswertung | Microsoft Excel 2013 | Microsoft | Redmond, USA |
| | GraphPad Prism 6 | Graphpad | La Jolla, USA |
| | SPSS Statistics 24 | IBM | Armonk, USA |

Tabelle 2.8 Verwendete Software

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung/Isolation peripherer mononukleärer Zellen

Die in diese Studie eingeschlossenen Patienten stammen aus dem Patientenkollektiv des Funktionsbereichs Spezielle Endokrinologie der Universitätsklinik Düsseldorf bzw. dem Patientenkollektiv der Jülicher Nuklearmedizin (Klinik für Nuklearmedizin, Standort Jülich). Den Patienten wurde nach schriftlich erhaltenem Einverständnis je ein CPT™ Blut abgenommen. Sowohl die Analyse der T-Zellsubpopulationen, als auch die Tetrameranalyse epitopspezifischer T-Zellen setzen isolierte periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs von *peripheral blood mononuclear cells*) voraus. Die CPT™ beinhalten ein kombiniertes Dichtentrennschichtsystem, welches PBMCs durch Zentrifugation dauerhaft von übrigen Blutzellen abtrennt und somit isoliert. Am Tag der Abnahme der jeweiligen Patientenprobe erfolgte zeitnah die Zentrifugation mit 3200 U/min bei 20° C über 20 min. Im Anschluss daran wurde das Blutplasma in ein Falcon abpipettiert und die PBMCs über einen Zellfilter (100µm oder 80µm) in ein weiteres Falcon überführt. Nach zweimaligem Waschen und der Zugabe von Erythrozyten-Lyse-Puffer (Erylyse-Puffer) zur Entfernung noch verbliebener Erythrozytenreste lagen isolierte PBMCs vor, die, je nach anstehender Analyse (s.u.), gefärbt wurden [110].

2.2.2 HLA-A2 Typisierung

Da im Verlauf HLA-A0201 spezifische Tetramere genutzt wurden, wurden alle Studienteilnehmer HLA-A0201 typisiert [110]. Dafür wurden 50 µl *fetal calf serum* (FCS) mit 30 µl Patientenblut gemischt und fünf Minuten inkubiert. Anschließend wurden der Negativkontrolle 5 µl CD45 Fluorescein-Isothiocyanat-Ak (FITC-Ak) und 5 µl IgG2b Phycoerythrin-Ak (Pe-Ak) hinzugefügt, der Positivkontrolle CD45 PE-Ak hinzugegeben. Der für die HLA-A0201 Typisierung genutzten Patientenprobe wurden 5 µl CD45 FITC-Ak und 5 µl HLA-A2 PE-Ak hinzugefügt und alle Proben wurden 15 min lichtgeschützt inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml Erylyse-Puffer und erneuter 15-minütiger Inkubation erfolgte die Zugabe von 1 ml *magnetic-activated cell sorting* (MACS) Puffer und die Zentrifugation der Proben (1400 rpm, 5 min, 4°C). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 300 µl Erylyse-Puffer resuspendiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.3 Analyse der T-Zellsubpopulationen

T-Zellsubpopulationen sind anhand der Expression unterschiedlicher Oberflächenmoleküle zu differenzieren (s. Kapitel 1.3.2). Mittels Nachweises dieser sogenannten Oberflächenmarker

können die vorliegenden Anteile der jeweiligen Subgruppen patientenspezifisch quantifiziert werden. Die Anteile der T-Helferzellen, CTLs, DN T-Zellen, Th1- und Th2-Zellen, NK-T-Zellen, $\Gamma\delta$ T-Zellen, aktivierten zytotoxischen T-Zellen, erschöpften T-Zellen und anergischen T-Zellen wurden mittels des in Tabelle 2.9 aufgeführten Färbeschemas bestimmt. Dafür wurden die zuvor isolierten PBMCs mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und gezählt (vgl. Tab. 2.2). Anschließend wurden sie für die zu färbenden Probenansätze (vgl. Tab. 2.9) zu gleichen Teilen aufgeteilt. Nach Zugabe von 50 μ l FKS erfolgte die Zugabe des jeweiligen Antikörpers (vgl. Tab. 2.4). Die verwendeten Ak waren alle mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Genutzt wurden die Fluorochrome Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) und Allophycocyanin (APC). Nach Zugabe der Ak wurden die Proben 20 min auf Eis inkubiert. Ungebundene Ak wurden durch die Zugabe von PBS, erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes entfernt. Anschließend folgte die durchflusszytometrische Messung der gefärbten Zellen.

| Probenansätze | FITC-Ak | PE-Ak | PerCP-Ak | APC-Ak |
|---|----------------------|----------------------|-----------------|----------------------|
| Kontrolle 1 | CD45 | Ms IgG1 ^k | --- | Ms IgG2b |
| Kontrolle 2 | Ms IgM ^k | CD45 | --- | Ms IgG1 ^k |
| Kontrolle 3 | Ms IgG1 ^k | Rat IgG2a | CD45 | --- |
| Kontrolle 4 | --- | Ms IgG2a | Ms IgG2a | CD45 |
| T1- und T2-Helferzellen | $\alpha\beta$ TCR | CXCR3 | CD4 | CCR4 |
| Natürliche Killer-T-Zellen | $\alpha\beta$ TCR | CD1a | --- | CD56 |
| $\Gamma\delta$ T-Zellen | --- | $\Gamma\delta$ TCR | CD4 | CD8 |
| Aktiv. zytotox. T-Zellen | $\alpha\beta$ TCR | CD107a | --- | CD8 |
| Erschöpfte T-Zellen | PD1 | TIM3 | CD4 | CD8 |
| Anergische T-Zellen | $\alpha\beta$ TCR | CD272 | CD4 | CD8 |

Tabelle 2.9 Pipettierschema T-Zellsubpopulationen Aufgeführt ist das Antikörper-Pipettierschema der Oberflächenfärbung zur Bestimmung der Anteile der unterschiedlichen T-Zellsubpopulationen. Es wurden Antikörper (Ak) mit den Fluorochromen Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) und Allophycocyanin (APC) verwendet

2.2.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine quantitative Messmethode, die, mittels Erfassung von z.B. Größe und Granularität des Zytoplasmas, unterschiedliche Zelltypen zu differenzieren vermag [111]. Des Weiteren ist mit Hilfe der fluoreszenzaktivierten Durchflusszytometrie (FACS) die

Bestimmung von Oberflächenmolekülen oder auch intrazellulären Proteinen möglich. Die Messung basiert darauf, dass die zu analysierenden Zellen nacheinander durch eine dünne Messkammer fließen und hier einzeln von einem Laserstrahl beschossen werden. Die durch das Auftreffen auf die Zellen erzeugte Streuung (*scatter*) des Laserlichtes wird im Vorwärtsstreuwinkel (fsc) und Seitenstreuwinkel (ssc) erfasst und ist abhängig von Zelleigenschaften wie Größe oder Granularität [111]. So ergibt sich für jeden Zelltyp je nach typischer Größe und Granularität ein charakteristisches fsc/ssc Profil, welches aber interindividuell Variationen aufweisen kann (s. Abb. 2.1). Wurden die Zellen vorher mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (s. Kapitel 2.2.3), emittieren die durch die Laserenergie angeregten Fluoreszenzfarbstoffe Energie in Form von Photonen. Die Konzentration der emittierten Photonen ist dabei proportional der Menge an die Zellen gebundener Antikörper (Ak) [111]. Die emittierten Photonen werden durch vorhandene fluoreszenzspezifische Photodioden erfasst. Voraussetzung für die Differenzierung der Fluoreszenzsignale ist ein jeweils für ein Fluorochrom spezifisches Emissionsspektrum. Die Emissionsspektren der genutzten Fluorochrome sind in Tabelle 2.10 dargestellt. Die zu analysierenden Proben wurden mittels des Durchflusszytometers FacsCalibur (s. Tab. 2.7) gemessen.

| Fluorochrom | Anregungswellenlänge (nm) | Extinktionsmaximum (nm) | Emissionsmaximum (nm) |
|--------------|---------------------------|-------------------------|-----------------------|
| FITC | 488 | 494 | 520 |
| PE | 488; 532; 561 | 496 | 578 |
| PerCP | 488; 532 | 482 | 678 |
| APC | 633; 635; 640 | 650 | 660 |

Tabelle 2.10 Emissionsspektren der genutzten Fluorochrome FITC (Fluorescein-Isothiocyanat), PE (Phycoerythrin), PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein) und APC (Allophycocyanin) Herstellerangaben BD Biosciences bezüglich Durchflusszytometer FacsCalibur

2.2.5 Auswertung der T-Zellsubpopulationsanalyse

Die Auswertung der durchflusszytometrisch erhobenen Daten erfolgte mit dem Programm CellQuest Pro™ (s. Tab. 2.8). Als erster Schritt der Auswertung wurde der Fsc/Ssc der jeweiligen Patientenprobe als *dot plot* dargestellt. Unterschiedliche Zelltypen unterscheiden sich durch Charakteristiken wie Größe und Granularität. Es ergibt sich ein typisches Populationsmuster, welches interindividuell variiert (s. Abb.2.1). Mittels Eingrenzung des *Gates* auf die zu analysierenden Populationen können für die Messung nicht relevante Zellen und Zelldebris für die Analyse ausgeschlossen werden. Im Anschluss daran wurde jede untersuchte T-Zellsubpopulation separat mittels *dot plot* Analyse ausgewertet. Dabei wurden die *Gates* nach den im *dot plot* sichtbaren Zellpopulationen gesetzt. Überlappten diese oder

war eine Abgrenzung nicht eindeutig möglich, wurden Histogramme der einzelnen Parameter erstellt. In diesen spiegeln zwei *Peaks* die positive und negative Zellpopulation wider und der Grenzwert wird ersichtlich. Die Plausibilität des gesetzten *Gates* wurde jeweils anhand der Positiv- und Negativkontrollen geprüft.

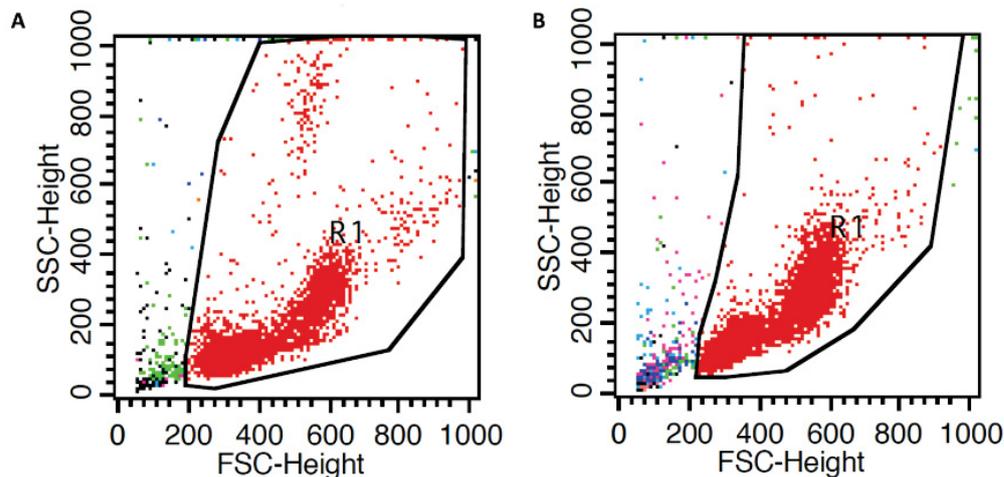


Abb. 2.1: **Forward/side scatter der PBMCs** Vergleich der peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) im forward/side scatter zweier Probanden (Proband A und Proband B)

2.2.6 Identifikation regulatorischer T-Zellen mittels intrazellulärer Färbung

Ein wesentliches Nachweiskriterium regulatorischer T-Zellen ist neben dem Nachweis der Oberflächenmoleküle CD25 und TCR außerdem der Nachweis des Transkriptionsfaktors FoxP3. Da FoxP3 intrazellulär vorliegt, muss die Oberflächenfärbung methodisch um eine intrazelluläre Färbung erweitert werden. Nach erfolgter Oberflächenfärbung der PBMCs (Pipettierschema s. Tab. 2.11) erfolgte somit die Zugabe von 100 µl Cytotfix/Cytoperm Lösung.

| Probenansätze | FITC-Ak | PE-Ak | PerCP-Ak | APC-Ak |
|------------------|----------|-----------|----------|-----------|
| Kontrolle | Ms IgM k | Ms IgG1 k | Ms IgG2a | Ms IgG1 k |
| Treg | αβ TCR | CD25 | CD4 | FoxP3 |

Tabelle 2.11 **Pipettierschema T-Zellsubpopulationen, intrazelluläre Färbung** Aufgeführt ist das Antikörper-Pipettierschema der Oberflächenfärbung, erweitert mit der intrazellulären Färbung zur Bestimmung der Anteile der Treg-Population. Es wurden Antikörper (Ak) mit den Fluorochromen Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) und Allophycocyanin (APC) verwendet

Nach 20 min Inkubationszeit bei 4°C wurden die Proben mit Zugabe von 2 ml *Perm/Wash* Lösung gewaschen und anschließend das Zellpellet mit 50 µl *Perm/Wash* Lösung resuspendiert. Dazu wurden 5 µl des Ak der intrazellulären Färbung (FoxP3) pipettiert und 30

min bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Ungebundene Ak wurden im Anschluss mit erneuter Zugabe von *Perm/Wash* Puffer und Zentrifugation mit anschließendem Verwurf des Überstandes entfernt. Das Zellpellet wurde in *Perm/Wash* Lösung resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.7 Tetrameranalyse zur Bestimmung Schilddrüsen-spezifischer T-Zellen

Mit der Entwicklung der Tetrameranalyse 1996 ermöglichten Altman *et al.* die Detektion epitopspezifischer T-Zellen [112]. Die dabei eingesetzten Tetramere bestehen aus einem Komplex von vier MHC-Molekülen, der von einem zentralen Streptavidin-Molekül stabilisiert wird. Da MHC-Monomere eine hohe Dissoziationsrate aufweisen, wird der Vorteil der erhöhten Bindungsstärke der Tetramerformation genutzt, die bei Bindung von mehr als einem MHC-Molekül pro Zelle vorliegt. Die MHC-Moleküle tragen das jeweilige Peptid, für das die Epitopspezifität der T-Zellen geprüft wird. Für die Analyse wurden 1×10^6 PBMCs nach erfolgter Isolation in 1200 µl MACS Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 800 µl FCS und 200 µl *Fc receptor blocking agent* wurden zu 1×10^6 PBMCs 5 µl des jeweiligen Tetramers hinzugefügt und die Probe eine Stunde auf Eis inkubiert (s. Tabelle 2.3) [110]. Die gewählten Tetramere und korrespondierenden Peptide wurden abhängig von ihrer kalkulierten Bindungsstärke gegenüber MHCs ausgesucht. Dazu wurde die Datenbank SYFPEITHI genutzt, die mehr als 7000 Peptidsequenzen mit Bindungsmöglichkeit an MHC Moleküle der Klasse I und II verzeichnet [110]. Bindungsstärken ab ≥ 15 werden als hoch immunogen bezeichnet. Die hier ausgewählten Tetramere weisen Bindungsstärken zwischen 29 bis 31 auf. Des Weiteren sind die ausgewählten Tetramere HLA-A0201 spezifisch, zum einen begründet durch die hohe Prävalenz dieses HLA-Typs in der kaukasischen Bevölkerung, zum anderen sind der Großteil der kommerziell erwerblichen Tetramere auf dieses HLA-Merkmal beschränkt [110].

Nach Ablauf der einstündigen Inkubationszeit wurde 5 µl Anti-CD8+ FITC zu jeder Probe hinzugefügt und diese erneut 15 min auf Eis lichtgeschützt inkubiert, mit MACS Puffer gewaschen sowie resuspendiert und mittels Durchflusszytometrie gemessen [110]. Als jeweilige Kontrollen dienten mit Anti-Immunoglobulin G1 und Anti-CD45 gefärbte Proben der Patienten [110]. Die im Weiteren angegebenen Werte epitopspezifischer CTLs werden im Folgenden als Anteil der CD45+ CD8+ Zellen angegeben.

2.2.8 Stimulation zytotoxischer T-Zellen mit Schilddrüsen-spezifischen Epitopen

Um zu analysieren, ob das Proliferationsverhalten von CTLs des PTC-Kollektivs durch Inkubation mit TPO-Epitopen und Tg-Epitopen zu beeinflussen ist, wurden isolierte PBMCs

von PTC-Patienten kultiviert und für 20 h mit den Epitopen TPO1, TPO2 und TPO3, bzw. mit Tg1, Tg2 und Tg3 inkubiert. Im Anschluss an die Stimulation erfolgte die durchflusszytometrische Messung.

Alle hier verwendeten PBMCs wurden unmittelbar nach dem Isolationsvorgang in Kultur genommen. Für die Kultivierung der PBMCs wurden ca. 6×10^6 Zellen mit 6ml RPMI Medium 16408(1x) +GlutaMAXX™-I resuspendiert. Diese wurden auf fünf *Wells* einer 24er *Well*-Platte aufgetragen. Anschließend wurden vier Proben 1 µl/ml Interleukin-2 (Il-2), 2 µl/ml Interleukin-7 (Il-7) und 2µl/ml Interleukin-15 (Il-15) zugesetzt [110]. Die Kontrolle erhielt keinen Zytokin-Zusatz. Zusätzlich zu den Zytokinen erhielt das erste der vier *Wells* die Peptide TPO1, TPO2 und TPO3 als Zusatz (je 2 µl/ml), zum zweiten *Well* wurden die Peptide Tg1, Tg2 und Tg3 (je 2 µl/ml) hinzugefügt (s. Tab. 2.6). Als Kontrolle unspezifischer Proliferation wurde ein Well mit 6 µl/ml Ovalbumin versetzt [110]. Die o.g. Peptide wurden in 10% DMSO-Lösung resuspendiert. Zum Ausschluss einer Beeinflussung durch DMSO wurde ein Well mit 6 µl/ml DMSO-Lösung versetzt [110]. Die Inkubation erfolgte für ca. 20h bei ca. 37°C.

2.2.9 Ki-67 Proliferationsanalyse

Nach ca. 20 Stunden Inkubationszeit wurde mit der Proliferationsanalyse der PBMCs begonnen. Zunächst wurden die Zellen in FACS *tubes* von Medium befreit und in kaltem PBS resuspendiert. Die Oberflächenfärbung erfolgte, indem je 5 µl CD45 FITC-Ak bzw. 5 µl CD45 Peridinin Chlorophyll Protein-Ak (PerCP-Ak), 5 µl CD8 Allophycocyanin-Ak (APC-Ak) und das entsprechende Tetramer, bzw. die entsprechenden Isotypkontrollen (vgl. Tab. 2.4; Tab. 2.12) den Zellen hinzugefügt wurden.

| Kontrolle/ Proliferationsfärbung | FITC-Ak | PE-Ak | PerCP-AK | APC-AK |
|---|----------------|--------------|-----------------|---------------|
| Kontrolle 1 | CD45 | IgG2b | CD45 | Ms IgG1 |
| Kontrolle 2 | Ms IgG1 | CD45 | Ms IgG1 | CD45 |
| Proliferation | Ki-67 | Tetramer | CD45 | CD8 |

Tabelle 2.12 Pipettierschema der Proliferationsanalyse Oberflächen- und intrazelluläre Färbung. Es wurden Antikörper (Ak) mit den Fluorochromen Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) und Allophycocyanin (APC) verwendet

Nach 20 min Inkubation erfolgte die Zugabe von 1 ml Fix/Perm Lösung, anschließend 40-50 min Inkubation bei 2-8 °C. Die Proben wurden im Anschluss zweimalig mit *Perm/Wash* Lösung gewaschen, dann wurde das Zellpellet mit 100 µl *Perm-Wash* Lösung (s. Tab. 2.5) resuspendiert und 5 µl Ki-67, bzw. entsprechende Isotypkontrolle zugegeben. Nach erneuter

40-50 min Inkubation bei 2-8°C wurden die Zellen erneut zweimal mit *Perm/Wash* Lösung gewaschen, anschließend in PBS resuspendiert und durchflusszytometrisch gemessen.

2.2.10 HLA-Typisierung

Um den Einfluss von vorliegenden HLA-Allelvarianten auf das PTC zu evaluieren, wurde das PTC-Kollektiv (n = 148) HLA-DQ und HLA-DR typisiert und mit einem gesunden Kontrollkollektiv verglichen. DNA Extraktion und Purifikation erfolgte aus PBMCs mit Anwendung des QIAamp blood kit. Die erreichte Reinheit wurde photometrisch analysiert, indem die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen wurde. Proben, die A260/A280 Werte zwischen 1,5-1,9 aufwiesen, wurden verwendet [110]. HLA-DRB1 und HLA-DQB1 *intermediate resolution* Typisierung wurde durch das hiesige Institut für Transplantatdiagnostik und Zelltherapeutika mit freundlicher Unterstützung durch Herrn Dr. Jürgen Enczmann mittels Luminex-Technologie durchgeführt. Um die Typisierungsdaten der PTC-Patienten mit denen der Kontrollgruppe zu vergleichen, muss ein ähnlicher Genpool als Voraussetzung gegeben sein, da etwaige Unterschiede sonst ggf. nicht PTC-abhängig, sondern ethnizitätsspezifisch wären [110]. Um vergleichbare Genpools voraussetzen zu können, wurden die *intermediate typing results* des PTC-Kollektivs mit denen einer Kontrollgruppe (n = 27239; Daten aus Datenbank, angewendet durch externes Labor, s.o.) verglichen und die PTC-Proben ausgeschlossen, die Allele außerhalb der Vergleichsgruppe aufwiesen. Proben, die mehr als zwei gängige Allele aufwiesen, wurden im Anschluss *sequencing-based* typisiert [110].

2.2.11 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse wurden die Programme IBM SPSS *Statistics* 24 und GraphPad Prism 6 verwendet (s. Tab. 2.8). Bei Auswertung der T-Zellsubpopulationsanalyse wurden Werte, die um mehr als die dreifache Standardabweichung vom ursprünglichen Mittelwert abweichen, aus der Wertung genommen. Anschließend wurde mittels Shapiro-Wilk-Test geprüft, ob die Grundgesamtheiten der zu vergleichenden Stichproben eine Normalverteilung aufweisen. Mittelwerte der normalverteilten Daten wurden mit unabhängigen, bzw. abhängigen t-Tests bzw. einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit darauffolgendem *Tukey HSD post-hoc* Vergleich analysiert. Als signifikant werden, wenn nicht anders gekennzeichnet, p-Werte < 0,05 definiert. Die Mittelwerte nicht normal verteilter Daten wurden hingegen mit Mann-Whitney U-Tests, bzw. Kruskal-Wallis-Tests und nachfolgenden Mann-Whitney U-Tests verglichen. Als signifikant werden p-Werte < 0,05, bzw. < 0,01667 (Bonferroni-Korrektur) angesehen. Signifikante Unterschiede sind in den ausführlichen Tabellen im Anhang im Gegensatz zu nicht signifikanten (n.s.) optisch hervorgehoben. Der Einfluss von HLA-Molekülen auf klinische Parameter wie zum Beispiel Fortschritt des Tumorstadiums,

Ausbildung von Lymphknotenmetastasen, sowie Ausbildung von Fernmetastasen wurde mittels Chi-Quadrat-Test, bzw. mittels *Fisher's Exact Test* (FET) bei Stichprobengröße $n < 5$ ermittelt. Der Zusammenhang von vorhandenem Genotyp und dem Auftreten von Fernmetastasen bei bereits positivem Lymphknotenstatus wurde mittels *Odds Ratio* berechnet. Das entsprechende 95% Konfidenzintervall (KI) ist jeweils angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 HLA-Typisierung der PTC-Patienten

Um eine Abhängigkeit vorliegender Tumorimmunität von HLA-Molekülen zu prüfen, wurde der HLA-DR und HLA-DQ Status der PTC-Patienten durch Genotypisierung erfasst und mit ihrem klinischen Verlauf, insbesondere mit den Inzidenzen von Lymphknoten- und Fernmetastasen, korreliert (s. Tab. 3.1).

| Kohorte | Lymphknotenmetastasen N0 [%] / N1 [%] (n=145) | Fernmetastasen M0 [%] / M1[%] (n = 132) | N1M0/N1M1 (n = 37) |
|--------------|--|--|--------------------------|
| Alle PTC | 97 [66,9 %] / 48 [33,1 %] | 122 [92,4 %] / 10 [7,6%] | 29 [78,4%] / 8 [21,6%] |
| DRB1*03 pos. | 16 [59,3 %] / 11 [40,7 %] | 20 [80 %] / 5 [20 %] | 6 [60 %] / 4 [40%] |
| neg. | 81 [68,6 %] / 37 [31,4 %] | 102 [95,3 %] / 5 [4,7 %] | 23 [85,2 %] / 4 [14,8 %] |
| DQB1*02 pos. | 27 [62,8 %] / 16 [37,2 %] | 33 [84,6 %] / 6 [15,4 %] | 8 [61,5 %] / 5 [38,5 %] |
| neg. | 70 [68,6 %] / 32 [31,4 %] | 89 [95,7 %] / 4 [4,3 %] | 21 [87,5 %] / 3 [12,5 %] |
| DQB1*03 pos. | 61 [68,5 %] / 28 [31,5 %] | 79 [97,5 %] / 2 [2,5 %] | 21 [95,5 %] / 1 [4,5 %] |
| neg. | 36 [64,3 %] / 20 [35,7 %] | 43 [84,3 %] / 8 [15,7 %] | 8 [53,3%] / 7 [46,7%] |

Tabelle 3.1 Inzidenz von Lymphknoten- und Fernmetastasen bei Patienten mit papillärem Schilddrüsenkarzinom (PTC) in Abhängigkeit der vorliegenden HLA-Allele. Insgesamt wurden n= 148 PTC-Patienten typisiert. N0 entspricht neg. Lymphknotenstatus, N1 Lymphknotenmetastasen, n = 3 [2%] waren Nx (Lymphknotenbefall nicht beurteilbar) klassifiziert und wurden für die Berechnungen exkludiert. M0 entspricht keinen Fernmetastasen, M1 diagnostizierte Fernmetastasen, n = 13 Patienten waren Mx (Fernmetastasenstatus nicht beurteilbar) klassifiziert und wurden für die Berechnungen exkludiert. Weiterhin Darstellung der Inzidenz von Fernmetastasen bei positivem Lymphknotenstatus, n = 11 wurden bei Mx Befund exkludiert

Von den insgesamt n = 148 typisierten PTC-Patienten wiesen drei einen nicht beurteilbaren Lymphknotenstatus auf, bei 13 weiteren war der Status der Fernmetastasierung nicht beurteilbar, so dass diese Patienten hinsichtlich der Berechnung der Inzidenzen von Lymphknotenmetastasen bzw. Fernmetastasen ausgeschlossen werden mussten. Hinsichtlich des Fortschritts des Tumorstadiums zeigt sich kein Zusammenhang zu HLA-DR bzw. -DQ Molekülen (Ergebnisse nicht dargestellt). Hinsichtlich der Eigenschaft der lymphatischen Metastasierung des PTC lässt sich ebenso kein signifikanter Zusammenhang mit einzelnen Genotypen in Verbindung bringen (vgl. Abb. 3.1-3.3). Anders verhält es sich mit der Ausbildung von Fernmetastasen. Hier zeigt sich, dass bei PTC-Patienten mit Genotyp HLA-DRB1*03 signifikant häufiger Fernmetastasen diagnostiziert wurden ($\chi^2(1) = 6,7, p = 0,022$, Abb.3.1). Ebenso weisen auch Patienten mit Merkmal DQB1*02 tendenziell häufiger

Fernmetastasen auf (*FET*, $p = 0,064$, Abb.3.2). Als gegensätzlich und damit protektiv erscheint das Merkmal *DRB1*03*. PTC-Patienten mit diesem HLA-Merkmal weisen signifikant seltener Fernmetastasen auf (*FET*, $p=0,014$, s. Abb.3.3) (vgl. [110]).

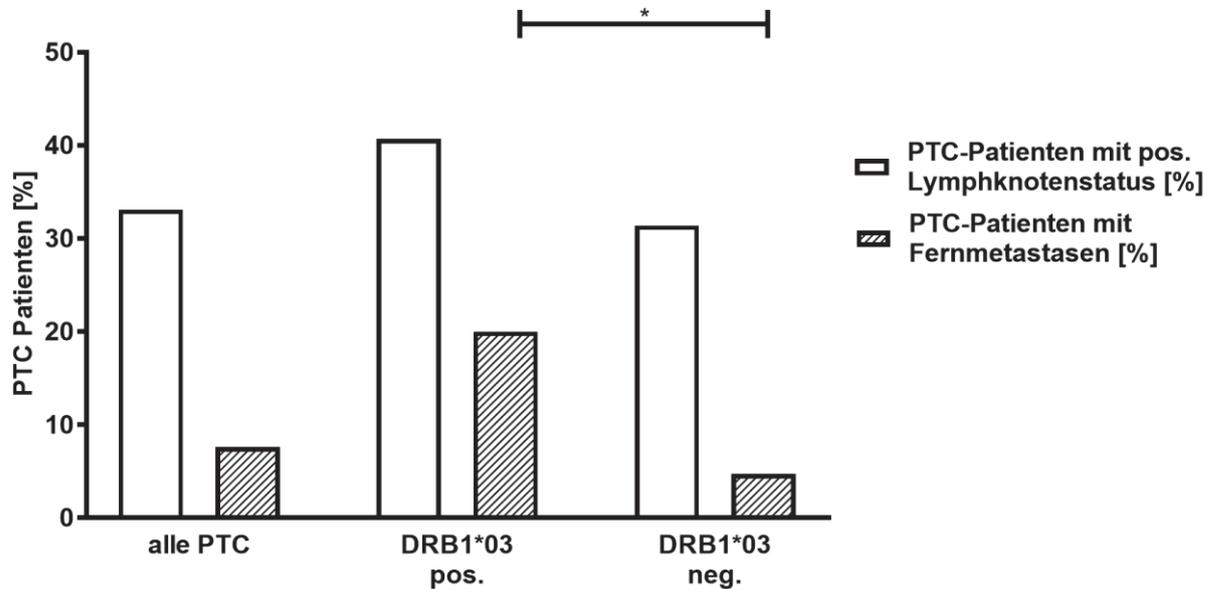


Abb. 3.1 Einfluss des Merkmals HLA-DRB1*03 auf die Metastasierungstendenz des PTCs Anteil der Patienten mit papillärem Schilddrüsenkarzinom (PTC) mit positivem Nachweis lymphatischer Metastasierung bzw. Fernmetastasen abhängig vom Vorhandensein des HLA-Allels DRB1*03; * = $p < 0,05$; vgl. [110]

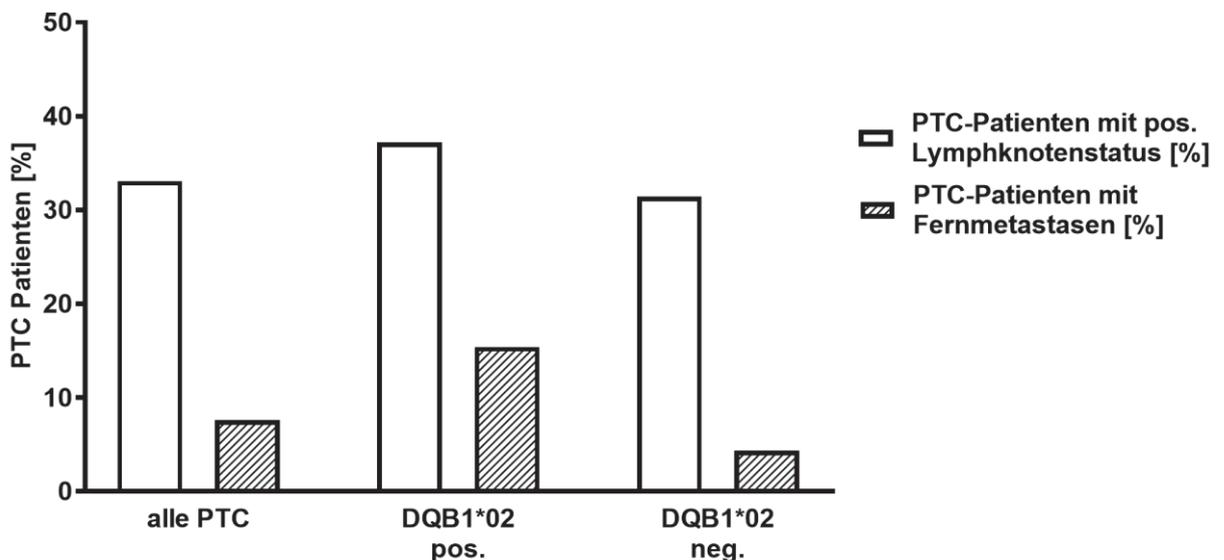


Abb. 3.2 Einfluss des Merkmals HLA-DQB1*02 auf die Metastasierungstendenz des PTCs Anteil der Patienten mit papillärem Schilddrüsenkarzinom (PTC) mit positivem Nachweis lymphatischer Metastasierung bzw. Fernmetastasen abhängig vom Vorhandensein des HLA-Allels DQB1*02; vgl. [110]

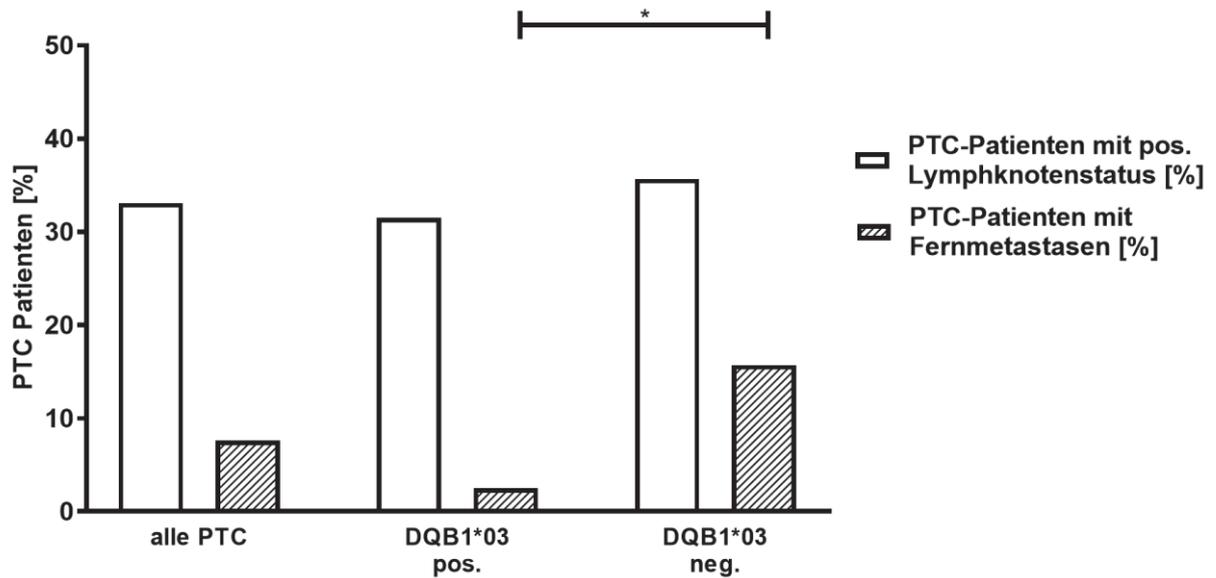


Abb. 3.3 **Einfluss des Merkmals HLA-DQB1*03 auf die Metastasierungstendenz des PTCs** Anteil der Patienten mit papillärem Schilddrüsenkarzinom (PTC) mit positivem Nachweis lymphatischer Metastasierung bzw. Fernmetastasen abhängig vom Vorhandensein des jeweiligen HLA-Allels DQB1*03; * = $p < 0,05$; vgl.[110]

Betrachtet man das gesamte PTC-Kollektiv so ist festzuhalten, dass das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen als signifikanter Risikofaktor für das Auftreten von Fernmetastasen anzusehen ist („odds ratio“ (OR) 12,69, [KI 2,55; 63,15]). Erfolgt diese Risikostratifizierung HLA-Merkmal-abhängig, zeigen sich deutliche Unterschiede bezüglich der Tendenz, bei positivem Lymphknotenstatus auch Fernmetastasen auszubilden (s. Abb. 3.4). Bemerkenswerter Weise sind bei ausgeprägtem HLA-DQB*03 Merkmal vorliegende Lymphknotenmetastasen kein signifikanter Risikofaktor für Fernmetastasen, diese Patienten zeigen eine deutlich geringere Neigung zur Organmetastasierung bei positivem Lymphknotenstatus (OR 2,7, [KI 0,16; 45,38]) als das gesamte PTC-Kollektiv. Hingegen ist das Fehlen dieses Merkmals mit einem drastisch erhöhten Risiko verbunden, bei positivem Lymphknotenstatus auch Fernmetastasen auszubilden (OR 30,625, [KI 3,28; 285,27]). Zusammenfassend zeigt sich bei den DQB1*03 neg. PTC-Patienten im Vergleich zu den DQB1*03 pos. PTC-Patienten ein 11,3 x höheres Risiko, bei pos. Lymphknotenstatus auch Organmetastasen aufzuweisen.

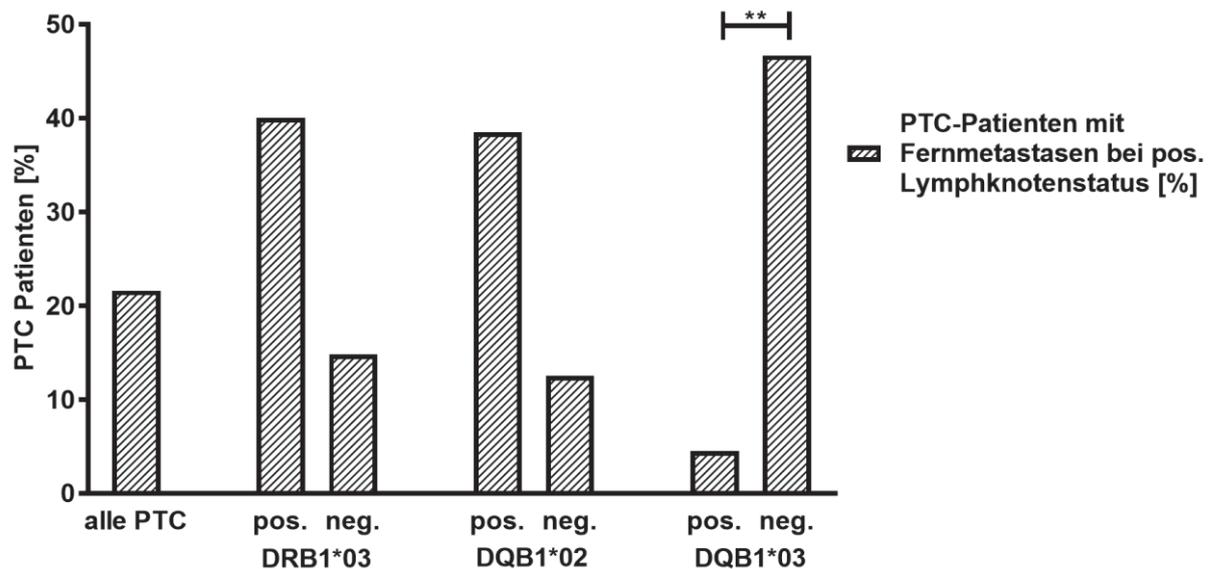


Abb. 3.4 **Vorkommen von Fernmetastasen bei positivem Lymphknotenstatus** Prozentualer Anteil der Patienten mit papillärem Schilddrüsenkarzinom (PTC), die bei positivem Lymphknotenstatus ebenfalls Fernmetastasen aufweisen, abhängig vom Vorhandensein der HLA-Allele DRB1*03, DQB1*02 und DQB1*03; ** $p < 0,01$

3.2 T-Zellsubpopulationsanalyse

Die nachfolgende Darlegung der Ergebnisse der T-Zellsubpopulationsanalyse beschränkt sich auf die Nennung signifikanter Unterschiede zwischen den untersuchten Kohorten. Im Text angeführte Daten werden, sofern nicht anders gekennzeichnet, als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt und sind jeweils als prozentuale Anteile angegeben.

Die Ergebnisse des kompletten Datensatzes sind im Anhang tabellarisch aufgeführt (Tab. 6.1 - 6.3). Eine Abhängigkeit der T-Zellsubpopulationsverhältnisse von den zuvor beschriebenen HLA-DR, bzw. HLA-DQ Merkmalen ließ sich an keiner Stelle nachweisen (Ergebnisse nicht dargestellt).

3.2.1 T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen

Bei Betrachtung der Th-Zellen und CTLs lässt sich kein wesentlicher Unterschied ihres Verhältnisses zwischen PTC-Patienten, HT-Patienten und Kontrollen feststellen (s. Abb. 3.5, 3.6). Ebenso wie der Anteil doppelnegativer T-Zellen zwischen den Kohorten keinen signifikanten Unterschied auf (nicht dargestellt). PTC-Patienten mit nachweisbarem Tg und somit mit V.a. ein aktives Karzinom weisen hingegen bemerkenswerterweise einen signifikant größeren Anteil zytotoxischer T-Zellen ($33,42 \% \pm 12,1 \%$) auf als PTCs mit Tg-Werten unterhalb der Nachweisgrenze ($27,55 \% \pm 8,89 \%$; $p < 0,05$, s. Abb.3.6). Außerdem liegt ein signifikant geringerer Anteil an T-Helferzellen bei Patienten mit nachweisbarem Tg ($55,87 \% \pm$

13,05 %) vor als bei PTC-Patienten mit Tg-Werten unterhalb der Nachweisgrenze (62,16 % \pm 9,67 %; $p < 0,05$, s. Abb.3.5).

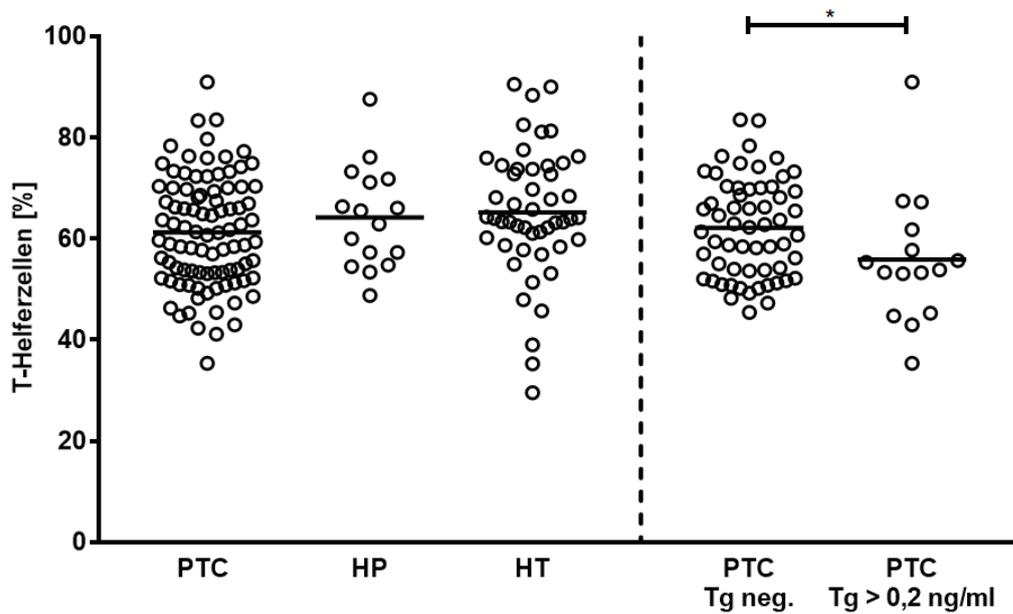


Abb. 3.5 **T-Helferzellen** Dargestellt ist der Anteil an T-Helferzellen bezogen auf die Gesamtheit der $\alpha\beta$ TCR+ T-Zellen in Abhängigkeit der Diagnosen PTC (papilläres Schilddrüsenkarzinom), HP (Kontrollkollektiv), Hashimoto Thyreoiditis (HT), bzw. innerhalb der PTC Kohorte in Abhängigkeit des Tumorstatus, respektive dem Nachweis von Thyreoglobulin (Tg neg. vs. Tg > 0,2 ng/ml); * $p < 0,05$

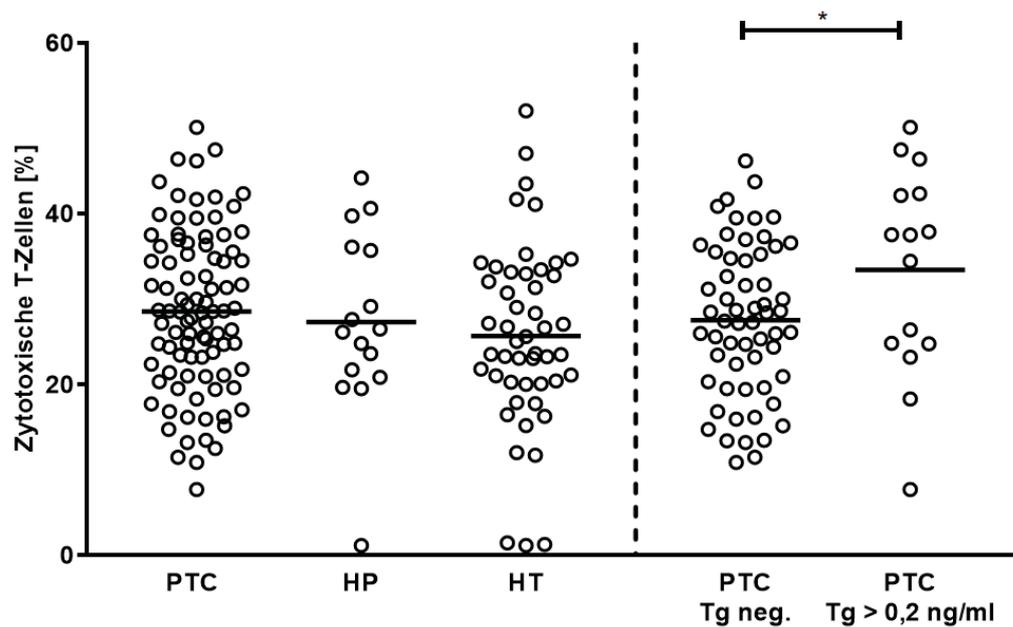


Abb. 3.6 **Zytotoxische T-Zellen** Dargestellt ist der Anteil an zytotoxischen T-Zellen bezogen auf die Gesamtheit der $\alpha\beta$ TCR+ T-Zellen in Abhängigkeit der Diagnosen PTC (papilläres Schilddrüsenkarzinom), HP (Kontrollkollektiv), Hashimoto Thyreoiditis (HT), bzw. innerhalb der PTC Kohorte in Abhängigkeit des Tumorstatus, respektive dem Nachweis von Thyreoglobulin (Tg neg. vs. Tg > 0,2 ng/ml); * $p < 0,05$

3.2.2 Verhältnisse der T-Helferzellen

Der Anteil an Th1-Zellen liegt bei PTCs deutlich niedriger (15,27 % ± 7,87 %) als bei HTs (18,86 % ± 6,49 %; $p < 0,01$) und leicht unter dem der HP (17,18 % ± 4,91 %, s. Abb. 3.7).

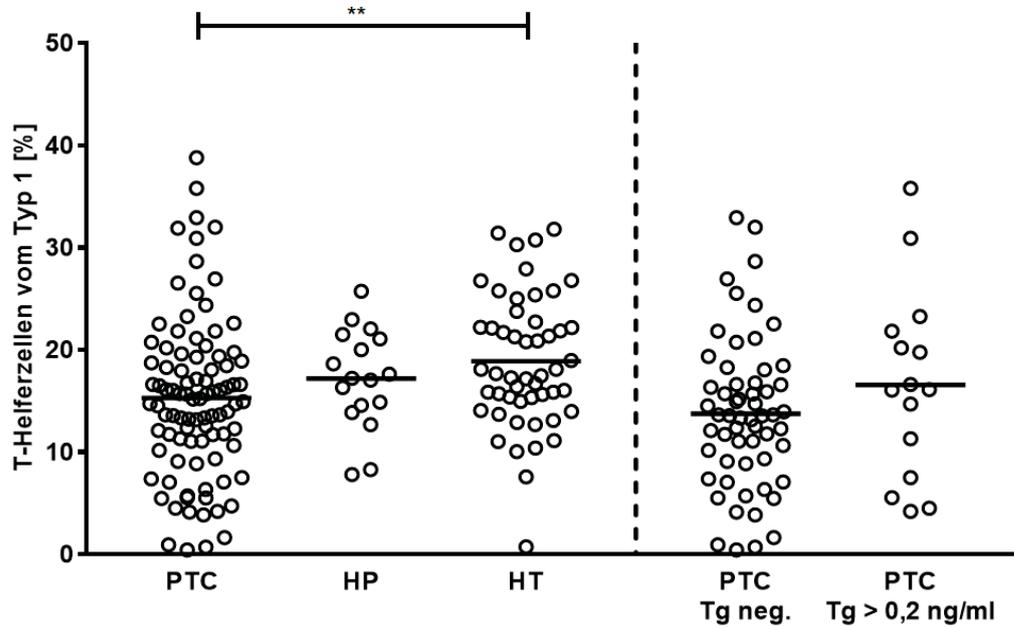


Abb. 3.7 **T-Helferzellen vom Typ 1 (Th1-Zellen)** Anteil an Th1-Zellen bezogen auf alle CD4+ T-Zellen jeweils in Abhängigkeit der Diagnosen PTC (papilläres Schilddrüsenkarzinom), HP (Kontrollkollektiv), Hashimoto Thyreoiditis (HT), bzw. innerhalb der PTC Kohorte in Abhängigkeit des Tumorstatus, respektive dem Nachweis von Thyreoglobulin (Tg neg. vs. Tg > 0,2 ng/ml); ** $p < 0,01$

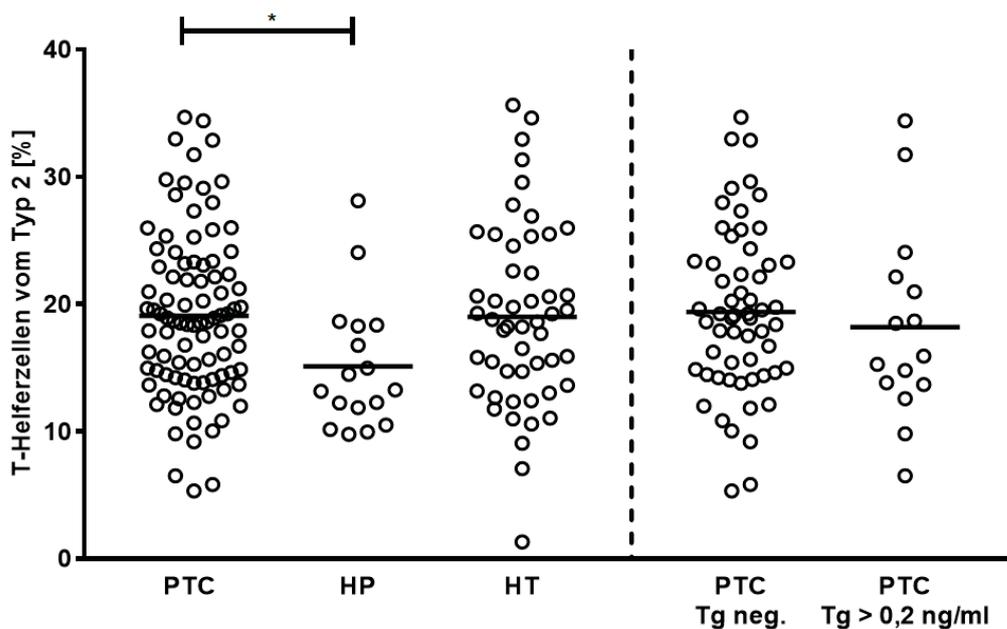


Abb. 3.8 **T-Helferzellen vom Typ 2 (Th2-Zellen)** Anteil an Th2 Zellen bezogen auf alle CD4+ T-Zellen jeweils in Abhängigkeit der Diagnosen PTC (papilläres Schilddrüsenkarzinom), HP (Kontrollkollektiv), Hashimoto Thyreoiditis (HT), bzw. innerhalb der PTC Kohorte in Abhängigkeit des Tumorstatus, respektive dem Nachweis von Thyreoglobulin (Tg neg. vs. Tg > 0,2 ng/ml); * $p < 0,05$

Dagegen weisen PTCs deutlich mehr Th2-Zellen ($19,09 \% \pm 6,44 \%$) auf als HP ($15,11 \% \pm 5,12 \%$, $p < 0,01$, Abb. 3.8). Fasst man diese Ergebnisse zusammen, weisen PTCs gegenüber Kontrollen einen signifikanten *Shift* des Th1/Th2 Verhältnisses hin zu Th2-Zellen auf ($p < 0,05$).

3.2.3 Regulatorische T-Zellen

PTCs weisen einen signifikant höheren Anteil ($0,73 \% \pm 0,9 \%$) an Treg-Zellen auf als HTs ($0,09 \% \pm 0,12 \%$) und Schilddrüsengesunde ($0,07 \% \pm 0,08 \%$; $p < 0,001$, s. Abb. 3.9). Differenziert man die PTC Kohorte weiter, so bestehen hingegen sowohl hinsichtlich des aktuellen Tumorstatus (Tg neg. vs. Tg $> 0,2$ ng/ml), als auch hinsichtlich des Auftretens von Metastasen (nicht abgebildet) keine signifikanten Unterschiede die Treg-Zellen betreffend (s. Anhang Tab. 6.2, 6.3).

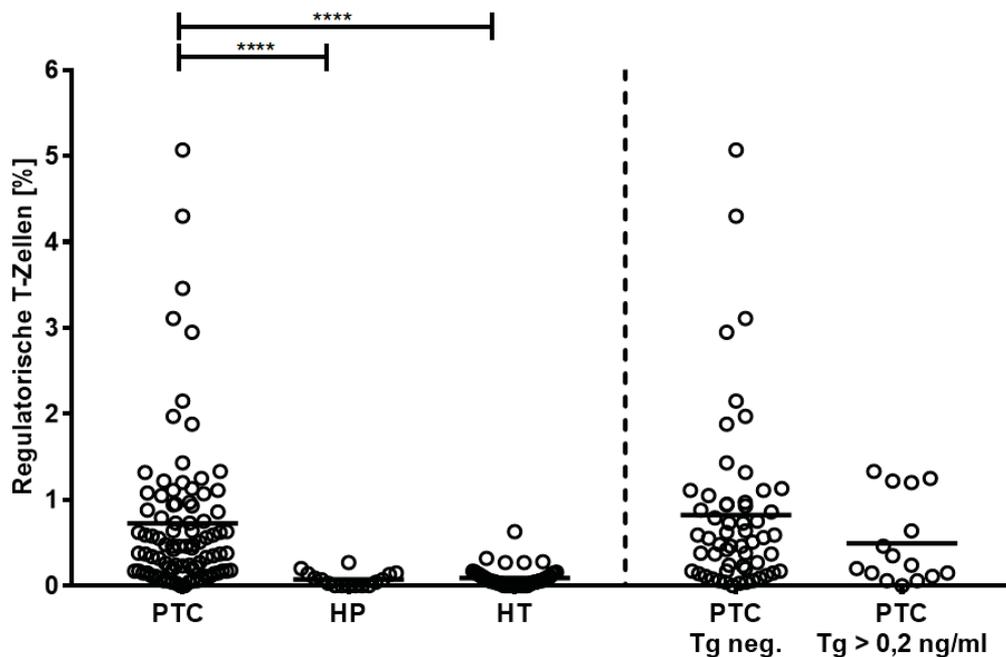


Abb. 3.9 **Regulatorische T-Zellen** Anteil der regulatorischen T-Zellen bezogen auf die Gesamtheit der $\alpha\beta$ TCR+ T-Zellen jeweils in Abhängigkeit der Diagnosen PTC (papilläres Schilddrüsenkarzinom), HP (Kontrollkollektiv), Hashimoto Thyreoiditis (HT), bzw. innerhalb der PTC Kohorte in Abhängigkeit des Tumorstatus, respektive dem Nachweis von Thyreoglobulin (Tg neg. vs. Tg $> 0,2$ ng/ml); **** $p < 0,0001$

3.2.4 Erschöpfte T-Zellen

Erschöpfte T-Helferzellen (*exhausted T cells*) finden sich anteilsweise signifikant seltener bei PTCs ($0,44 \% \pm 0,29 \%$) als bei HTs ($2,24 \% \pm 4,87 \%$; $p < 0,001$) und Kontrollen ($1,15 \% \pm 1,08 \%$; $p < 0,01$, s. Abb. 3.10). Im Gegensatz dazu finden sich jedoch hochsignifikant mehr erschöpfte CTLs bei den PTCs ($1,33 \% \pm 0,91 \%$) als bei HTs ($0,39 \% \pm 0,34 \%$) und der Kontrollgruppe ($0,37 \% \pm 0,25 \%$; $p < 0,0001$, s. Abb 3.11). Bemerkenswert ist, dass der

zwischen aktiven und PTCs in Remission nachgewiesene signifikante Unterschied der allgemeinen CTLs nicht bei den erschöpften CTLs nachzuweisen ist.

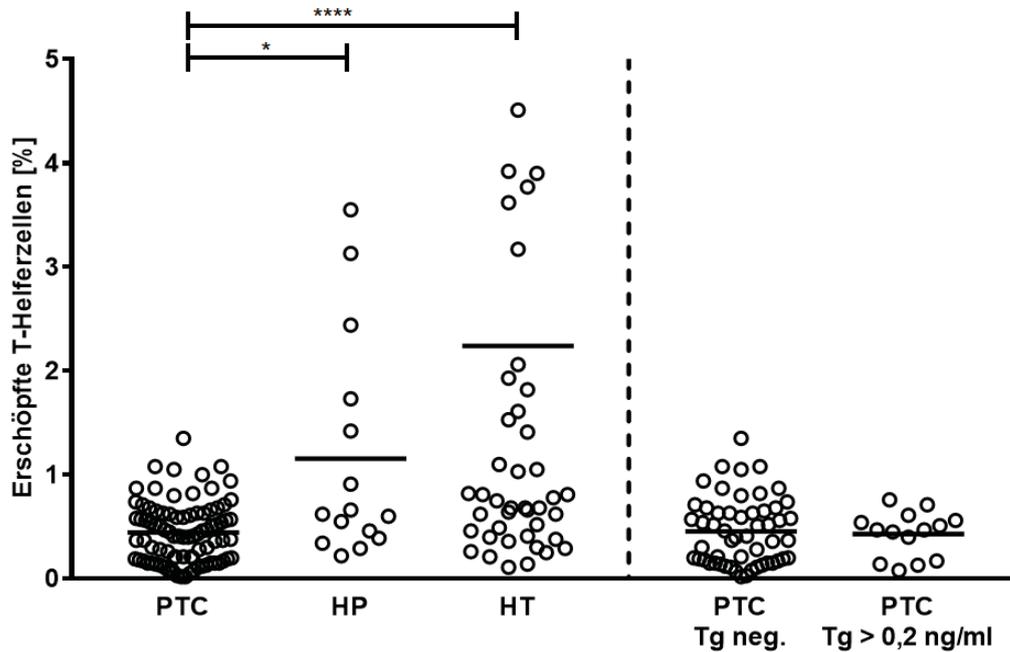


Abb. 3.10 **Erschöpfte T-Helferzellen** Anteil erschöpfter T-Helferzellen bezogen auf alle der $\alpha\beta$ TCR+ T-Zellen, in Abhängigkeit der Diagnosen PTC (papilläres Schilddrüsenkarzinom), HP (Kontrollkollektiv), Hashimoto Thyreoiditis (HT), bzw. innerhalb der PTC Kohorte in Abhängigkeit des Tumorstatus, respektive dem Nachweis von Thyreoglobulin (Tg neg. vs. Tg > 0,2 ng/ml); * p < 0,05; **** p < 0,0001

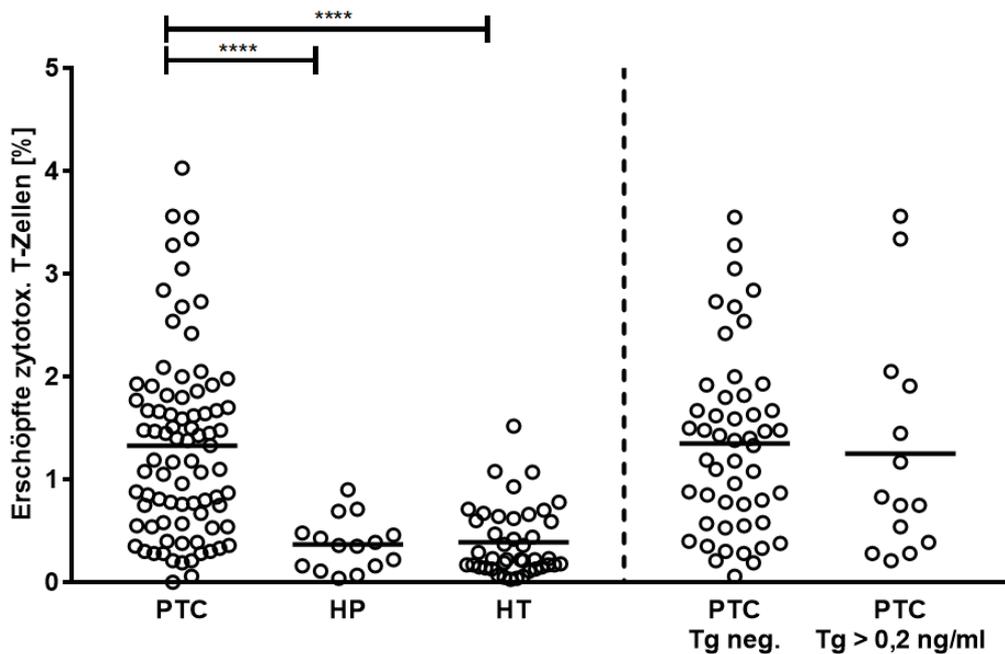


Abb. 3.11 **Erschöpfte zytotoxische T-Zellen** Anteil erschöpfter zytotoxischer T-Zellen (CTLs) bezogen auf alle $\alpha\beta$ TCR+ T-Zellen, in Abhängigkeit der Diagnosen PTC (papilläres Schilddrüsenkarzinom), HP (Kontrollkollektiv), HT (Hashimoto Thyreoiditis), bzw. innerhalb der PTC Kohorte in Abhängigkeit des Tumorstatus, respektive dem Nachweis von Thyreoglobulin (Tg neg. vs. Tg > 0,2 ng/ml); **** p < 0,0001

3.2.5 $\Gamma\delta$ T-Zellen

Bei Analyse der $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den Kohorten (s. Abb. 3.12). PTCs ($8,84 \% \pm 6,18 \%$) weisen einen hochsignifikant größeren Anteil an $\gamma\delta$ T-Zellen auf als HT-Patienten ($6,09 \% \pm 5,03 \%$; $p < 0,001$). Der ermittelte Anteil bei HP liegt unter dem bei HT ($5,94 \% \pm 2,75 \%$, n.s.).

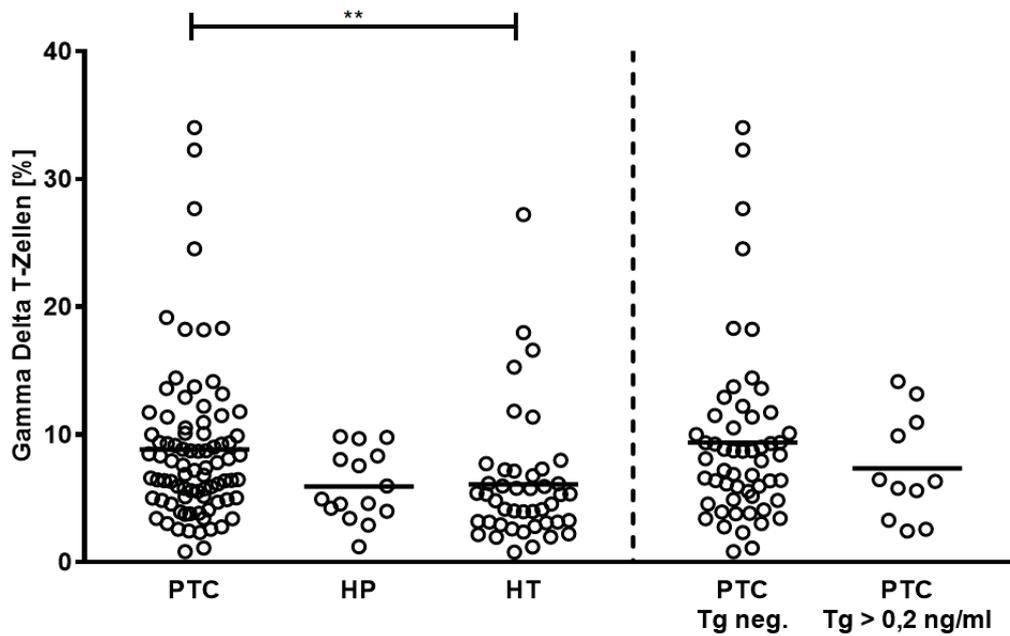


Abb. 3.12 **$\Gamma\delta$ T-Zellen** Anteil an $\gamma\delta$ T-Zellen im peripheren Blut, jeweils in Abhängigkeit der Diagnosen PTC (papilläres Schilddrüsenkarzinom), HP (Kontrollkollektiv), HT (Hashimoto Thyreoiditis), bzw. innerhalb der PTC Kohorte in Abhängigkeit des Tumorstatus, respektive dem Nachweis von Thyreoglobulin (Tg neg. vs. Tg > 0,2 ng/ml); ** $p < 0,01$

3.3 Schilddrüsen-spezifische zytotoxische T-Zellen

Im Blut von HT-Patienten wurden bereits zytotoxische T-Zellen nachgewiesen, die Epitope der Schilddrüsen-spezifischen Proteine TPO und Tg als Zielstruktur erkennen [90]. Weiterhin wurde ein zytotoxisches Potenzial dieser Zellen gegenüber Thyreozyten gezeigt [90]. Um die Frage nach dem Vorliegen einer gezielten Schilddrüsen-spezifischen Immunität auf Ebene der zytotoxischen T-Zellen im Sinne einer Antitumorimmunität auch bei PTC-Patienten zu beantworten, wurde der Anteil Schilddrüsen-spezifische Epitope erkennender CTLs bei PTC-Patienten analysiert. Ebenfalls wurden diese bei HT-Patienten erneut erfasst und beide Kollektive mit einem Kontrollkollektiv verglichen. Das Ergebnis der differenzierten Epitopanalyse ist in Abb. 3.13 dargestellt.

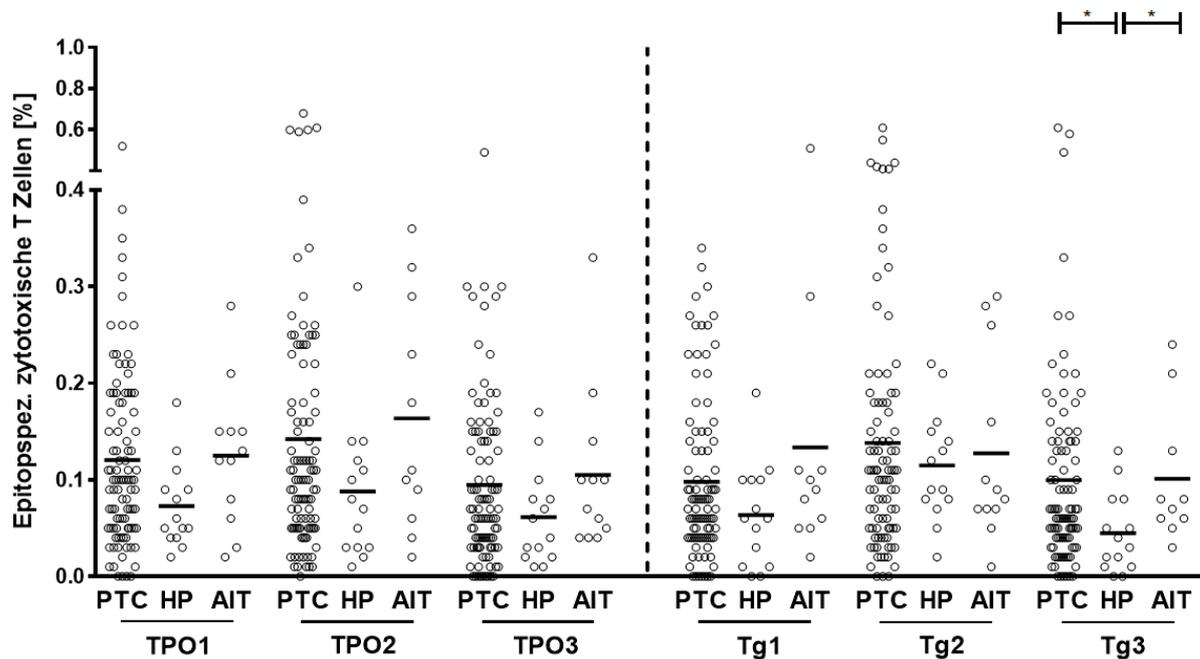


Abb. 3.13 **Epitopspezifische zytotoxische T-Zellen** Anteil der epitopspezifischen zytotoxischen T-Zellen je analysiertes Epitop, jeweils in Abhängigkeit der Diagnosen PTC (papilläres Schilddrüsenkarzinom), HP (Kontrollkollektiv) und HT (Hashimoto Thyreoiditis); * $p < 0,05$; vgl.[110]

Das Epitop Tg3 zeigt trotz geringer Fallzahlen in den HT ($n = 10$) und HP ($n = 14$) Kohorten einen signifikanten Unterschied. PTC-Patienten ($n = 96$) weisen signifikant mehr Tg3-spezifische zytotoxische T-Zellen auf als Gesunde (PTC $0,1 \pm 0,1$; HP $0,05 \pm 0,04$, $p = 0,039$). Weiterhin ist der Anteil der Tg3 positiven CTLs bei PTCs vergleichbar mit dem der HT. Somit unterscheiden sich sowohl PTC, als auch HT signifikant von der Kontrollgruppe (HT $0,1 \pm 0,07$, $p = 0,04$). Der Anteil der in Summe TPO-spezifischen CTLs ist zusammengefasst tendenziell höher bei PTCs ($0,36 \pm 0,26$) als bei den Kontrollen ($0,22 \pm 0,10$) und ähnelt somit eher dem der HT-Patienten ($0,41 \pm 0,26$) (n.s., nicht abgebildet). Bei den Tg-spezifischen CTLs zeigt sich ein ähnliches Bild, hier liegt der Anteil der Tg-spezifischen CTLs bei PTCs ($0,33 \pm 0,24$)

tendenziell über dem der HP ($0,22 \pm 0,11$, n.s., nicht abgebildet) und unter dem der HT ($0,38 \pm 0,22$). Die Summe der TPO- und Tg Spezifischen CTLs ist in Abb. 3.14 dargestellt.

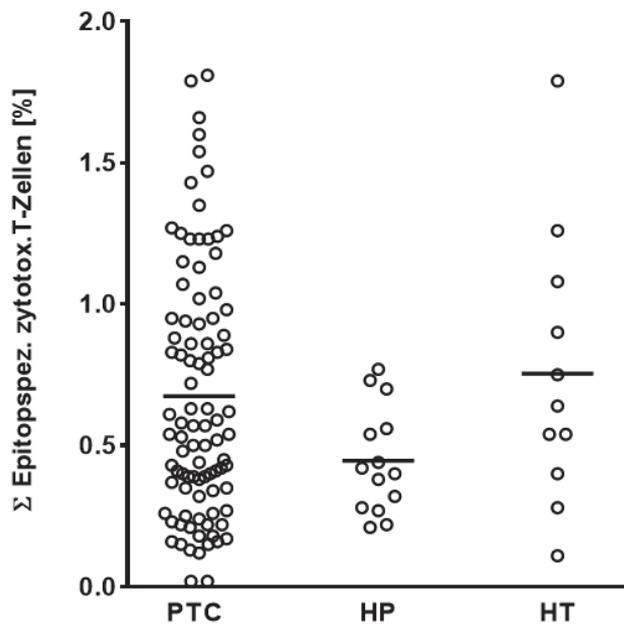


Abb. 3.14 **Summe der TPO und Tg epitopspezifischen zytotoxischen T-Zellen** Anteil der TPO1-3 und Tg1-3 spezifischen zytotoxischen T-Zellen in Summe bezogen auf die Gesamtheit der CTLs, jeweils in Abhängigkeit der Diagnosen PTC (papilläres Schilddrüsenkarzinom), HP (Kontrollkollektiv) und HT (Hashimoto Thyreoiditis)

3.4 Proliferation Schilddrüsen-spezifischer T-Zellen

TPO und Tg epitopspezifische T-Zellen bilden sowohl bei HT-Patienten als auch bei PTC-Patienten eine sehr kleine Fraktion der peripheren CTLs (vgl. Abb. 3.13). Um einen besseren Nachweis dieser Zellen zu erlangen, wurde das Proliferationsverhalten dieser T-Zellen von PTC-Patienten (n = 39) nach Inkubation mit TPO und Tg Epitopen analysiert [110]. Nach 20h Inkubation mit den entsprechenden Epitopen ist der Anteil der epitopspezifischen Zellen bei nahezu allen Epitopen signifikant um etwa das Dreifache erhöht (TPO Sum $0,93 \pm 0,73$, stimuliert TPO Sum $2,8 \pm 3,8$, $p < 0,001$; Tg Sum $0,77 \pm 0,40$, stimuliert Tg Sum $2,39 \pm 3,25$ $p < 0,001$; vgl. Abb. 3.15, Abb. 3.16). Um unspezifisches Proliferationsverhalten zu erfassen, wurden Zellen einiger Proben (n = 16) zusätzlich mit Ovalbumin inkubiert [110]. In der abhängigen Stichprobenanalyse lassen sich keine signifikanten Unterschiede im Proliferationsverhalten nachweisen, im Gesamtvergleich der Kollektive zeigt sich signifikant weniger Proliferation nach Stimulation mit Ovalbumin als mit Tg bzw. TPO Peptiden.

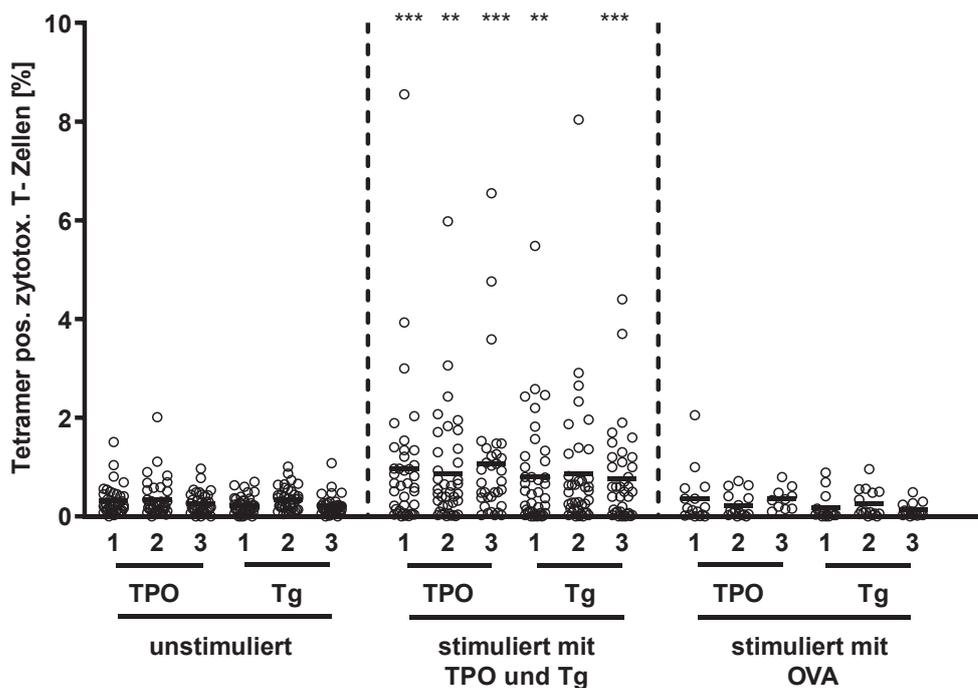


Abb. 3.15 **Proliferationsanalyse epitopspezifischer zytotoxischer T-Zellen bei PTC-Patienten** Anteil der TPO1/TPO2/TPO3 bzw. Tg1/Tg2/Tg3 spezifischen CD8+ Zellen bei PTCs. Tetrameranalyse erfolgte vor und nach Stimulation mit den den Epitopen entsprechenden TPO und Tg Peptiden; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; vgl. [110]

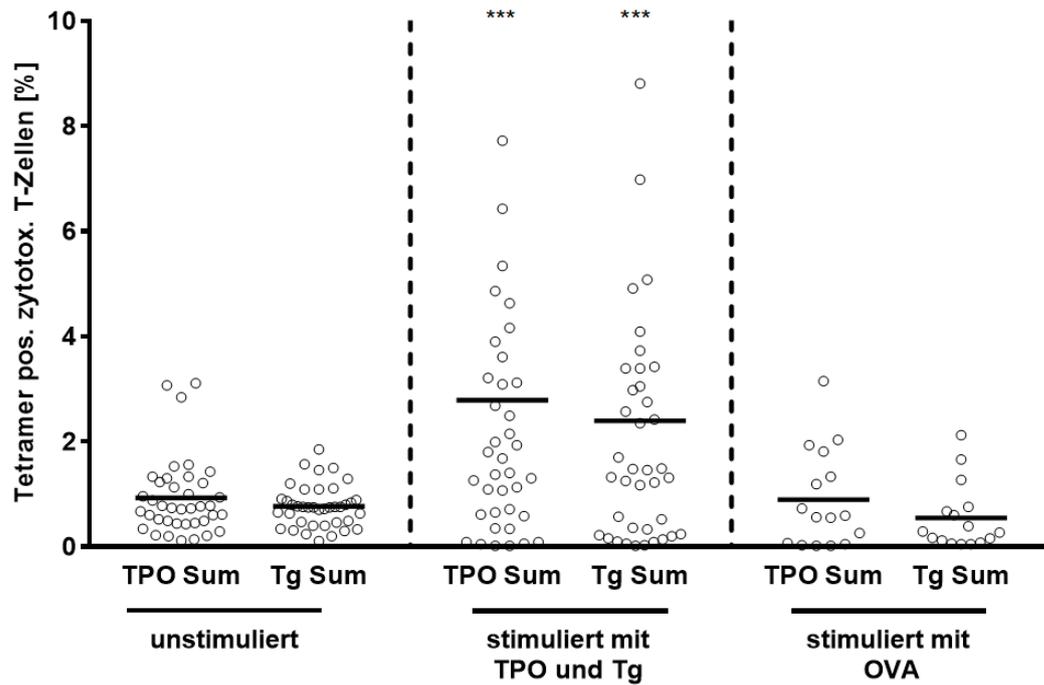


Abb. 3.16 **Proliferationsanalyse, Summe epitopspezifischer zytotoxischer T-Zellen bei PTC-Patienten** Summe der Thyreoperoxidase (Epitope TPO1+TPO2+TPO3) bzw. der Thyreoglobulin (Epitope Tg1+Tg2+Tg3) spezifischen zytotoxischen T-Zellen bei Patienten mit papillärem Schilddrüsenkarzinom (PTC) vor und nach Stimulation mit den Epitopen entsprechenden TPO und Tg Epitopen, bzw. nach Stimulation mit Kontrollpeptid Ovalbumin (OVA); *** $p < 0,001$

3.5 Einfluss des HLA-Phänotyps auf Proliferation Schilddrüsen-spezifischer T-Zellen

Die in Abb. 3.15 bzw. Abb. 3.16 dargestellten Ergebnisse wurden weiterhin in Abhängigkeit der zuvor beschriebenen HLA-Merkmale DRB1*03, DQB1*02 und DQB1*03 ausgewertet. Dabei zeigt sich, dass das Merkmal DRB1*03 lediglich signifikantes Proliferationsverhalten bei zwei Epitopen der Thyreoidperoxidase aufweist (vor Stimulation TPO1 $0,28 \pm 0,361$; TPO2 $0,1867 \pm 0,1629$; nach Stimulation TPO1 $1,007 \pm 0,289$; TPO2 $1,153 \pm 0,568$, $p < 0,05$; s. Abb. 3.17; s. Tabelle 3.2). Bei den Epitopen TPO3 und Tg1-3 sind nicht signifikant mehr epitopspezifische T-Zellen nach erfolgter Stimulation vorhanden. Hingegen weisen HLA-DRB1*03 negative PTC-Patienten bei allen getesteten Epitopen eine signifikante Proliferation auf. Für den Genotyp HLA-DRB1*03 lässt sich dementsprechend zusammenfassen, dass er im klinischen Verlauf häufiger Fernmetastasen aufweist (Abb. 3.1) und im Proliferationsverhalten eine schwächere Proliferation epitopspezifischer T-Zellen zeigt (Abb. 3.17).

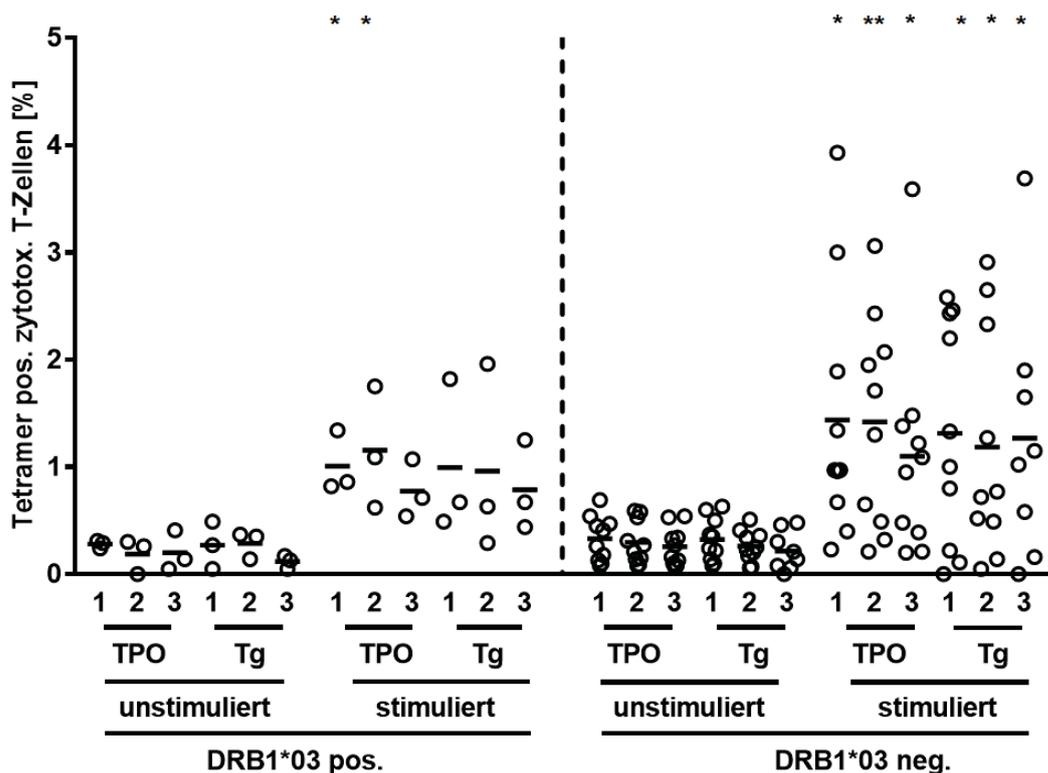


Abb. 3.17 **Proliferationsverhalten epitopspezifischer zytotoxischer T-Zellen bei PTC-Patienten in Abhängigkeit des Merkmals DRB1*03** Abgebildet sind die Anteile epitopspezifischer T-Zellen (TPO1/TPO2/TPO3 bzw. Tg1/Tg2/Tg3) vor und nach Stimulation mit TPO (Thyreoperoxidase) und Tg (Thyreoglobulin) Epitopen bei HLA-DRB1*03 pos. gegenüber HLA-DRB1*03 neg. Patienten mit papillärem Schilddrüsenkarzinom (PTC); * = $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

| Epitop | DRB1*03 pos. | DRB1*03 pos. stimuliert | p-Wert [KI] | DRB1*03 neg. | DRB1*03 neg. stimuliert | p-Wert [KI] |
|--------|--------------|-------------------------|-----------------------------|--------------|-------------------------|----------------------------|
| TPO1 | 0,28 ± 0,04 | 1,01 ± 0,29 | 0,046 [0,03;1,42] | 0,33 ± 0,21 | 1,44 ± 1,19 | 0,098 |
| TPO2 | 0,19 ± 0,16 | 1,15 ± 0,57 | 0,06 [-0,11; 2,04] | 0,29 ± 0,20 | 1,42 ± 0,98 | 0,01 [0,37;1,87] |
| TPO3 | 0,2 ± 0,19 | 0,77 ± 0,27 | 0,02 [0,20;0,95] | 0,26 ± 0,18 | 1,1 ± 1,0 | 0,098 |
| Tg1 | 0,27 ± 0,22 | 0,99 ± 0,72 | 0,16 [-0,67;2,12] | 0,32 ± 0,20 | 1,31 ± 1,04 | 0,02 [0,16;1,81] |
| Tg2 | 0,29 ± 0,13 | 0,96 ± 0,88 | 0,36 [-182;3,17] | 0,26 ± 0,15 | 1,19 ± 1,06 | 0,0098 |
| Tg3 | 0,12 ± 0,06 | 0,79 ± 0,42 | 0,09 [-0,23;1,57] | 0,22 ± 0,18 | 1,27 ± 1,18 | 0,046 |

Tabelle 3.2 Proliferationsverhalten epitopspezifischer zytotoxischer T-Zellen bei PTC-Patienten in Abhängigkeit des HLA-Merkmals DRB1*03 Aufgeführt sind tabellarisch die Mittelwerte ± Standardabweichungen der jeweiligen epitopspezifischen zytotoxischen T-Zellen vor und nach Stimulation mit TPO (Thyreoperoxidase) und Tg (Thyreoglobulin) Epitopen sowie das mittels t-test (bzw. Wilcoxon-Test) ermittelte Signifikanzniveau

Das Proliferationsverhalten des Merkmals HLA-DQB1*02 ähnelt dem des Merkmals HLA-DRB1*03. Es zeigt eine etwas stärkere Proliferation für das Epitop Tg3, jedoch keine signifikante Proliferation bei Tg1 und Tg2 (s. Abb. 3.18; s. Tab. 3.3).

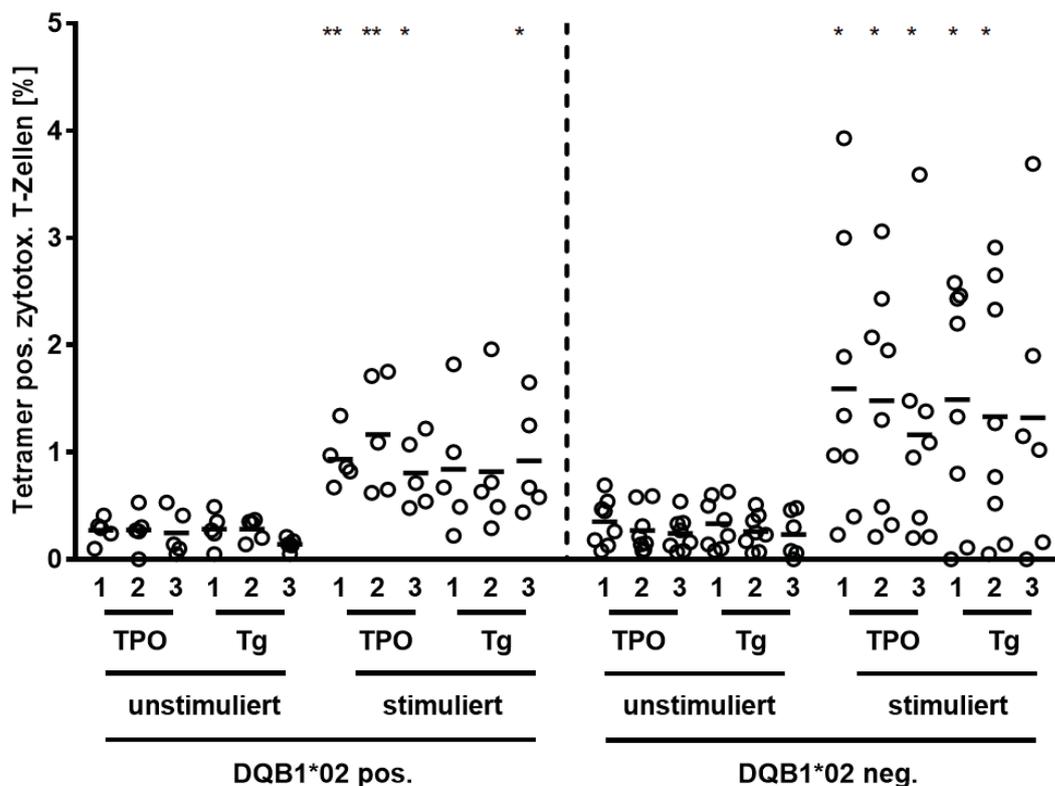


Abb. 3.18 Proliferationsverhalten epitopspezifischer zytotoxischer T-Zellen bei PTC-Patienten in Abhängigkeit des Merkmals DQB1*02 Abgebildet sind die Anteile epitopspezifischer T-Zellen (TPO1/TPO2/TPO3 bzw. Tg1/Tg2/Tg3) vor und nach Stimulation mit TPO und Tg Epitopen bei HLA-DQB1*02 pos. gegenüber HLA-DQB1*02 neg. Patienten mit papillärem Schilddrüsenkarzinom (PTC)
* = $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Bei HLA-DQB1*02 negativen PTC-Patienten lässt sich dagegen eine signifikante Proliferation bei sowohl allen TPO Epitopen als auch zwei Tg Epitopen feststellen. Zusätzlich liegen im Mittel mehr epitopspezifische T-Zellen nach Stimulation vor (n.s). In der Zusammenschau zeigt dementsprechend auch dieser Genotyp im klinischen Verlauf häufiger Fernmetastasen (vgl. Abb. 3.2) und weist bei weniger der getesteten Epitope ein signifikantes Proliferationsverhalten auf als DQB1*02 negative Patienten.

| Epitop | DQB1*02 pos. | DQB1*02 pos. stimuliert | p-Wert [KI] | DQB1*02 neg. | DQB1*02 neg. stimuliert | p-Wert [KI] |
|--------|--------------|-------------------------|------------------------------|--------------|-------------------------|----------------------------|
| TPO1 | 0,27 ± 0,11 | 0,93 ± 0,25 | 0,008 [0,28;1,04] | 0,35 ± 0,22 | 1,59 ± 1,29 | 0,04 [0,04;2,44] |
| TPO2 | 0,27 ± 0,19 | 1,16 ± 0,55 | 0,0096 [0,36;1,42] | 0,27 ± 0,21 | 1,48 ± 1,01 | 0,02 |
| TPO3 | 0,25 ± 0,21 | 0,8 ± 0,33 | 0,04 [0,03;1,09] | 0,24 ± 0,16 | 1,16 ± 1,01 | 0,02 |
| Tg1 | 0,28 ± 0,16 | 0,84 ± 0,62 | 0,09 [-0,13;1,25] | 0,33 ± 0,23 | 1,49 ± 1,08 | 0,03 [0,14;2,18] |
| Tg2 | 0,28 ± 0,1 | 0,82 | 0,18 [-0,38;1,45] | 0,26 ± 0,16 | 1,33 ± 1,15 | 0,03 [0,11;2,03] |
| Tg3 | 0,14 ± 0,06 | 0,92 ± 0,51 | 0,03 [0,16;1,4] | 0,23 ± 0,21 | 1,32 ± 1,35 | 0,11 [-0,38;2,56] |

Tabelle 3.3 Proliferationsverhalten epitopspezifischer zytotoxischer T-Zellen bei PTC-Patienten in Abhängigkeit des HLA-Merkmals DQB1*02 Aufgeführt sind tabellarisch die Mittelwerte ± Standardabweichungen der jeweiligen epitopspezifischen zytotoxischen T-Zellen vor und nach Stimulation mit TPO (Thyreoperoxidase) und Tg (Thyreoglobulin) Epitopen sowie das mittels t-test (bzw. Wilcoxon-Test) ermittelte Signifikanzniveau

Demgegenüber ist bei vorliegendem Merkmal HLA-DQB1*03 ein signifikant stärkeres Proliferationsverhalten epitopspezifischer T-Zellen zu beobachten. Bei diesen Patienten liegen nach der Stimulation bei allen gestesteten Epitopen im Mittel mindestens viermal so viele epitopspezifische T-Zellen vor als zu Beginn, bei allen Epitopen lässt sich somit ein signifikantes Proliferationsverhalten feststellen (Abb. 3.19, Tab 3.4). Patienten, die das Merkmal DQB1*03 nicht tragen, zeigen deutlich niedrigere Mittelwerte der epitopspezifischen T-Zellen und bei keinem Epitop ein signifikantes Proliferationsverhalten [110]. DQB1*03 pos. PTC-Patienten weisen somit das stärkste Proliferationsverhalten der epitopspezifischen CTLs auf und bilden am seltensten Fernmetastasen aus (s. Abb 3.3). Zusammenfassend scheint die Fähigkeit der Proliferation epitopspezifischer T-Zellen nach erfolgter Stimulation mit Schilddrüsen-spezifischen Peptidfragmenten abhängig von vorhandenen HLA-Merkmalen zu sein.

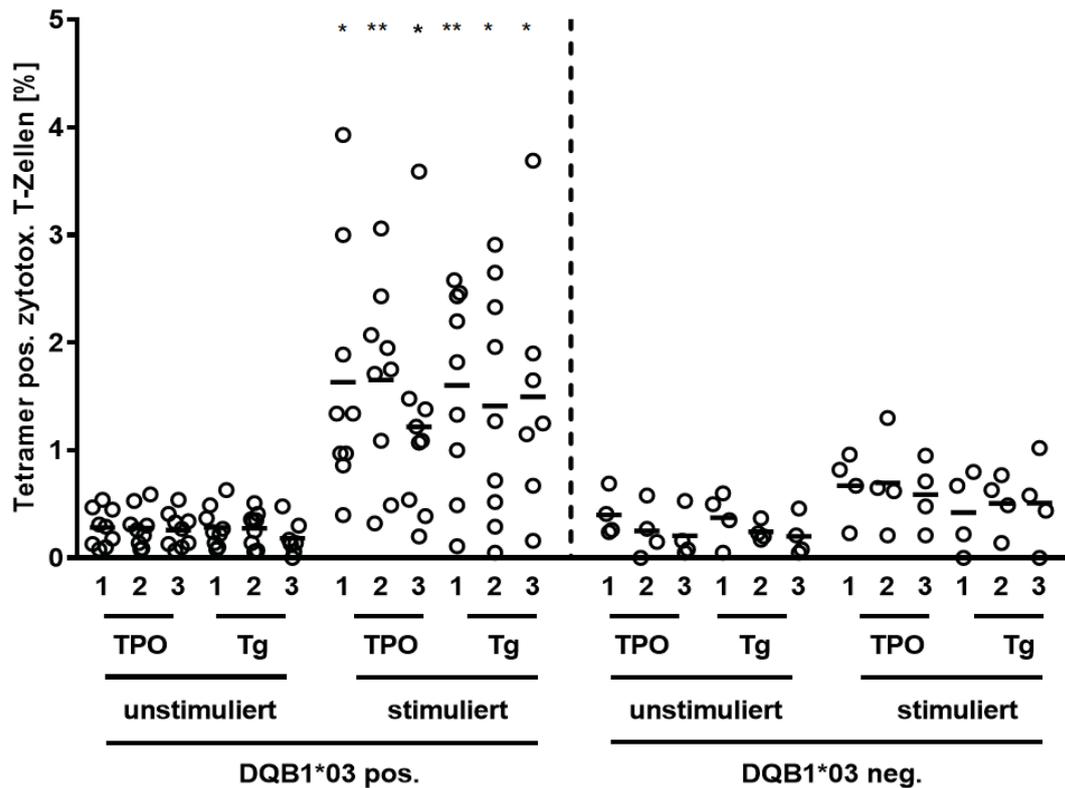


Abb. 3.19 **Proliferationsverhalten epitopspezifischer zytotoxischer T-Zellen bei PTC-Patienten in Abhängigkeit des HLA-Merkmals DQB1*03** Abgebildet sind die Anteile epitopspezifischer T-Zellen (TPO1/TPO2/TPO3 bzw. Tg1/Tg2/Tg3) vor und nach Stimulation mit TPO und Tg Epitopen bei HLA-DQB1*03 pos. gegenüber HLA-DQB1*03 neg. Patienten mit papillärem Schilddrüsenkarzinom (PTC) * = $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; vgl. [110]

| Epitop | DQB1*03 pos. | DQB1*03 pos. stimuliert | p-Wert [KI] | DQB1*03 neg. | DQB1*03 neg. stimuliert | p-Wert [KI] |
|--------|--------------|-------------------------|-----------------------------|--------------|-------------------------|----------------------|
| TPO1 | 0,28 ± 0,17 | 1,63 ± 1,14 | 0,01 [0,39;2,3] | 0,4 ± 0,21 | 0,67 ± 0,32 | 0,12 [-0,13;0,66] |
| TPO2 | 0,28 ± 0,18 | 1,65 ± 0,89 | 0,003 [0,62;2,13] | 0,25 ± 0,25 | 0,7 ± 0,45 | 0,06 [-0,02;0,91] |
| TPO3 | 0,26 ± 0,26 | 1,21 ± 1 | 0,008 | 0,21 ± 0,22 | 0,59 ± 0,32 | 0,16 [-0,26;1,02] |
| Tg1 | 0,28 ± 0,18 | 1,60 ± 0,91 | 0,004 [0,57;2,06] | 0,38 ± 0,24 | 0,42 ± 0,38 | 0,85 [-0,71;0,81] |
| Tg2 | 0,28 ± 0,16 | 1,41 ± 1,08 | 0,02 [0,27;2] | 0,24 ± 0,09 | 0,51 ± 0,27 | 0,11 [-0,11;0,64] |
| Tg3 | 0,18 ± 0,16 | 1,5 ± 1,13 | 0,03 [0,22;2,4] | 0,2 ± 0,19 | 0,51 ± 0,42 | 0,11 [-0,13;0,75] |

Tabelle 3.4 **Proliferationsverhalten epitopspezifischer zytotoxischer T-Zellen bei PTC-Patienten in Abhängigkeit des HLA-Merkmals DQB1*03** Aufgeführt sind tabellarisch die Mittelwerte ± Standardabweichungen der jeweiligen epitopspezifischen zytotoxischen T-Zellen vor und nach Stimulation mit TPO (Thyreoperoxidase) und Tg (Thyreoglobulin) Epitopen sowie das mittels t-test (bzw. Wilcoxon-Test) ermittelte Signifikanzniveau

Fasst man die Ergebnisse der Korrelation der HLA-Merkmale mit dem klinischen Verlauf des PTCs (vgl. Kap. 3.1) und des Proliferationsexperimentes zusammen, lassen sich folgende

Schlussfolgerungen ziehen: Bei Ausprägung des Merkmals HLA-DQB1*03 weisen PTC-Patienten deutlich seltener Fernmetastasen auf, im Blut vorhandene Schilddrüsen-spezifische T-Zellen proliferieren stärker bei diesen Patienten als bei Patienten ohne dieses Merkmal. Patienten mit Merkmal HLA-DRB1*03 und -DQB1*02 weisen deutlich häufiger Fernmetastasen auf, im Blut vorhandene Schilddrüsen-spezifische T-Zellen proliferieren schwächer als bei Patienten ohne Ausprägung dieser Merkmale.

4 Diskussion

4.1 Protektivität des HLA-DQB1*03 Phänotyps gegenüber Fernmetastasen

Die starke lymphozytäre Infiltration und die HT als Komorbidität sind deutliche Hinweise darauf, dass die Pathogenese des papillären Schilddrüsenkarzinoms von immunologischen Mechanismen beeinflusst wird. Obwohl Dailey *et al.* 1955 PTCs mit HTs als begleitender Komorbidität beschrieben [30], sind die kausalen Zusammenhänge dieses Phänomens noch nicht hinlänglich bekannt. Seit geraumer Zeit ist es Gegenstand der Diskussion, ob diese immunologischen Einflüsse im Sinne einer Antitumorimmunität eine protektive, oder im Sinne eines permanenten inflammatorischen Stimulus eine prädisponierende Rolle gegenüber PTCs einnehmen. Neben Studien, die eine protektive Rolle der HT zeigen und die Hypothese der Antitumorimmunität bei PTCs unterstützen [56-58], zeigten andere Studien keinen Einfluss [64].

Ein Ansatz, diese divergenten Studienergebnisse zu erklären, ist die Abhängigkeit der Antitumorimmunität von divergierenden patientenspezifischen Faktoren, wie z.B. HLA-Allelvarianten, unterschiedliche zugrundeliegende Verhältnisse der T-Zellsubpopulationen, etc.. Mit der Beantwortung der Frage, was patientenspezifische Voraussetzungen für eine effektive Antitumorimmunität sind, ist aus therapeutischer Perspektive denkbar, diese zukünftig *Outcome*-relevant zu beeinflussen und sie des Weiteren in die prognostische Evaluation miteinzubeziehen.

Die Analyse der HLA-DQ und -DR Allelvarianten zeigt, dass Patienten mit Nachweis von DRB1*03 bzw. DQB1*02 signifikant bzw. annähernd signifikant häufiger Fernmetastasen ausbilden. Folglich ist eine Prädisposition gegenüber Fernmetastasen durch diese Merkmale anzunehmen. DQB1*03 kann dementsgegen eine protektive Rolle zugesprochen werden. PTCs mit dieser Allelvariante weisen signifikant seltener Fernmetastasen auf. Da DQ- und DR-Genvarianten MHC II Moleküle kodieren, sind sie bezüglich Antitumorimmunitätsmechanismen von hoher Relevanz. Allelvarianten dieser Gene können in einer veränderten Konfiguration der MHC-Peptidbindungstasche resultieren und sind so in der Lage, die Präsentation von Tumorantigenen gegenüber T-Zellen zu beeinflussen. Dies beeinflusst Mechanismen der Antitumorimmunität insofern, als dass die suffiziente Unterstützung durch T-Helferzellen, die für eine effektive durch zytotoxische T-Zellen vermittelte antitumorale Antwort entscheidend zu sein scheint, dadurch beeinträchtigt werden kann [113]. Bei diversen Malignomen sind bereits prädisponierende Allelvarianten der DR- und DQ-Gene identifiziert worden [114, 115]. Für das PTC konnte bisher noch keine allgemeingültige Prädisposition

durch definierte Allelvarianten nachgewiesen werden. Die veröffentlichten Publikationen bezüglich genetischer PTC-Prädispositionen durch HLA-DR bzw. -DQ Moleküle beschreiben divergierende Ergebnisse. Shuxian *et al.* zeigten bei einem chinesischen PTC-Kollektiv kein gehäuftes Auftreten dieser Allele [116]. Dem gegenüber demonstrierten Juhasz *et al.* in der ungarischen Population ein leicht erhöhtes Risiko für PTCs bei Vorliegen von HLA-DR1 [117]. Vergleichbar wiesen Amoli *et al.* in iranischem PTC-Kollektiv ein gehäuftes Auftreten von HLA-DRB1*04 auf [118]. Kamdi *et al.* fassten diese und weitere Ergebnisse in einer Metaanalyse zusammen. Als Ergebnis bestätigten Kamdi *et al.* eine signifikante Assoziation von PTCs und DR1, deren Aussagekraft allerdings durch eine große Studienheterogenität als eingeschränkt anzusehen ist [18]. Die in dieser Arbeit vorgestellte Analyse korreliert die in PTC-Patienten vorliegenden HLA-DQ und -DR Allele mit deren klinischen Verlauf. Insbesondere werden sie in Hinblick auf die Rate der Lymphknoten- und Fernmetastasierung analysiert. Dieses unterschiedliche Analyseziel kann als Erklärungsansatz für die teils heterogenen Ergebnisse dienen, ebenso wie die verschiedenen ethnischen Hintergründe der in den o.g. Studien eingeschlossenen Patientenkollektive.

An dieser Stelle hervorgehoben sei die in dieser Arbeit zum ersten Mal beschriebene signifikant seltenere Organmetastasierung bei Trägern des Merkmals DQB1*03 [110] bei gleichzeitig nicht sonderlich beeinflusster Tendenz der lymphatischen Metastasierung. Dies ist insofern bemerkenswert, als dass bestehende Lymphknotenmetastasen im Allgemeinen das Risiko für Fernmetastasen erhöhen. Hier scheint das Merkmal DQB1*03 ausgenommen. Bei DQB1*03 negativen PTC-Patienten mit positivem Lymphknotenstatus ist ein 11,3fach höheres Risiko ableitbar, dass sich Fernmetastasen entwickeln, als für DQB1*03 positive PTC-Patienten mit positivem Lymphknotenstatus. Das Metastasierungsmuster, das auf der Ebene der lymphatischen Metastasierung nicht differiert, aber signifikant seltener Fernmetastasen aufweist, führt zu der Hypothese, dass erst auf der Ebene der umgebenden Lymphknoten ein effektiver Antitumormechanismus besteht und an dieser Stelle ein Fortschreiten des Malignoms verhindert. Anhand der dargelegten Daten ist daher eine Beeinflussung der Tumorummunität durch die vorliegenden HLA-Allelvarianten anzunehmen und von einer DQB1*03 abhängigen Protektivität auszugehen. Dem Merkmal kommt folglich eine doppelte prognostische Relevanz zu. Erstens ist das Risiko, Fernmetastasen auszubilden, niedriger, zweitens ist auch bei vorhandenen Lymphknotenmetastasen das Risiko der Fernmetastasierung geringer.

Interessanterweise sind alle der drei o.g. HLA-Merkmale in Zusammenhang mit Thyreoiditiden vorbeschrieben. Auffällig dabei ist, dass die beiden, den hier erlangten Ergebnissen nach, prädisponierenden Merkmale DRB1*03 und DQB1*02 schwächer mit der Hashimoto Thyreoiditis und stärker mit der Basedow Thyreoiditis assoziiert sind [119-121]. Hingegen

DQB1*03, das in dieser Analyse protektiv erscheinende Merkmal hinsichtlich Fernmetastasen, wurde in der Literatur in Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko der Hashimoto Thyreoiditis beschrieben [122]. Diese Assoziation stützt die mehrfach beschriebene protektive Rolle der Hashimoto Thyreoiditis. Denkbar ist, dass DQB1*03 pos. PTC-Patienten gegenüber Autoimmunitätsmechanismen, die gegen die Thyreoidea gerichtet sind, prädisponiert sind, z.B. vermittelt durch erhöhte Affinität des MHC II Moleküls gegenüber thyreoidalen Epitopen. Insbesondere der hohe Differenzierungsgrad des PTCs macht es den gewebespezifischen CTLs möglich, auch die neoplastischen Zellen des PTCs weiterhin zu erkennen. So ist eine effektivere Antitumorimmunität bei spezifischen zugrundeliegenden HLA-Merkmalen konzeptibel.

Thyreozyten können mittels Expression von MHC II ebenso als antigenpräsentierende Zellen fungieren [123]. Um weiterhin auch eine durch Thyreozyten vermittelte Präsentation *via* DQB1*03 und damit einhergehende Protektivität zu evaluieren, sollte die Expression dieser Allelvariante im Schilddrüsenparenchym, respektive in Thyreozyten, analysiert werden.

4.2 PTC beeinflusst T-Zellsubpopulationen signifikant

Die neben der HLA-Typisierung vorgestellte T-Zellsubpopulationsanalyse zeigt, dass sich das immunologische Profil der PTC-Patienten signifikant von dem der HT und Kontrollen unterscheidet. Die Ergebnisse der hier durchgeführten Subpopulationsanalysen sind insofern von Interesse, als dass die Literatur bei 60% der papillären Schilddrüsenkarzinome deutliche lymphatische Infiltrationen beschreibt [24]. Diese korrelieren mit dem Krankheitsverlauf der Patienten. Tumorassoziierte Lymphozyten liegen vermehrt bei größeren PTCs vor [87]. Diese Beobachtung unterstreicht zwar die Verbindung zwischen PTCs und immunologischen Einflüssen, lässt aber noch keine kausalen Schlussfolgerungen zu. Einerseits könnten fortgeschrittene Karzinome durch die lokalen Vorgänge eine stärkere lymphozytäre Antwort bedingen im Sinne einer durch die neoplastischen Vorgänge forcierten Antitumorimmunität. Andererseits könnten stärkere Infiltrationen, vergesellschaftet mit ansteigender Tumorgroße, ein Anzeichen für ein Versagen des Immunsystems im Sinne fehlender Tumorimmunität sein. Die Aufschlüsselung der T-Zellsubpopulationen im Blut von PTC-Patienten soll neue Anhaltspunkte über den Einfluss der Lymphozyten auf PTCs geben.

Betrachtet man zunächst die Th-Zellen und CTLs als Hauptuntergruppen der T-Zellen, so liegen bei Patienten mit aktivem Tumor bemerkenswerterweise signifikant mehr CTLs vor als bei Patienten in Remission ($Tg < 0,2$ ng/ml). Da CTLs das Potenzial haben, Tumorzellen direkt zu lysieren, kann ihr vermehrtes Vorliegen als Hinweis für eine gezielte Antitumorimmunität angesehen werden. Kohärent dazu beschrieben Cunhas *et al.* bereits eine positive Korrelation

zwischen rezidivfreier Zeit und dem Vorliegen von CD8+ Zellen im Tumorbett [88]. In einer späteren Publikation Cunhas *et al.* stellt er diese Theorie insofern in Frage, als er den Großteil der tumorinfiltrierenden CD8+ Zellen als funktionslos vorfand [89]. Ein solcher Erschöpfungszustand tritt häufig nach fortwährender Stimulation der Immunzellen durch persistierende Inflammationen oder Tumore auf und weist auf eine eher ineffektive Abwehr hin [124]. In der vorliegenden Analyse wurden ebenfalls die Anteile der erschöpften T-Zellen erfasst. Der Anteil erschöpfter CD8+ Zellen ist im PTC-Kollektiv signifikant höher, kohärent mit den Beobachtungen Cunhas. Bei aktivem/inaktivem PTC sind demgegenüber keine differierenden Anteile erschöpfter T-Zellen nachzuweisen. Der größere Anteil der zytotoxischen T-Zellen bei aktivem PTC erklärt sich folglich nicht allein durch einen größeren Anteil erschöpfter T-Zellen und kann als Indiz einer Antitumorimmunität interpretiert werden.

Des Weiteren liegt ein deutlicher *Shift* der T-Helferzellen in Richtung der Th2-Zellen bei PTC-Patienten vor. Th2-Zellen, deren, durch IL-10 Sekretion vermittelte, Inhibition der CTL allgemein als tumorproliferativ galt, werden mittlerweile ebenso antitumoröse Eigenschaften zugesprochen [75]. Neben IL-10 ist IL-4 ein weiteres Th2-Haupteffektorinterleukin, das einerseits durch Granulozytenaktivierung, andererseits durch antiangiogenetische Effekte negativen Einfluss auf die Tumorentwicklung zu nehmen scheint [125, 126]. Aber auch IL-10 kann nachweisbar eine tumorhemmende und somit protektive Rolle einnehmen, indem es bei Tumoren mit reduzierter MHC I Expression die, durch NK-Zellen vermittelte, Tumorzelllyse stimuliert [127]. In Hinblick auf differenzierte Schilddrüsenkarzinome beschrieben Yang *et al.* eine Tendenz der geringeren lymphatischen Metastasierung bei Vorliegen von sowohl Th1- als auch Th2-assoziierten Zytokinen [128]. Der hier beschriebene signifikant höhere Anteil an Th2-Zellen bei PTC-Patienten ist weder von den Faktoren Metastasierung noch Tumoraktivität abhängig. Um die Relevanz dieses fortbestehenden T-Helferzellen *Shifts* bei PTC-Patienten interpretieren zu können, sollten sich demnach qualitative Messungen hinsichtlich der plasmatischen Zytokinlevel anschließen, ebenso wie die Analyse des primären Tumorgewebes hinsichtlich dort vorliegender Infiltrationsverhältnisse der Th1/Th2 Zellen sowie dort vorliegender Zytokinlevel.

Regulierende T-Zellen sind signifikant häufiger im peripheren Blut von PTC-Patienten nachzuweisen als in dem der HTs und Kontrollen. Dieses Ergebnis deckt sich mit den histologischen Untersuchungen Imams *et al.*, die signifikant mehr Treg-Zellen im PTC-Gewebe nachwies als in HTs oder Kontrollen [93]. Ebenso beschreiben Gogali *et al.* vermehrtes Vorkommen von Treg-Zellen sowohl im peripheren Blut als auch im malignen Parenchym [86]. Die von Gogali *et al.* darüber hinaus beschriebene positive Korrelation zwischen Treg-Anteil und Tumorschwere, respektive extrathyreoidalem Wachstum und/oder Metastasierungstendenzen, kann durch die hier erhobenen Daten nicht bestätigt werden. Setzt man die Treg-

Zellen mit CTLs ins Verhältnis, so wird ein Verhältnis zwischen immunologisch repressiven, die Tumorprogression fördernden Treg-Zellen und potenziell Tumorzellen lysierenden zytotoxischen Zellen beschrieben. Demnach ist dieses Verhältnis für die Interpretation des Vorliegens von Antitumorimmunität vs. *Tumorescape*-Mechanismen von großem Interesse. Bisherige Veröffentlichungen beschreiben hier eine negative Korrelation hinsichtlich des CD8/Treg Quotienten und des vorliegenden Tumorstadiums. Diese Korrelation konnte hier nicht als signifikant nachgewiesen werden.

$\Gamma\delta$ T-Zellen stellen funktionell eine Verbindung zwischen adaptivem und angeborenem Immunsystem dar. Durch diese Schlüsselstellung nehmen sie eine besondere Rolle unter den T-Zellsubpopulationen ein. Sie verstärken zum einen indirekt via IFN γ und TNF α Antitumorimmunitätsmechanismen, zum anderen können sie direkt Apoptose in Tumorzellen auslösen [98]. Die hier untersuchten PTC-Patienten weisen signifikant mehr $\gamma\delta$ T-Zellen als HT-Patienten und nahezu signifikant mehr auf als Kontrollen. Die fehlende Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe ist ggf. auf die kleine Stichprobenanzahl der Kontrollgruppe zurückzuführen. Das hier erstmalig beschriebene vermehrte Vorkommen der $\gamma\delta$ T-Zellen bei PTCs ist insofern von klinischem Interesse, als dass $\gamma\delta$ T-Zell-Immunotherapien durch ihre antitumoröse Wirkung bereits bei diversen Malignomen (Nierenzellkarzinom; fortgeschrittenes Lungenkarzinom) klinische Erprobung finden [98]. Dem hier beschriebenen vermehrten Vorkommen der $\gamma\delta$ T-Zellen im bei PTCs peripheren Blut steht eine Studie gegenüber, in der im thyroidalen Tumorgewebe kein relevanter Anteil $\gamma\delta$ T-Zellen nachweisbar war [129]. Daraus resultiert die Frage, inwiefern die peripher vermehrt nachzuweisenden $\gamma\delta$ T-Zellen in der Lage sind, PTCs zu beeinflussen, wenn sie scheinbar lokal nicht nachweisbar sind. Zur weiteren Evaluation sollten sich Studien anschließen, in denen das PTC-Gewebe der Patienten mit vermehrten $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut auf deren intratumorales Vorliegen analysiert wird, gefolgt von *in vitro* Versuchen zur Evaluation des Effekts der körpereigenen $\gamma\delta$ T-Zellen (ggf. nach erfolgter *in vitro* Stimulation) auf PTC-Gewebe. Auch wird in auf diesen Ergebnissen aufbauenden Studien zu berücksichtigen sein müssen, dass diesen Zellen seit kurzem, zusätzlich zu den antitumorösen Eigenschaften, auch prokarzinogene Eigenschaften zugesprochen werden. Demnach sollte zusätzlich die weitere Differenzierung der $\gamma\delta$ T-Zellen bei PTC-Patienten erfolgen, um den Anteil der tumorfördernden Subgruppen, u.a. V δ 1 $\gamma\delta$ T-Zellen, $\gamma\delta$ T17 T-Zellen und $\gamma\delta$ Treg-Zellen zu erfassen [130].

Resümierend existieren zahlreiche signifikante Unterschiede zwischen einzelnen T-Zellsubpopulationen der PTC-Patienten und gesunden Kontrollpersonen. Dieses Ergebnis unterstreicht wiederholt die engen Zusammenhänge zwischen papillären Schilddrüsenkarzinomen und immunologischen Vorgängen, ist aber anhand der rein

quantitativen Erfassung der T-Zellen nicht in der Lage, kausale Aussagen bezüglich bestehender, effektiver Antitumorimmunität oder Versagen der selbigen zu machen.

Als Ergebnis können die verstärkt vorliegenden zytotoxischen T-Zellen und die erhöhten $\Gamma\delta$ T-Zellen als Hinweise für Antitumorimmunität gewertet werden. Andererseits indizieren die hochregulierten Treg-Zellen, vermehrt vorliegende erschöpfte T-Zellen und der *Shift* der T-Helferzellen in Richtung der Th2-Zellen immunologische Vorgänge, die eher als malignomfördernd eingeordnet werden können. Da der letztendliche Einfluss vieler T-Zellpopulationen, und somit deren Tendenz von pro- oder antikanzerogenem Charakter vermeintlich vom umgebenden Mikromilieu abhängig ist, scheint das Mikromilieu des Tumors die Rolle einer ‚Stellschraube‘ bei der Frage nach effektiver Antitumorimmunität inne zu haben. Als nächster Schritt sollte somit die Charakterisierung dieser ‚Stellschraube‘ in Bezug auf die beschriebenen T-Zellen im Tumormilieu erfolgen, sowohl hinsichtlich der Erfassung ihrer Anteile, ihrer Funktionalität als auch dem Level der sie beeinflussenden Zytokine. Letztendlich können so die Einflüsse entschlüsselt werden, die immunologische Mechanismen akzelerieren und somit eliminierend auf die malignen Zellen einwirken.

4.3 HLA-assoziierte Protektivität durch Schilddrüsenspezifische T-Zellen

Die T-Zellsubpopulationsanalyse zeigte signifikant mehr CTLs bei aktiven PTCs im Vergleich zu PTCs in Remission. Bei HT-Patienten sind ein relevanter Anteil der CTLs TPO- und Tg-spezifisch und wirken auf Thyreozyten zytotoxisch [90]. In Anbetracht des vermehrten Vorliegens der CTLs bei aktiven PTCs ist denkbar, dass CTLs der PTC-Patienten ebenso TPO und Tg spezifische CTLs sind, die in diesem Fall zytotoxisches Potenzial gegenüber den weiterhin hochdifferenzierten Tumorzellen des PTCs aufweisen. Die dafür notwendige Expression von TPO und Tg ist bei PTCs als differenzierten Schilddrüsenkarzinomen weiterhin vorhanden, wenn auch partiell reduziert [131, 132]. Tg- und TPO-spezifische T-Zellen wurden demnach bei PTC-Patienten quantifiziert mit dem Ziel, sie mit dem klinischen Verlauf der Patienten zu korrelieren sowie eine Abhängigkeit zum HLA-DR bzw. -DQ Status zu prüfen [110].

Die hier erfolgte quantitative Erfassung der epitopspezifischen T-Zellen zeigt signifikant mehr epitopspezifische T-Zellen bei PTC-Patienten gegenüber den Kontrollen, das Epitop Tg3 betreffend [110]. Dieses Epitop reproduziert ebenso den signifikanten Unterschied der HTs gegenüber Kontrollen. Die weiteren Epitope zeigen die gleiche Tendenz, jedoch ohne signifikanten Unterschied, ggf. wird die fehlende Signifikanz durch das kleine Kontrollkollektiv begünstigt. Ebenso zeigen sich keine signifikanten Unterschiede der Schilddrüsen-

spezifischen T-Zellen in Abhängigkeit der Metastasierungstendenz, des Tumorstatus oder vorliegender HLA-Merkmale.

Schilddrüsen-spezifische CTLs bilden nur einen kleinen Anteil aller CTLs im Blut von PTC-Patienten. Zum verbesserten Nachweis wurde ihr Proliferationsverhalten nach Kontakt zum Zielepitop geprüft. Interessanterweise weisen die CTLs der PTC-Patienten nach Stimulation mit Tg- bzw. TPO-Epitopen erhöhte Anteile an epitopspezifischen, TPO- und Tg-erkennenden CTLs auf. Weiterhin weist dieses Proliferationsverhalten eine Abhängigkeit zum vorliegenden HLA-Merkmal auf. CTLs der HLA-DQB1*03 positiven Patienten haben das signifikant höchste Proliferationsverhalten nach Stimulation mit TPO- und Tg-Peptiden. Jedes Peptidfragment (TPO1-3 und Tg1-3) führt zu signifikant mehr epitopspezifischen T-Zellen. Bei Fehlen des Merkmals findet keinerlei signifikante Proliferation statt. Indes verhalten sich die Merkmale HLA-DQB1*02 und HLA-DRB1*03 gegenläufig, hier weisen die Patienten mit einem dieser Merkmale deutlich weniger Proliferation auf als die Patienten ohne diese Merkmale [110].

Folglich finden sich bei HLA-DQB1*03 pos. PTC-Patienten signifikant mehr durch TPO und Tg stimulierbare zytotoxische T-Zellen und bei etwa gleicher Tendenz zur lymphatischen Metastasierung signifikant weniger Fernmetastasen. In diesem Zusammenhang besonders interessant ist der gelungene immunhistologische Nachweis von TPO- bzw. Tg-spezifischen CTLs in den tumornahen Lymphknoten (bereits veröffentlicht in [110]). Im Gegensatz zeigen HLA-DQB1*02 pos. und HLA-DRB1*03 pos. signifikant weniger durch TPO und Tg stimulierbare zytotoxische T-Zellen und bei etwa gleicher Tendenz zur lymphatischen Metastasierung eine signifikant höhere Tendenz der Organmetastasierung. Daraus lässt sich die These ableiten, dass die Protektion des HLA-Merkmals DQB1*03 auf einer epitopspezifischen Antitumorimmunität beruht und so das Fortschreiten des PTCs im Sinne einer Organmetastasierung verhindert. Unterstützt wird diese These durch die kohärente Beobachtung, dass die für Fernmetastasen prädisponierenden Merkmale HLA-DQB1*02 und HLA-DRB1*03 ebenso weniger epitopspezifische T-Zellen aufweisen. Die vorhandene Antitumorimmunität scheint somit den klinischen Verlauf des PTC direkt zu beeinflussen (bereits veröffentlicht in [110]). Mechanistisch ist eine Präsentation gewebsspezifischer Tumorantigene in den umgebenden Lymphknoten denkbar. Unterstützt würde diese These durch den Nachweis einer höheren Bindungsaffinität des hier als protektiv definierten Merkmals HLA-DQB1*03 zu den getesteten Epitopen. Die vorliegende Bindungsaffinität ist jedoch aufgrund der kurzen Aminosäuresequenzen der hier getesteten Epitope (8 Aminosäuren) nicht genau zu erfassen.

Der Nachweis von TPO und Tg und somit thyreoidalen epitopspezifischen CD8+ T-Zellen ist hier das erste Mal im Rahmen von PTCs erfolgt. Bei anderen Malignomen wurden tumorantigenassoziierte T-Zellen (TAA) bereits beschrieben. Das prominenteste Beispiel ist

das maligne Melanom. Bei malignen Melanomen wurde bereits in den 1970er Jahren beobachtet, dass eine begleitende Autoimmunerkrankung im Sinne einer *Vitiligo* das *Outcome* positiv beeinflussen kann [102, 133]. Die Beschreibung von TAAs bei Melanomen ermöglichte die Entwicklung eines neuen Therapieansatzes mit dem Ziel einer therapeutisch induzierten Verstärkung dieser Antitumorimmunität. Mittlerweile gelten Immunotherapien als eine wichtige Therapiesäule in der Behandlung maligner Melanome [134]. Zu ihnen zählen im engeren Sinn *Checkpoint*-Inhibitoren, Zytokinadministrationen von Il-2 oder Interferon und der adoptive Zelltransfer von tumorinfiltrierenden Lymphozyten [107, 135, 136].

Checkpoint-Inhibitoren, z.B. CTLA-4-Inhibitoren wirken, indem sie die Treg-Zell-vermittelte T-Zellsuppression hemmen und die Anzahl der Effektor-T-Zellen erhöhen [65]. Des Weiteren werden durch ihren Einsatz erhöhte Werte an epitopspezifischen CTLs gemessen [137]. Durch die u.a. in dieser Arbeit nachgewiesenen hohen Treg-Zellen bei PTC-Patienten ist eine Wirksamkeit der CTLA-4-Inhibitoren zusätzlich zu der daraus potenziell folgenden Erhöhung epitopspezifischer T-Zellen denkbar. Auch *programmed cell death protein 1* (PD-1) Antagonisten sind in Hinblick auf die Therapie persistenter PTCs vielversprechend. Hauptfunktion ist die funktionale Wiederherstellung von peripheren, in ihrer Funktion eingeschränkten, T-Zellen [65]. Diese liegen ebenso beim PTC vermehrt vor. Medikamente beider Wirkstoffklassen sind bereits für die Therapie nicht resektabler Melanome zugelassen. Die anzunehmende Beeinflussung des klinischen Verlaufs durch epitopspezifische T-Zellen, abhängig vom HLA-Status, ist ein Indikator, dass der Einsatz von Immuntherapeutika auch bei PTCs zu verbesserten Therapieergebnissen bei persistierendem PTC führen könnte. Dafür spricht die mittlerweile nachgewiesene Expression von PD-1/PD-L1 in PTC-Gewebe, die sogar mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen zu korrelieren scheint [138]. Erste Ergebnisse einer Phase I Studie mit Einsatz des PD-1-Inhibitors Pembrolizumab zeigen erfreulicherweise vielversprechende antitumoröse Eigenschaften bei PTCs [29].

Ebenso vielversprechend ist der Ansatz der Immunotherapie, tumorumgebende Lymphozyten nach *in vitro* erfolgter Kultivierung zu reapplizieren. Erste klinische Studien zeigen eine dadurch erreichte objektive Therapieantwort bei bis zu 56% der Patienten mit metastasiertem malignen Melanom, bei 22% konnte eine vollständige Remission erreicht werden [139]. Kohärent zu den oben diskutierten Hypothesen entwickeln einige dieser Patienten mit effektiver Remission als Nebeneffekt eine Autoimmunerkrankung im Sinne einer *Vitiligo* [135]. Der adoptive Zelltransfer (ACT von „*adoptive cell transfer*“) zeigt v.a. bei der Therapie des malignen Melanoms gute Erfolge. Eine mögliche Erklärung dafür ist eben das Vorliegen epitopspezifischer T-Zellen bei dieser Tumorart [140]. Aus diesen Beobachtungen ergibt sich die Option, auf lange Sicht die Effektivität einer ACT-Therapie ebenso für Patienten mit persistierendem PTC zu evaluieren. Dazu sollte als erster Schritt zunächst die Isolation

epitopspezifischer T-Zellen erfolgen, um deren zytotoxisches und somit Tumorgewebe eliminierendes Potenzial *in vitro* zu erfassen. Gleichwohl ist es unabdingbar, die CTLs auf Vorliegen ggf. funktionseinschränkender Merkmale zu überprüfen, wie sie bei epitopspezifischen tumorinfiltrierenden Zellen des malignen Melanoms teilweise nachgewiesen wurden [141].

In Hinblick auf das reiche Nebenwirkungsprofil der o.g. Therapeutika, bzw. der risikoreichen, vor adoptivem T-Zelltransfer zu durchlaufenden, Lymphozytendepletion, ist es ein zu erreichender Meilenstein, patientenspezifische *Screeningparameter* zu definieren, mit deren Hilfe ein Ansprechen dieser Medikamente zu prognostizieren ist. Die hier beschriebenen epitopspezifischen T-Zellen zeigen in ihrer Proliferationsfähigkeit eine Abhängigkeit von den vorliegenden HLA-Allelvarianten. Ob HLA-Allelvarianten einen Prädiktor darstellen und somit den Erfolg bestimmter immunologischer Therapieregime z.B. ACT-Therapie vorhersagen, obliegt den Investigationen zukünftiger Studien. Unter anderem mit dieser Zielsetzung sollte das Bestehen einer lymphatischen Infiltration, das Vorliegen von epitopspezifischen T-Zellen und HLA-Abhängigkeiten als mögliche Effizienzmarker immunologischer Therapien in zukünftigen Studien evaluiert werden.

4.4 Limitationen

Bei Interpretation der Ergebnisse der T-Zellsubpopulationsanalyse sollte beachtet werden, dass die unterschiedliche Kohortengröße dazu führen kann, dass ggf. bestehende signifikante Unterschiede nicht als solche identifiziert werden konnten. Weiterhin muss beachtet werden, dass ein Unterschied des Durchschnittsalters zwischen PTCs und HTs gegenüber der Kontrollgruppe besteht. Diese Divergenz relativierend berichten Studien, dass zwischen dem dritten und sechsten Lebensjahrzehnt kein signifikanter Unterschied besteht, weder die Anzahl der Lymphozyten, noch das Verhältnis von T-Helferzellen zu CTLs betreffend [142]. Weiterhin sollte bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden, dass die hier vorgestellten Erfassungen der T-Zellsubpopulationen und epitopspezifischen T-Zellen einmalig zu einem Analysezeitpunkt erfasst wurden und somit keine Aussagen über den zeitlichen Verlauf vorgenommen werden können. Da die Analyse außerdem aus peripherem Blut erfolgte, sind temporäre Einflüsse auf das Immunsystem wie Infekte o.ä. nicht auszuschließen. Durch die Analyse eines vergleichsweise großen Patientenkollektivs (n=93) sollten diese Einflüsse möglichst gering gehalten werden. Weiterhin anzumerken ist die rein quantitative Erfassung der T-Zellen, die eine Evaluation der Funktionsfähigkeit der T-Zellsubgruppen nicht zulässt. Ein die Ergebnisse limitierender Aspekt ist außerdem das in Teilen retrospektive Studiendesign. Der Großteil der eingeschlossenen Patienten wurde bereits mittels Thyreoidektomie und/oder Radioiodtherapie (mind. 75%) behandelt und befand sich zum

Analysezeitpunkt in Remission. Diese Vorbehandlung tangiert zwar nicht die HLA-Typisierung, eine Beeinflussung der Ergebnisse der T-Zellsubpopulation bzw. der epitopspezifischen T-Zellen ist hingegen denkbar. Die Radioiodtherapie beeinflusst nachweislich T-Zellsubpopulationen zumindest transient, die in dieser Arbeit beschriebenen Veränderungen bei PTC-Patienten sind jedoch nicht mit den bisher berichteten durch Radioiodtherapie hervorgerufenen Veränderungen der T-Zellsubpopulation übereinstimmend. Beschrieben sind nach Durchführung einer Radioiodtherapie eine eher transiente Reduktion vor allem der B-Zellen, aber auch der Treg- und Th17 Zellen [143, 144]. Die hier aufgeführten Ergebnisse im Sinne hochregulierter Treg-Zellen sind daher nicht als typische Reaktion auf eine Radioiodtherapie anzusehen. Im Mittel liegt die letzte Radioiodtherapie der eingeschlossenen PTC-Patienten ca. sechseinhalb Jahre zurück, aktuelle Studien beschreiben die Veränderungen durch die Radioiodtherapie vor allem in den ersten zwei Wochen bis drei Monaten. Dass diese Vorbehandlung die hier gemessenen signifikanten Unterschiede bedingt, kann demnach nicht ausgeschlossen werden, ist jedoch hinreichend unwahrscheinlich. Die Zuordnung in die Kohorten aktives und in Remission befindliches Karzinom limitiert sich durch die schwindende Validität des Tumormarkers bei gleichzeitigem Vorliegen von Tg-Ak. Bei 20% aller PTC-Patienten in Remission sind zirkulierende Tg-Ak beschrieben. Diese können durch Seruminterferenzen den Tg Nachweis beeinträchtigen, zeigen ihrerseits aber nicht das Vorliegen von tumorösem Restgewebe an [145]. Daher ist theoretisch nicht auszuschließen, dass sich Patienten mit falschnegativen Tg in der Kohorte der Remissionspatienten befinden und diese die Unterschiede zwischen den Kohorten abschwächen.

4.5 Schlussfolgerung

Als vorrangiges Ergebnis dieser Arbeit kann die hier beschriebene Abhängigkeit von PTCs gegenüber zugrundeliegenden, patientenspezifischen HLA-Merkmalen angesehen werden. Bei PTC-Patienten ist das Merkmal HLA-DQB1*03 protektiv gegenüber der Bildung von Fernmetastasen. Diese supprimierte Tumorausbreitung scheint durch eine epitopspezifische zytotoxische T-Zellantwort vermittelt zu sein. Schilddrüsen-spezifische zytotoxische T-Zellen, die in dieser Arbeit erstmals bei PTC-Patienten beschrieben wurden, zeigen bei DQB1*03 pos. PTC-Patienten ein signifikant stärkeres Proliferationsverhalten als bei DQB1*03 neg. PTC-Patienten. Zwei weitere in dieser Arbeit beschriebene HLA-Merkmale zeigen dagegen eine prädisponierende Wirkung gegenüber Fernmetastasen. PTC-Patienten, die Merkmal HLA-DRB1*03 bzw. -DQB1*02 besitzen, bilden signifikant bzw. annähernd signifikant häufiger Fernmetastasen. Die nachgewiesenen Schilddrüsen-spezifischen zytotoxischen T-Zellen proliferieren bei diesen PTC-Patienten signifikant geringer als bei Patienten ohne diese Merkmale, was ebenfalls für die von Schilddrüsen-spezifischen zytotoxischen T-Zellen vermittelte Protektivität spricht.

Die durchgeführte T-Zellsubpopulationsanalyse in peripherem Blut liefert ein detailliertes immunologisches Profil. Sie bildet zahlreiche quantitative Unterschiede zwischen dem Kollektiv der PTC-Patienten und dem Kontrollkollektiv ab. Zusammenfassend liefern sowohl die erhöhten Level der zytotoxischen T-Zellen bei PTC-Patienten mit zum Zeitpunkt der Analyse aktivem Tumor, als auch die tendenziell erhöhten Anteile an $\gamma\delta$ T-Zellen im peripheren Blut der PTC-Patienten Hinweise auf Antitumorimmunität. Gegenteilig deuten die erhöhten Anteile an regulierenden T-Zellen und erschöpften zytotoxischen T-Zellen auf eine ineffektive Antitumorimmunität hin. Inwiefern der nachgewiesene signifikante *Shift* der T-Helferzellen in Richtung Th2-Zellen als pro- oder antiproliferativ auf das PTC wirkt, ist ohne nähere Charakterisierung des Tumormilieus nicht beurteilbar.

4.6 Ausblick

In dieser Arbeit konnten spezifische HLA-Merkmale als schützend bzw. prädisponierend gegenüber der Ausbildung von Fernmetastasen bei PTCs nachgewiesen werden. Eine HLA-DR und -DQ Genotypisierung der PTC-Patienten ist als zukünftiges, relevantes Prognosekriterium denkbar.

Die weiteren gewonnenen Ergebnisse bezüglich Schilddrüsen-spezifischen zytotoxischen T-Zellen und T-Zellsubpopulationen bei PTCs bieten die Grundlage dafür, das Potenzial neuer Immuntherapeutika, wie z.B. adoptiver Zelltransfer, $\gamma\delta$ T-Zell-Immuntherapie oder Immun-Checkpoint-Inhibitoren, bei bisher therapierefraktären PTCs einschätzen zu können.

Hinsichtlich der Perspektive, Schilddrüsen-spezifische zytotoxische T-Zellen therapeutisch im Sinne eines adoptiven Zelltransfers oder einer dendritischen Zelltherapie bei PTCs zu nutzen, sollte zunächst eine nähere Charakterisierung dieser Zellen erfolgen und insbesondere ihr zytotoxisches Potenzial gegenüber PTC-Zellen erfasst werden. Anschließend sollte erwogen werden, diese Immuntherapie HLA-abhängig zu evaluieren, da dieser Therapieansatz in Bezug auf die hier erlangten Ergebnisse bei Merkmalsträgern von HLA-DQB1*03 als am effektivsten einzuschätzen wäre.

Die tendenziell erhöhten Anteile an $\gamma\delta$ T-Zellen bei PTC-Patienten sollten unter dem Gesichtspunkt möglicher $\gamma\delta$ T-Zell-Immuntherapien genauer evaluiert werden, etwa hinsichtlich ihres Vorliegens in primärem Tumorgewebe, wie auch im Hinblick auf bei PTC-Patienten vorliegenden Subtypen der $\gamma\delta$ T-Zellen.

Immun-Checkpoint-Inhibitoren, wie PD-1- und CTLA-4 -Inhibitoren konnten die Therapie vieler Malignome revolutionieren. Mittels der funktionalen Wiederherstellung von in ihrer Funktion eingeschränkten T-Zellen, bzw. durch deren Inhibition von regulierenden T-Zellen ist eine therapeutische Effizienz bei fortgeschrittenen PTCs denkbar. PD-1-Inhibitoren werden bei PTC-Patienten bereits in ersten klinischen Studien eingesetzt [29]. CTLA-4-Inhibitoren erhöhen außerdem nachgewiesener Weise den Anteil epitopspezifischer T-Zellen [65]. Dies suggeriert vielversprechende Ergebnisse in der Behandlung des PTCs, insbesondere in Anbetracht der hier erlangten Ergebnisse bezüglich der beobachteten Assoziation von vorliegenden, Schilddrüsen-spezifischen zytotoxischen T-Zellen und geringerer Fernmetastasierung. Da nach den oben genannten Ergebnissen die Proliferationsfähigkeit epitopspezifischer T-Zellen von zugrundeliegenden HLA-Merkmalen beeinflusst zu sein scheint, sollte der Erfolg dieser Immuntherapeutika ebenso HLA-abhängig evaluiert werden.

5 Literaturverzeichnis

1. Eichhorn, W., H. Tabler, R. Lippold, M. Lochmann, M. Schreckenberger and P. Bartenstein, *Prognostic factors determining long-term survival in well-differentiated thyroid cancer: an analysis of four hundred eighty-four patients undergoing therapy and aftercare at the same institution*. *Thyroid*, 2003. **13**(10): p. 949-958.
2. Lim, H., S.S. Devesa, J.A. Sosa, D. Check and C.M. Kitahara, *Trends in thyroid cancer incidence and mortality in the United States, 1974-2013*. *Journal of the American Medical Association*, 2017. **317**(13): p. 1338-1348.
3. Nikiforov, Y.E., *Is ionizing radiation responsible for the increasing incidence of thyroid cancer?* *Cancer*, 2010. **116**(7): p. 1626-1628.
4. *UNSCEAR 2008 report volume II. Report to the general assembly with scientific annexes: sources and effects of ionizing radiation*. UN Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR), 2008. **2**.
5. Takamura, N., M. Orita, V. Saenko, S. Yamashita, S. Nagataki and Y. Demidchik, *Radiation and risk of thyroid cancer: Fukushima and Chernobyl*. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2016. **4**(8): p. 647.
6. Aschebrook-Kilfoy, B., X.-O. Shu, Y.-T. Gao, B.-T. Ji, G. Yang, H.L. Li, N. Rothman, W.-H. Chow, W. Zheng and M.H. Ward, *Thyroid cancer risk and dietary nitrate and nitrite intake in the Shanghai Women's Health Study*. *International journal of cancer.*, 2013. **132**(4): p. 897-904.
7. Zhou, Z., J. Zhang, F. Jiang, Y. Xie, X. Zhang and L. Jiang, *Higher urinary bisphenol A concentration and excessive iodine intake are associated with nodular goiter and papillary thyroid carcinoma*. *Bioscience Reports*, 2017. **37**(4): p. BSR20170678.
8. Pellegriti, G., F. De Vathaire, C. Scollo, M. Attard, C. Giordano, S. Arena, G. Dardanoni, F. Frasca, P. Malandrino, F. Vermiglio, D.M. Previtiera, G. D'Azzo, F. Trimarchi and R. Vigneri, *Papillary thyroid cancer incidence in the volcanic area of Sicily*. *Journal of the National Cancer Institute*, 2009. **101**(22): p. 1575-1583.
9. Duntas, L.H. and C. Doulas, *The 'rings of fire' and thyroid cancer*. *Hormones (Athens)*, 2009. **8**(4): p. 249-253.
10. Zimmermann, M.B. and V. Galetti, *Iodine intake as a risk factor for thyroid cancer: a comprehensive review of animal and human studies*. *Thyroid Research*, 2015. **8**: p. 8.
11. Farahati, J., M. Geling, U. Mader, M. Mortl, M. Luster, J.G. Muller, M. Flentje and C. Reiners, *Changing trends of incidence and prognosis of thyroid carcinoma in lower Franconia, Germany, from 1981-1995*. *Thyroid*, 2004. **14**(2): p. 141-147.
12. Guan, H., M. Ji, R. Bao, H. Yu, Y. Wang, P. Hou, Y. Zhang, Z. Shan, W. Teng and M. Xing, *Association of high iodine intake with the T1799A BRAF mutation in papillary thyroid cancer*. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2009. **94**(5): p. 1612-1617.
13. Pelizzo, M.R., C. Dobrinja, E. Casal Ide, M. Zane, O. Lora, A. Toniato, C. Mian, S. Barollo, M. Izuzquiza, J. Guerrini, N. De Manzini, I. Merante Boschini and D. Rubello, *The role of BRAF(V600E) mutation as poor prognostic factor for the outcome of patients with intrathyroid papillary thyroid carcinoma*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2014. **68**(4): p. 413-417.
14. Fiore, E., T. Rago, M.A. Provenzale, M. Scutari, C. Ugolini, F. Basolo, G. Di Coscio, P. Berti, L. Grasso, R. Elisei, A. Pinchera and P. Vitti, *Lower levels of TSH are associated with a lower risk of papillary thyroid cancer in patients with thyroid nodular disease: thyroid autonomy may play a protective role*. *Endocrine-Related Cancer*, 2009. **16**(4): p. 1251-1260.
15. McLeod, D.S.A., D.S. Cooper, P.W. Ladenson, K.B. Ain, J.D. Brierley, H.G. Fein, B.R. Haugen, J. Jonklaas, J. Magner, D.S. Ross, M.C. Skarulis, D.L. Steward, H.R. Maxon and S.I. Sherman, *Prognosis of Differentiated Thyroid Cancer in Relation to Serum Thyrotropin and Thyroglobulin Antibody Status at Time of Diagnosis*. *Thyroid*, 2014. **24**(1): p. 35-42.
16. Ma, Y., Zhang, X., and Wang, Y., *Reactivity of thyroid papillary carcinoma cells to thyroid stimulating hormone-dominated endocrine therapy*. *Oncology letters*, 2017. **14**: p. 7405-7409.

17. Xie, X., X. Shi, H. Guan, Q. Guo, C. Fan, W. Dong, G. Wang, F. Li, Z. Shan, L. Cao and W. Teng, *P21-activated kinase 4 involves TSH induced papillary thyroid cancer cell proliferation*. *Oncotarget*, 2017. **8**(15): p. 24882-24891.
18. Kamdi, A.S., N.B. Kandavalli, D. Emusu, N. Jain, M. Mamtani and J.R. Porterfield, Jr., *Weak or absent evidence for the association of HLA-DR antigens with risk of thyroid carcinoma: a meta-analysis of observational studies*. *Tissue Antigens*, 2011. **78**(5): p. 382-389.
19. Pappa, T. and M. Alevizaki, *Obesity and thyroid cancer: a clinical update*. *Thyroid*, 2014. **24**(2): p. 190-199.
20. Bae, M.J., S.S. Kim, W.J. Kim, Y.S. Yi, Y.K. Jeon, B.H. Kim, B.J. Lee, J.C. Lee, I.J. Kim, S.G. Wang and Y.K. Kim, *High prevalence of papillary thyroid cancer in Korean women with insulin resistance*. *Head Neck*, 2016. **38**(1): p. 66-71.
21. Kim, H.J., N.K. Kim, J.H. Choi, S.Y. Sohn, S.W. Kim, S.-M. Jin, H.W. Jang, S. Suh, Y.-K. Min, J.H. Chung and S.W. Kim, *Associations between body mass index and clinico-pathological characteristics of papillary thyroid cancer*. *Clinical Endocrinology*, 2013. **78**(1): p. 134-140.
22. LiVolsi, V.A., *Papillary thyroid carcinoma: an update*. *Modern Pathology*, 2011. **24**: p. S1.
23. Gardner, R.E., R. Tuttle, K.D. Burman and et al., *Prognostic importance of vascular invasion in papillary thyroid carcinoma*. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 2000. **126**(3): p. 309-312.
24. Tamimi, D.M., *The association between chronic lymphocytic thyroiditis and thyroid tumors*. *International Journal of Surgical Pathology*, 2002. **10**(2): p. 141-146.
25. Amin, M.B., Edge, S., Greene, F., Byrd, D.R., Brookland, R.K., Washington, M.K., Gershenwald, J.E., Compton, C.C., Hess, K.R., Sullivan, D.C., Jessup, J.M., Brierley, J.D., Gaspar, L.E., Schilsky, R.L., Balch, C.M., Winchester, D.P., Asare, E.A., Madera, M., Gress, D.M., Meyer, L.R. (Eds.) *AJCC Cancer Staging Manual*. 8 ed. 2017, New York: Springer International Publishing.
26. Perrier, N.D., J.D. Brierley and R.M. Tuttle, *Differentiated and anaplastic thyroid carcinoma: Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual*. *CA Cancer J Clin*, 2018. **68**(1): p. 55-63.
27. Schmidbauer, B., K. Menhart, D. Hellwig and J. Grosse, *Differentiated thyroid cancer—treatment: State of the art*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017. **18**(6): p. 1292.
28. Dietlein, M., J. Dressler, W. Eschner, F. Grünwald, M. Lassmann, B. Leisner, M. Luster, E. Moser, C. Reiners, H. Schicha and O. Schober, *Procedure guidelines for radioiodine therapy of differentiated thyroid cancer (version 3)*. *Nuklearmedizin*, 2007. **46**(05): p. 213-219.
29. Mehnert, J.M., A. Varga, M. Brose, R.R. Aggarwal, C.-C. Lin, A. Prawira, F.d. Braud, K. Tamura, T. Doi, S.A. Piha-Paul, J. Gilbert, S. Saraf, P. Thanigaimani, J.D. Cheng and B. Keam, *Pembrolizumab for advanced papillary or follicular thyroid cancer: preliminary results from the phase 1b KEYNOTE-028 study*. *Journal of Clinical Oncology*, 2016. **34**(15_suppl): p. 6091-6091.
30. Dailey, M.E., S. Lindsay and R. Skahan, *Relation of thyroid neoplasms to Hashimoto disease of the thyroid gland*. *A.M.A. Archives of Surgery*, 1955. **70**(2): p. 291-297.
31. Feldt-Rasmussen, U. and A.K. Rasmussen, *Autoimmunity in differentiated thyroid cancer: significance and related clinical problems*. *Hormones (Athens)*, 2010. **9**(2): p. 109-117.
32. Lee, J.H., Y. Kim, J.W. Choi and Y.S. Kim, *The association between papillary thyroid carcinoma and histologically proven Hashimoto's thyroiditis: a meta-analysis*. *European Journal of Endocrinology*, 2013. **168**(3): p. 343-349.
33. Zaletel, K. and S. Gaberšček, *Hashimoto's Thyroiditis: From Genes to the Disease*. *Current Genomics*, 2011. **12**(8): p. 576-588.
34. Hashimoto, H., *Zur Kenntnis der lymphomatösen Veränderung der Schilddrüse (Struma lymphomatosa)*. *Archiv für klinische Chirurgie*, 1912. **97**: p. 219-219.
35. Völzke, H., J. Lüdemann, D.M. Robinson, K.W. Spieker, C. Schwahn, A. Kramer, U. John and W. Meng, *The prevalence of undiagnosed thyroid disorders in a previously iodine-deficient area*. *Thyroid*, 2003. **13**(8): p. 803-810.
36. Aghini-Lombardi, F., L. Antonangeli, E. Martino, P. Vitti, D. Maccherini, F. Leoli, T. Rago, L. Grasso, R. Valeriano, A. Balestrieri and A. Pinchera, *The spectrum of thyroid disorders in an*

- iodine-deficient community: the Pescopagano survey.* The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1999. **84**(2): p. 561-566.
37. McLeod, D.S. and D.S. Cooper, *The incidence and prevalence of thyroid autoimmunity.* Endocrine, 2012. **42**(2): p. 252-265.
 38. Caturegli, P., A. De Remigis and N.R. Rose, *Hashimoto thyroiditis: clinical and diagnostic criteria.* Autoimmunity Reviews, 2014. **13**(4-5): p. 391-397.
 39. Durfee, S.M., C.B. Benson, D.M. Arthaud, E.K. Alexander and M.C. Frates, *Sonographic appearance of thyroid cancer in patients with Hashimoto thyroiditis.* Journal of Ultrasound in Medicine, 2015. **34**(4): p. 697-704.
 40. McLachlan, S.M. and B. Rapoport, *Breaking tolerance to thyroid antigens: changing concepts in thyroid autoimmunity.* Endocrine Reviews, 2014. **35**(1): p. 59-105.
 41. Tomer, Y. and A. Huber, *The etiology of autoimmune thyroid disease: a story of genes and environment.* Journal of Autoimmunity, 2009. **32**(3-4): p. 231-239.
 42. Moens, H., N.R. Farid, L. Sampson, E.P. Noel and J.M. Barnard, *Hashimoto's Thyroiditis Is Associated with HLA-DRw3.* New England Journal of Medicine, 1978. **299**(3): p. 133-134.
 43. Farid, N.R., L. Sampson, H. Moens and J.M. Barnard, *The association of goitrous autoimmune thyroiditis with HLA-DR5.* Tissue Antigens, 1981. **17**(3): p. 265-268.
 44. Badenhop, K., G. Schwarz, P.G. Walfish, V. Drummond, K.H. Usadel and G.F. Bottazzo, *Susceptibility to thyroid autoimmune disease: molecular analysis of HLA-D region genes identifies new markers for goitrous Hashimoto's thyroiditis.* The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1990. **71**(5): p. 1131-1137.
 45. Wu, Z., H.A. Stephens, J.A. Sachs, P.A. Biro, S. Cutbush, M.M. Magzoub, C. Becker, G. Schwartz and G.F. Bottazzo, *Molecular analysis of HLA-DQ and -DP genes in caucasoid patients with Hashimoto's thyroiditis.* Tissue Antigens, 1994. **43**(2): p. 116-119.
 46. Bogner, U., K. Badenhop, H. Peters, D. Schmiege, W.R. Mayr, K.H. Usadel and H. Schleusener, *HLA-DR/DQ gene variation in nongoitrous autoimmune thyroiditis at the serological and molecular level.* Autoimmunity, 1992. **14**(2): p. 155-158.
 47. Kotsa, K., P.F. Watson and A.P. Weetman, *A CTLA-4 gene polymorphism is associated with both Graves disease and autoimmune hypothyroidism.* Clinical Endocrinology (Oxford), 1997. **46**(5): p. 551-554.
 48. Criswell, L.A., K.A. Pfeiffer, R.F. Lum, B. Gonzales, J. Novitzke, M. Kern, K.L. Moser, A.B. Begovich, V.E.H. Carlton, W. Li, A.T. Lee, W. Ortmann, T.W. Behrens and P.K. Gregersen, *Analysis of Families in the Multiple Autoimmune Disease Genetics Consortium (MADGC) Collection: the PTPN22 620W Allele Associates with Multiple Autoimmune Phenotypes.* The American Journal of Human Genetics, 2005. **76**(4): p. 561-571.
 49. Rose, N.R., R. Bonita and C.L. Burek, *Iodine: an environmental trigger of thyroiditis.* Autoimmunity Reviews, 2002. **1**(1-2): p. 97-103.
 50. Fentiman, I.S., B.S. Thomas, F.R. Balkwill, R.D. Rubens and J.L. Hayward, *Primary hypothyroidism associated with interferon therapy of breast cancer.* The Lancet, 1985. **325**(8438): p. 1166.
 51. Tomer, Y., J.T. Blackard and N. Akeno, *Interferon alpha treatment and thyroid dysfunction.* Endocrinology & Metabolism Clinics of North America, 2007. **36**(4): p. 1051-1066; x-xi.
 52. Weijl, N.I., D. Van der Harst, A. Brand, Y. Kooy, S. Van Luxemburg, J. Schroder, E. Lentjes, J.J. Van Rood, F.J. Cleton and S. Osanto, *Hypothyroidism during immunotherapy with interleukin-2 is associated with antithyroid antibodies and response to treatment.* Journal of Clinical Oncology, 1993. **11**(7): p. 1376-1383.
 53. Uhliarova, B. and A. Hajtman, *Hashimoto's thyroiditis - an independent risk factor for papillary carcinoma.* Brazilian Journal of Otorhinolaryngology, 2017. **84**: p. 729-735.
 54. Repplinger, D., A. Bargren, Y.-W. Zhang, J. Adler, M. Haymart and H. Chen, *Is Hashimoto's thyroiditis a risk factor for papillary thyroid cancer?* The Journal of surgical research, 2008. **150**(1): p. 49-52.

55. Balkwill, F. and A. Mantovani, *Inflammation and cancer: back to Virchow?* The Lancet, 2001. **357**(9255): p. 539-545.
56. Liang, J., W. Zeng, F. Fang, T. Yu, Y. Zhao, X. Fan, N. Guo and X. Gao, *Clinical analysis of Hashimoto thyroiditis coexistent with papillary thyroid cancer in 1392 patients.* ACTA Otorhinolaryngologica Italica, 2017. **37**(5): p. 393-400.
57. Song, E., M.J. Jeon, S. Park, M. Kim, H.S. Oh, D.E. Song, W.G. Kim, W.B. Kim, Y.K. Shong and T.Y. Kim, *Influence of coexistent Hashimoto's thyroiditis on the extent of cervical lymph node dissection and prognosis in papillary thyroid carcinoma.* Clinical Endocrinology (Oxford), 2018. **88**(1): p. 123-128.
58. Selek, A., B. Cetinarlan, I. Tarkun, Z. Canturk, B. Ustuner and Z. Akyay, *Thyroid autoimmunity: is really associated with papillary thyroid carcinoma?* European Archives of Oto-Rhino-Laryngology, 2017. **274**(3): p. 1677-1681.
59. Carvalho, M.S., P.W. Rosario, G.F. Mourao and M.R. Calsolari, *Chronic lymphocytic thyroiditis does not influence the risk of recurrence in patients with papillary thyroid carcinoma and excellent response to initial therapy.* Endocrine, 2017. **55**(3): p. 954-958.
60. Zhu, F., Y.B. Shen, F.Q. Li, Y. Fang, L. Hu and Y.J. Wu, *The Effects of Hashimoto Thyroiditis on Lymph Node Metastases in Unifocal and Multifocal Papillary Thyroid Carcinoma: A Retrospective Chinese Cohort Study.* Medicine, 2016. **95**(6): p. e2674.
61. Zhu, Y., K. Zheng, H. Zhang, L. Chen, J. Xue, M. Ding, K. Wu, Z. Wang, L. Kong and X. Chen, *The clinicopathologic differences of central lymph node metastasis in predicting lateral lymph node metastasis and prognosis in papillary thyroid cancer associated with or without Hashimoto's thyroiditis.* Tumor Biology, 2016. **37**(6): p. 8037-8045.
62. Baser, H., D. Ozdemir, N. Cuhaci, C. Aydin, R. Ersoy, A. Kilicarslan and B. Cakir, *Hashimoto's Thyroiditis does not affect ultrasonographical, cytological, and histopathological features in patients with papillary thyroid carcinoma.* Endocrine Pathology, 2015. **26**(4): p. 356-364.
63. Iliadou, P.K., G. Effraimidis, M. Konstantinos, P. Grigorios, P. Mitsakis, F. Patakiouta and K. Pazaitou-Panayiotou, *Chronic lymphocytic thyroiditis is associated with invasive characteristics of differentiated thyroid carcinoma in children and adolescents.* European Journal of Endocrinology, 2015. **173**(6): p. 827-833.
64. Park, J.Y., D.W. Kim, H.K. Park, T.K. Ha, S.J. Jung, D.H. Kim and S.K. Bae, *Comparison of T stage, N stage, multifocality, and bilaterality in papillary thyroid carcinoma patients according to the presence of coexisting lymphocytic thyroiditis.* Endocrine Research, 2015. **40**(3): p. 151-155.
65. Buchbinder, E.I. and A. Desai, *CTLA-4 and PD-1 pathways: Similarities, differences, and implications of their inhibition.* American Journal of Clinical Oncology, 2016. **39**(1): p. 98-106.
66. Burnet, F.M., *The concept of immunological surveillance.* Progress in experimental tumor research, 1970. **13**: p. 1-27.
67. Ehrlich, P., *Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung.* Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde, 1909(5): p. 273–290.
68. Ribatti, D., *The concept of immune surveillance against tumors: The first theories.* Oncotarget, 2017. **8**(4): p. 7175-7180.
69. Jiang, D., Y. Liu, H. Wang, H. Wang, Q. Song, A. Sujie, J. Huang, Y. Xu, H. Zeng, L. Tan, Y. Hou and C. Xu, *Tumour infiltrating lymphocytes correlate with improved survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma.* Scientific Reports, 2017. **7**: p. 44823.
70. Holmes, R.S. and T.L. Vaughan. *Epidemiology and pathogenesis of esophageal cancer.* in *Seminars in radiation oncology.* 2007. Elsevier.
71. Galdiero, M.R., G. Varricchi and G. Marone, *The immune network in thyroid cancer.* Oncoimmunology, 2016. **5**(6): p. e1168556.
72. Papewalis, C., M. Ehlers and M. Schott, *Advances in cellular therapy for the treatment of thyroid cancer.* Journal of Oncology, 2010. **2010**: p. 179491.
73. Ward, L.S., *Immune Response in Thyroid Cancer: Widening the Boundaries.* Scientifica, 2014. **2014**: p. 20.

74. Mantovani, A., S.K. Biswas, M.R. Galdiero, A. Sica and M. Locati, *Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling*. The Journal of Pathology, 2013. **229**(2): p. 176-185.
75. Ellyard, J.I., L. Simson and C.R. Parish, *Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe?* Tissue Antigens, 2007. **70**(1): p. 1-11.
76. Zivancevic-Simonovic, S., O. Mihaljevic, I. Majstorovic, S. Popovic, S. Markovic, O. Milosevic-Djordjevic, Z. Jovanovic, L. Mijatovic-Teodorovic, D. Mihajlovic and M. Colic, *Cytokine production in patients with papillary thyroid cancer and associated autoimmune Hashimoto thyroiditis*. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2015. **64**(8): p. 1011-1019.
77. Nanba, T., M. Watanabe, N. Inoue and Y. Iwatani, *Increases of the Th1/Th2 cell ratio in severe Hashimoto's disease and in the proportion of Th17 cells in intractable Graves' disease*. Thyroid, 2009. **19**(5): p. 495-501.
78. Weaver, C.T., R.D. Hatton, P.R. Mangan and L.E. Harrington, *IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages*. Annual Review of Immunology, 2007. **25**: p. 821-852.
79. Lee, G.R., *The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity*. International journal of molecular sciences, 2018. **19**(3): p. 730.
80. Jiang, G., S. Ma, Y. Wei, Y. Wu, X. Yu and H. Liu, *The prevalence and distribution of Th17 and Tc17 cells in patients with thyroid tumor*. Immunology Letters, 2014. **162**(1, Part A): p. 68-73.
81. Abbas, A.K., A.H. Lichtman and S. Pillai, *Cellular and molecular immunology Chapter 1 Introduction to the Immune System*. 2010: Elsevier Health Sciences.
82. Nishikawa, H. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells in tumor immunity*. International Journal of Cancer, 2010. **127**(4): p. 759-767.
83. Erfani, N., M. Hamedi-Shahraki, S. Rezaeifard, M. Haghshenas, M. Rasouli and A. Samsami Dehaghani, *FoxP3+ regulatory T cells in peripheral blood of patients with epithelial ovarian cancer*. Iranian Journal of Immunology, 2014. **11**(2): p. 105-112.
84. Shang, B., Y. Liu, S.J. Jiang and Y. Liu, *Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis*. Scientific Reports, 2015. **5**: p. 15179.
85. Shields, J.D., I.C. Kourtis, A.A. Tomei, J.M. Roberts and M.A. Swartz, *Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21*. Science, 2010. **328**(5979): p. 749-752.
86. Gogali, F., G. Paterakis, G.Z. Rassidakis, G. Kaltsas, C.I. Liakou, P. Gousis, E. Neonakis, M.N. Manoussakis and C. Liapi, *Phenotypical analysis of lymphocytes with suppressive and regulatory properties (Tregs) and NK cells in the papillary carcinoma of thyroid*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2012. **97**(5): p. 1474-1482.
87. French, J.D., Z.J. Weber, D.L. Fretwell, S. Said, J.P. Kloppel and B.R. Haugen, *Tumor-associated lymphocytes and increased FoxP3+ regulatory T cell frequency correlate with more aggressive papillary thyroid cancer*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2010. **95**(5): p. 2325-2333.
88. Cunha, L.L., E.C. Morari, A.C. Guihen, D. Razolli, R. Gerhard, S. Nonogaki, F.A. Soares, J. Vassallo and L.S. Ward, *Infiltration of a mixture of different immune cells may be related to molecular profile of differentiated thyroid cancer*. Endocrine-Related Cancer, 2012. **19**(3): p. L31-36.
89. Cunha, L.L., M.A. Marcello, S. Nonogaki, E.C. Morari, F.A. Soares, J. Vassallo and L.S. Ward, *CD8+ tumour-infiltrating lymphocytes and COX2 expression may predict relapse in differentiated thyroid cancer*. Clinical Endocrinology (Oxford), 2015. **83**(2): p. 246-253.
90. Ehlers, M., A. Thiel, C. Bernecker, D. Porwol, C. Papewalis, H.S. Willenberg, S. Schinner, H. Hautzel, W.A. Scherbaum and M. Schott, *Evidence of a combined cytotoxic thyroglobulin and thyroperoxidase epitope-specific cellular immunity in Hashimoto's thyroiditis*. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2012. **97**(4): p. 1347-1354.
91. Severson, J.J., H.S. Serracino, V. Mateescu, C.D. Raeburn, R.C. McIntyre, Jr., S.B. Sams, B.R. Haugen and J.D. French, *PD-1+Tim-3+ CD8+ T lymphocytes display varied degrees of functional*

- exhaustion in patients with regionally metastatic differentiated thyroid cancer. Cancer Immunology Research*, 2015. **3**(6): p. 620-630.
92. Abbas, A.K., A.H. Lichtman and S. Pillai, *Cellular and molecular immunology Chapter 11 Immunological tolerance*. 2010: Elsevier Health Sciences.
 93. Imam, S., R. Paparodis, D. Sharma and J.C. Jaume, *Lymphocytic profiling in thyroid cancer provides clues for failure of tumor immunity. Endocrine-Related Cancer*, 2014. **21**(3): p. 505-516.
 94. Young, K.J., L.S. Kay, M.J. Phillips and L. Zhang, *Antitumor Activity Mediated by Double-Negative T Cells. Cancer Research*, 2003. **63**(22): p. 8014-8021.
 95. Mak, T.W. and D.A. Ferrick, *The $\gamma\delta$ T-cell bridge: Linking innate and acquired immunity. Nature Medicine*, 1998. **4**(7): p. 764-765.
 96. Marlin, R., A. Pappalardo, H. Kaminski, C.R. Willcox, V. Pitard, S. Netzer, C. Khairallah, A.-M. Lomenech, C. Harly, M. Bonneville, J.-F. Moreau, E. Scotet, B.E. Willcox, B. Faustin and J. Déchanet-Merville, *Sensing of cell stress by human $\gamma\delta$ TCR-dependent recognition of annexin A2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017. **114**(12): p. 3163-3168.
 97. Gogoi, D. and S.V. Chiplunkar, *Targeting gamma delta T cells for cancer immunotherapy: bench to bedside. The Indian Journal of Medical Research*, 2013. **138**(5): p. 755-761.
 98. Zou, C., P. Zhao, Z. Xiao, X. Han, F. Fu and L. Fu, *$\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy. Oncotarget*, 2017. **8**(5): p. 8900-8909.
 99. Bennouna, J., E. Bompas, E.M. Neidhardt, F. Rolland, I. Philip, C. Galea, S. Salot, S. Saiagh, M. Audrain, M. Rimbart, S. Lafaye-de Micheaux, J. Tiollier and S. Negrier, *Phase-I study of Innacell gammadelta, an autologous cell-therapy product highly enriched in gamma9delta2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma. Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2008. **57**(11): p. 1599-1609.
 100. Ma, C., Q. Zhang, J. Ye, F. Wang, Y. Zhang, E. Wevers, T. Schwartz, P. Hunborg, M.A. Varvares, D.F. Hoft, E.C. Hsueh and G. Peng, *Tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T lymphocytes predict clinical outcome in human breast cancer. Journal of Immunology*, 2012. **189**(10): p. 5029-5036.
 101. Quaglino, P., F. Marengo, S. Osella-Abate, N. Cappello, M. Ortoncelli, B. Salomone, M.T. Fierro, P. Savoia and M.G. Bernengo, *Vitiligo is an independent favourable prognostic factor in stage III and IV metastatic melanoma patients: results from a single-institution hospital-based observational cohort study. Annals of Oncology*, 2010. **21**(2): p. 409-414.
 102. Byrne, K.T. and M.J. Turk, *New perspectives on the role of Vitiligo in immune responses to melanoma. Oncotarget*, 2011. **2**(9): p. 684-694.
 103. Boon, T., P.G. Coulie and B. Van den Eynde, *Tumor antigens recognized by T cells. Immunology today*, 1997. **18**(6): p. 267-268.
 104. Bocchia, M., T. Korontsvit, Q. Xu, S. Mackinnon, S. Yang, A. Sette and D. Scheinberg, *Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides. Blood*, 1996. **87**(9): p. 3587-3592.
 105. El Hage, F., I. Vergnon, D. Grunenwald, J.C. Soria, S. Chouaib and F. Mami-Chouaib, *Generation of diverse mutated tumor antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in a lung cancer patient with long survival. Oncology Reports*, 2005. **14**(3): p. 763-769.
 106. Wolfel, T., M. Hauer, J. Schneider, M. Serrano, C. Wolfel, E. Klehmann-Hieb, E. De Plaen, T. Hankeln, K. Meyer zum Buschenfelde and D. Beach, *A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. Science*, 1995. **269**(5228): p. 1281-1284.
 107. Rosenberg, S.A., B.S. Packard, P.M. Aebersold, D. Solomon, S.L. Topalian, S.T. Toy, P. Simon, M.T. Lotze, J.C. Yang and C.A. Seipp, *Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. New England Journal of Medicine*, 1988. **319**(25): p. 1676-1680.

108. Bol, K.F., G. Schreiber, W.R. Gerritsen, I.J.M. de Vries and C.G. Figdor, *Dendritic cell-based immunotherapy: State of the art and beyond*. *Clinical Cancer Research*, 2016. **22**(8): p. 1897-1906.
109. Mukherji, B., N.G. Chakraborty, S. Yamasaki, T. Okino, H. Yamase, J.R. Sporn, S.K. Kurtzman, M.T. Ergin, J. Ozols, J. Meehan and et al., *Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995. **92**(17): p. 8078-8082.
110. Ehlers, M., A. Kuebart, H. Hautzel, J. Enczmann, A.-C. Reis, M. Haase, S. Allelein, T. Dringenberg, C. Schmid and M. Schott, *Epitope-specific antitumor immunity suppresses tumor spread in papillary thyroid cancer*. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2017. **102**(7): p. 2154-2161.
111. Jaroszeski, M.J. and G. Radcliff, *Fundamentals of flow cytometry*. *Molecular Biotechnology*, 1999. **11**(1): p. 37-53.
112. Altman, J.D., P.A.H. Moss, P.J.R. Goulder, D.H. Barouch, M.G. McHeyzer-Williams, J.I. Bell, A.J. McMichael and M.M. Davis, *Phenotypic Analysis of Antigen-Specific T Lymphocytes*. *Science*, 1996. **274**(5284): p. 94-96.
113. Antony, P.A., C.A. Piccirillo, A. Akpınarlı, S.E. Finkelstein, P.J. Speiss, D.R. Surman, D.C. Palmer, C.-C. Chan, C.A. Klebanoff, W.W. Overwijk, S.A. Rosenberg and N.P. Restifo, *CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells*. *The Journal of Immunology*, 2005. **174**(5): p. 2591-2601.
114. Lee, J.E., A.M. Lowy, W.A. Thompson, M. Lu, P.T. Loflin, J.M. Skibber, D.B. Evans, S.A. Curley, P.F. Mansfield and J.D. Reveille, *Association of gastric adenocarcinoma with the HLA class II gene DQB10301*. *Gastroenterology*, 1996. **111**(2): p. 426-432.
115. Geng, X.T., Y.H. Hu, T. Dong and R.Z. Wang, *Associations of human leukocyte antigen-DRB1 alleles with nasopharyngeal carcinoma and its clinical significance in Xinjiang Uyghur Autonomous Region of China*. *Chinese Medical Journal*, 2016. **129**(11): p. 1347-1354.
116. Shuxian, J., C. Xiaoyun, F. Zhihui, L. Xiaohua, D. Zhanhui, H. Bin and Z. Lin, *Association of HLA-B*51:01 with Papillary Thyroid Carcinoma in the Chinese Han Population of the Shandong Coastal Areas*. *Thyroid*, 2014. **24**(5): p. 867-871.
117. Juhasz, F., P. Boros, G. Szegedi, G. Balazs, P. Suranyi, E. Kraszits, V. Stenszky and N.R. Farid, *Immunogenetic and immunologic studies of differentiated thyroid cancer*. *Cancer*, 1989. **63**(7): p. 1318-26.
118. Amoli, M.M., N. Yazdani, P. Amiri, F. Sayahzadeh, V. Haghpanah, S.M. Tavangar, A. Amirzargar, H. Ghaffari, B. Nikbin, B. Larijani, L.V. Mostaan and J.T. Bazzaz, *HLA-DR association in papillary thyroid carcinoma*. *Disease Markers*, 2010. **28**(1): p. 49-53.
119. Hunt, P.J., S.E. Marshall, A.P. Weetman, M. Bunce, J.I. Bell, J.A. Wass and K.I. Welsh, *Histocompatibility leucocyte antigens and closely linked immunomodulatory genes in autoimmune thyroid disease*. *Clinical Endocrinology (Oxford)*, 2001. **55**(4): p. 491-499.
120. Maciel, L.M., S.S. Rodrigues, R.S. Dibbern, P.A. Navarro and E.A. Donadi, *Association of the HLA-DRB1*0301 and HLA-DQA1*0501 alleles with Graves' disease in a population representing the gene contribution from several ethnic backgrounds*. *Thyroid*, 2001. **11**(1): p. 31-35.
121. Simmonds, M.J. and S.C.L. Gough, *Unravelling the genetic complexity of autoimmune thyroid disease: HLA, CTLA-4 and beyond*. *Clinical and Experimental Immunology*, 2004. **136**(1): p. 1-10.
122. Petrone, A., G. Giorgi, C.A. Mesturino, M. Capizzi, I. Cascino, L. Nistico, J. Osborn, U.D. Mario and R. Buzzetti, *Association of DRB1*04-DQB1*0301 Haplotype and Lack of Association of Two Polymorphic Sites at CTLA-4 Gene with Hashimoto's Thyroiditis in an Italian Population*. *Thyroid*, 2001. **11**(2): p. 171-175.
123. Kimura, H., M. Kimura, S.-C. Tzou, Y.-C. Chen, K. Suzuki, N.R. Rose and P. Caturegli, *Expression of class II major histocompatibility complex molecules on thyrocytes does not cause*

- spontaneous thyroiditis but mildly increases its severity after immunization.* Endocrinology, 2005. **146**(3): p. 1154-1162.
124. Wherry, E.J. and M. Kurachi, *Molecular and cellular insights into T cell exhaustion.* Nature reviews. Immunology, 2015. **15**(8): p. 486-499.
 125. Tepper, R., R. Coffman and P. Leder, *An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4.* Science, 1992. **257**(5069): p. 548-551.
 126. Volpert, O.V., T. Fong, A.E. Koch, J.D. Peterson, C. Waltenbaugh, R.I. Tepper and N.P. Bouck, *Inhibition of angiogenesis by interleukin 4.* Journal of Experimental Medicine, 1998. **188**(6): p. 1039-1046.
 127. Salazar-Onfray, F., M. Petersson, L. Franksson, M. Matsuda, T. Blankenstein, K. Kärre and R. Kiessling, *IL-10 converts mouse lymphoma cells to a CTL-resistant, NK-sensitive phenotype with low but peptide-inducible MHC class I expression.* The Journal of Immunology, 1995. **154**(12): p. 6291-6298.
 128. Yang, S.W., S.H. Kang, K.R. Kim, I.H. Choi, H.S. Chang, Y.L. Oh and S.W. Hong, *Do helper T Cell subtypes in lymphocytic thyroiditis play a role in the antitumor effect?* Journal of Pathology and Translational Medicine, 2016. **50**(5): p. 377-384.
 129. Paolieri, F., C. Pronzato, M. Battifora, N. Fiorino, G.W. Canonica and M. Bagnasco, *Infiltrating gamma/delta T-cell receptor-positive lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease and papillary thyroid cancer.* Journal of Endocrinological Investigation, 1995. **18**(4): p. 295-298.
 130. Zhao, Y., C. Niu and J. Cui, *Gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells: friend or foe in cancer development?* Journal of Translational Medicine, 2018. **16**: p. 3.
 131. Caballero, Y., E.M. López-Tomassetti, J. Favre, J.R. Santana, J.J. Cabrera and J.R. Hernández, *The value of thyroperoxidase as a prognostic factor for differentiated thyroid cancer -- a long-term follow-up study.* Thyroid Research, 2015. **8**: p. 12.
 132. Ringel, M.D., J. Anderson, S.L. Souza, H.B. Burch, M. Tambascia, C.D. Shriver and R.M. Tuttle, *Expression of the sodium iodide symporter and thyroglobulin genes are reduced in papillary thyroid cancer.* Modern Pathology, 2001. **14**: p. 289.
 133. Milton, G.W., W.H. McCarthy and A. Carlon, *Malignant melanoma and vitiligo.* Australasian Journal of Dermatology, 1971. **12**(3): p. 131-142.
 134. Boon, T., J.C. Cerottini, B. Van den Eynde, P. van der Bruggen and A. Van Pel, *Tumor antigens recognized by T lymphocytes.* Annual Review of Immunology, 1994. **12**: p. 337-365.
 135. Dudley, M.E. and S.A. Rosenberg, *Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer.* Nature Reviews Cancer, 2003. **3**(9): p. 666-675.
 136. Saint-Jean, M., A.-C. Knol, C. Volteau, G. Quereux, L. Peuvrel, A. Brocard, M.-C. Pandolfino, S. Saiagh, J.-M. Nguyen, C. Bedane, N. Basset-Seguín, A. Khammari and B. Dreno, *Adoptive cell therapy with tumor-infiltrating lymphocytes in advanced melanoma patients.* Journal of Immunology Research, 2018. **2018**: p. 10.
 137. Yuan, J., B. Ginsberg, D. Page, Y. Li, T. Rasalan, H.F. Gallardo, Y. Xu, S. Adams, N. Bhardwaj, K. Busam, L.J. Old, J.P. Allison, A. Jungbluth and J.D. Wolchok, *CTLA-4 blockade increases antigen-specific CD8(+) T-cells in prevaccinated patients with melanoma: three cases.* Cancer immunology, immunotherapy : CII, 2011. **60**(8): p. 1137-1146.
 138. An, H.J., G.H. Ko, J.H. Lee, J.S. Lee, D.C. Kim, J.W. Yang, M.H. Kim, J.P. Kim, E.J. Jung and D.H. Song, *Programmed Death-Ligand 1 expression and its correlation with lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma.* Journal of Pathology and Translational Medicine, 2018. **52**(1): p. 9-13.
 139. Rosenberg, S.A., J.C. Yang, R.M. Sherry, U.S. Kammula, M.S. Hughes, G.Q. Phan, D.E. Citrin, N.P. Restifo, P.F. Robbins, J.R. Wunderlich, K.E. Morton, C.M. Laurencot, S.M. Steinberg, D.E. White and M.E. Dudley, *Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy.* Clinical Cancer Research, 2011. **17**(13): p. 4550.
 140. Rosenberg, S.A. and N.P. Restifo, *Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer.* Science, 2015. **348**(6230): p. 62.

141. Ahmadzadeh, M., L.A. Johnson, B. Heemskerk, J.R. Wunderlich, M.E. Dudley, D.E. White and S.A. Rosenberg, *Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired*. *Blood*, 2009. **114**(8): p. 1537-1544.
142. Utsuyama, M., K. Hirokawa, C. Kurashima, M. Fukayama, T. Inamatsu, K. Suzuki, W. Hashimoto and K. Sato, *Differential age-change in the numbers of CD4+CD45RA+ DC4+CD29+ T cell subsets in human peripheral blood*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 1992. **63**(1): p. 57-68.
143. Tofani, A., R. Sciuto, R.P. Cioffi, R. Pasqualoni, S. Rea, A. Festa, G.M. Gandolfo, M.C. Arista and C.L. Maini, *Radioiodine-induced changes in lymphocyte subsets in patients with differentiated thyroid carcinoma*. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 1999. **26**(8): p. 824-829.
144. Zhang, L., J. Chen, C. Xu, L. Qi and Y. Ren, *Effects of iodine-131 radiotherapy on Th17/Tc17 and Treg/Th17 cells of patients with differentiated thyroid carcinoma*. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2018. **15**(3): p. 2661-2666.
145. Smooke-Praw, S., K. Ro, O. Levin, P.H. Ituarte, A. Harari and M.W. Yeh, *Thyroglobulin antibody levels do not predict disease status in papillary thyroid cancer*. *Clinical Endocrinology (Oxford)*, 2014. **81**(2): p. 271-275.

6 Anhang

| T-Zellsubpopulation | PTC | | | HT | | | HP | | | p-Werte | | |
|--|-----|----------|-------|----|----------|-------|----|----------|-------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | n | Mean (%) | s | n | Mean (%) | s | n | Mean (%) | s | PTC u. HT | PTC u. HP | HT u. HP |
| T-Helferzellen/ zytotox. T-Zellen | | | | | | | | | | | | |
| T-Helferzellen | 92 | 61,24 | 10,94 | 49 | 65,19 | 12,82 | 16 | 64,17 | 10,12 | 0,129 ⁿ | 0,615 ⁿ | 0,948 ⁿ |
| Zytotox. T-Zellen (CTL) | 92 | 28,57 | 9,37 | 49 | 25,71 | 10,68 | 16 | 27,34 | 10,55 | 0,235 ⁿ | 0,890 ⁿ | 0,836 ⁿ |
| Helfer/Zytotox. T-Zellen | 92 | 2,62 | 1,7 | 49 | 6,77 | 16,25 | 16 | 6,98 | 18,46 | 0,079 | 0,534 | 0,584 |
| Doppelneg. T-Zellen | 92 | 8,87 | 5,26 | 49 | 7,29 | 4,56 | 16 | 7,68 | 4,28 | 0,063 | 0,494 | 0,653 |
| T-Helferzellen | | | | | | | | | | | | |
| Th1-Zellen | 93 | 15,27 | 7,87 | 51 | 18,86 | 6,49 | 17 | 17,18 | 4,91 | 0,002 | 0,121 | 0,376 |
| Th2-Zellen | 93 | 19,09 | 6,44 | 51 | 19,01 | 7,13 | 17 | 15,11 | 5,12 | 0,914 | 0,006 | 0,017 |
| Th1/Th2-Zellen | 93 | 0,96 | 0,83 | 51 | 1,4 | 2,14 | 17 | 1,27 | 0,57 | 0,011 | 0,011 | 0,339 |
| Regulierende T-Zellen | 89 | 0,73 | 0,9 | 46 | 0,09 | 0,12 | 16 | 0,07 | 0,08 | 0,000 | 0,000 | 0,702 |
| Erschöpfte (exhausted) T-Zellen | | | | | | | | | | | | |
| exh. CD4 TIM | 90 | 1,16 | 0,79 | 45 | 1,33 | 1,17 | 15 | 1,29 | 0,62 | 0,868 | 0,343 | 0,335 |
| exh. CD4 CD279 | 87 | 3,04 | 2,71 | 44 | 2,47 | 1,73 | 15 | 4,24 | 3,5 | 0,534 | 0,199 | 0,105 |
| exh. CD4/PD-1/TIM3 | 86 | 0,44 | 0,29 | 43 | 2,24 | 4,87 | 15 | 1,15 | 1,08 | 0,000 | 0,005 | 0,57 |
| exh. CD8 TIM | 88 | 11,98 | 7,59 | 44 | 12,06 | 10,37 | 15 | 7,02 | 4,41 | 0,479 | 0,010 | 0,102 |
| exh. CD8 CD279 | 85 | 3,99 | 3,4 | 43 | 3,88 | 3,1 | 15 | 6,37 | 5,24 | 0,914 | 0,088 | 0,083 |
| exh. CD8/PD1/TIM3 | 83 | 1,33 | 0,91 | 42 | 0,39 | 0,34 | 15 | 0,37 | 0,25 | 0,000 | 0,000 | 0,913 |
| Anergische T-Zellen | | | | | | | | | | | | |
| Anerg. T-Helferzellen | 90 | 1,82 | 1,27 | 49 | 1,82 | 1,55 | 16 | 1,55 | 0,87 | 0,836 | 0,665 | 0,927 |
| Anerg. zytotox. T-Zellen | 90 | 1,17 | 1,32 | 48 | 1,47 | 2,15 | 15 | 1,02 | 0,82 | 0,959 | 0,920 | 0,936 |
| Weitere | | | | | | | | | | | | |
| Natürliche Killer-T-Zellen | 93 | 2,79 | 2,12 | 46 | 2,33 | 2,2 | 16 | 2,14 | 2,01 | 0,151 | 0,258 | 0,949 |
| Aktiv. zytotox T-Zellen | 88 | 1,38 | 1,41 | 45 | 1,03 | 1,27 | 14 | 0,89 | 0,63 | 0,117 | 0,641 | 0,331 |
| Γδ T-Zellen | 84 | 8,84 | 6,18 | 44 | 6,09 | 5,03 | 15 | 5,94 | 2,75 | 0,000 | 0,068 | 0,365 |

Tabelle 6.1 Ergebnisse der T-Zellsubpopulationsanalyse in Abhängigkeit der Diagnosen Anteile der vorliegenden T-Zellsub-populationen bei PTC (papillärem Schilddrüsenkarzinom), HP (Kontrollkollektiv) und HT (Hashimoto Thyreoiditis), x^n = Normalverteilung gegeben, One-Way-ANOVA Analyse, $p < 0,05$ signifikant; übrige Daten analysiert mit Kruskal-Wallis und Mann Whitney U Test, Bonferroni Korrektur, $p < 0,01667$ signifikant (signifikante Daten sind hervorgehoben).

| T-Zellsubpopulationen | PTC Tg > 0,2ng/ml | | | PTC Tg = 0 ng/ml | | | p-Wert |
|--|----------------------|----------|-------|---------------------|----------|------|--------------------------|
| | n | Mean (%) | s | n | Mean (%) | s | |
| T-Helferzellen/ zytotox. T-Zellen | | | | | | | |
| CD4+ T-Zellen | 15 | 55,87 | 13,05 | 59 | 62,16 | 9,67 | 0,040ⁿ |
| CD8+ T-Zellen | 15 | 33,42 | 12,1 | 59 | 27,55 | 8,89 | 0,038ⁿ |
| Verhältnis Helfer/Zytotox. T-Zellen | 15 | 2,40 | 2,72 | 59 | 2,67 | 1,47 | 0,028 |
| Doppelneg. T-Zellen | 15 | 8,33 | 6,20 | 59 | 9,13 | 5,59 | 0,456 |
| T-Helferzellen | | | | | | | |
| Th1-Zellen | 15 | 16,54 | 9,28 | 58 | 13,74 | 7,36 | 0,219 ⁿ |
| Th2-Zellen | 15 | 18,20 | 7,60 | 58 | 19,39 | 6,48 | 0,541 ⁿ |
| Zellverhältnis Th1/Th2 | 15 | 1,13 | 0,85 | 58 | 0,87 | 0,88 | 0,283 |
| Regulierende T-Zellen | 15 | 0,49 | 0,50 | 57 | 0,82 | 1,00 | 0,255 |
| Erschöpfte (exhausted) T-Zellen | | | | | | | |
| exh. CD4 TIM | 14 | 1,29 | 1,27 | 58 | 1,18 | 0,74 | 0,508 |
| exh. CD4 CD279 | 14 | 3,16 | 2,90 | 55 | 3,28 | 2,98 | 0,698 |
| exh. CD4/PD-1/TIM3 | 14 | 0,43 | 0,22 | 54 | 0,45 | 0,32 | 0,861 |
| exh. CD8 TIM | 14 | 10,05 | 7,89 | 55 | 11,76 | 6,98 | 0,343 |
| exh. CD8 CD279 | 14 | 3,75 | 4,25 | 52 | 4,36 | 3,38 | 0,224 |
| exh. CD8/PD1/TIM3 | 14 | 1,25 | 1,10 | 59 | 1,35 | 0,87 | 0,412 |
| Anergische T-Zellen | | | | | | | |
| Anergische T-Helferzellen | 15 | 1,85 | 1,61 | 58 | 1,87 | 1,18 | 0,499 |
| Anergische zytotox. T-Zellen | 14 | 1,07 | 0,66 | 58 | 1,09 | 0,97 | 0,584 |
| Weitere | | | | | | | |
| Natürliche Killer-T-Zellen | 14 | 2,75 | 2,55 | 59 | 2,58 | 1,85 | 0,817 |
| aktivierte zytotoxische Zellen | 14 | 1,09 | 1,46 | 57 | 1,55 | 1,52 | 0,179 |
| Γδ T-Zellen | 11 | 7,33 | 4,13 | 55 | 9,37 | 6,95 | 0,434 |

Tabelle 6.2 Ergebnisse der T-Zellsubpopulationsanalyse in Abhängigkeit des Tumorstatus
Vergleich zwischen PTC-Patienten mit aktivem Tumor (Tg > 0,2ng/ml) und PTC-Patienten in Remission.
Normalverteilung überprüft mit Shapiro-Wilk Test, x^n = Normalverteilung gegeben, Daten mit t-Test analysiert, alle weiteren Daten mit Mann Whitney U Test, p Werte < 0,05 sind als signifikant anzusehen (signifikante Daten sind hervorgehoben).

| T-Zellsubpopulationen | Metastasiertes PTC | | | Lokales PTC | | | p-Wert |
|---|--------------------|----------|-------|-------------|----------|-------|--------------------|
| | n | Mean (%) | s | n | Mean (%) | s | |
| Helferzellen/ zytotox. T-Zellen | | | | | | | |
| CD4+ T-Zellen | 29 | 58,82 | 11,79 | 62 | 62,54 | 10,41 | 0,131 ⁿ |
| CD8+ T-Zellen | 29 | 30,60 | 9,86 | 62 | 27,38 | 8,90 | 0,124 ⁿ |
| Zellverhältnis CD4+/CD8+ | 29 | 2,48 | 2,18 | 62 | 2,70 | 1,45 | 0,084 |
| Doppelneg. T-Zellen | 29 | 9,12 | 6,32 | 62 | 8,82 | 4,76 | 0,702 |
| Helferzellen | | | | | | | |
| Th1-Zellen | 30 | 15,89 | 10,57 | 62 | 14,97 | 6,32 | 0,664 ⁿ |
| Th2-Zellen | 30 | 19,18 | 5,63 | 62 | 19,19 | 6,79 | 0,993 ⁿ |
| Zellverhältnis Th1/Th2 | 30 | 0,91 | 0,74 | 62 | 0,97 | 0,88 | 0,653 |
| Regulierende T-Zellen | 29 | 0,84 | 0,97 | 59 | 0,68 | 0,87 | 0,128 |
| Erschöpfte (<i>exhausted</i>) T-Zellen | | | | | | | |
| exh. CD4 TIM | 27 | 1,37 | 0,80 | 60 | 1,02 | 0,72 | 0,030 |
| exh. CD4 CD279 | 25 | 4,14 | 3,55 | 59 | 2,48 | 1,77 | 0,094 |
| exh. CD4/PD-1/TIM3 | 25 | 0,51 | 0,43 | 58 | 0,43 | 0,27 | 0,677 |
| exh. CD8 TIM | 28 | 12,87 | 7,01 | 60 | 11,34 | 7,49 | 0,215 |
| exh. CD8 CD279 | 26 | 4,67 | 4,8 | 59 | 3,84 | 3,07 | 0,966 |
| exh. CD8/PD1/TIM3 | 26 | 1,59 | 1,37 | 57 | 1,31 | 0,84 | 0,765 |
| Anergische T-Zellen | | | | | | | |
| Anergische T-Helferzellen | 29 | 1,65 | 1,07 | 60 | 1,93 | 1,34 | 0,473 |
| Anergische zytotox. T-Zellen | 28 | 0,93 | 0,91 | 59 | 1,09 | 0,91 | 0,268 |
| Weitere | | | | | | | |
| Natürliche Killer-T-Zellen | 30 | 2,98 | 2,40 | 62 | 2,74 | 1,99 | 0,861 |
| aktivierte zytotoxische Zellen | 27 | 1,52 | 1,77 | 60 | 1,34 | 1,23 | 0,811 |
| Γδ T-Zellen | 27 | 8,41 | 5,01 | 54 | 8,78 | 6,02 | 0,791 |

Tabelle 6.3 Ergebnisse der T-Zellsubpopulationsanalyse in Abhängigkeit der Metastasierungstendenz Vergleich zwischen PTC-Patienten mit Metastasen (Lymphknotenmetastasen und/oder Fernmetastasen) und PTC-Patienten ohne Ausbildung von Metastasen. Normalverteilung überprüft mit Shapiro-Wilk Test, x^n = Normalverteilung gegeben, Daten mit t-Test analysiert, alle weiteren Daten mit Mann Whitney U Test, p Werte < 0,05 sind als signifikant anzusehen

DANKSAGUNGEN

Die Abfassung dieser Dissertation wurde mir durch die Unterstützung verschiedenster Personen ermöglicht, denen an dieser Stelle herzlich gedankt sei. Dank gilt allen voran dem Patientenkollektiv und dem Team des Funktionsbereichs Spezielle Endokrinologie, die die zugrundeliegenden Untersuchungen ermöglicht haben.

Meinem Doktorvater Professor Dr. Matthias Schott danke ich insbesondere für die Bereitstellung des Dissertationsthemas. In der Zeit der Abfassung dieser Dissertation gab er meinen Fragestellungen stets mittels unmittelbarer Ansprechbarkeit Raum und vermittelte mir die wissenschaftlichen Hintergründe der endokrinologischen Forschung gleichsam mit der Begeisterung für diese. Weiterhin danke ich ihm für die Vermittlung eines halbjährigen Forschungsaufenthaltes in der Endokrinologie des Mount Sinai Hospitals, New York. Frau Dr. Margret Ehlers gilt mein herzlicher Dank für ihre fortwährende Unterstützung. Mit ihrem reichen Wissensschatz, ihrer Bereitschaft, diesen weiterzugeben und ihrer unermüdlichen, positiven Herangehensweise an wissenschaftliche Fragestellungen ist sie ein Vorbild für mich. Weiterhin danke ich insbesondere Frau Roswitha Charko und Frau Ursula Dötter für die Vermittlung der benötigten methodischen Kenntnisse, für die fortwährende technische Unterstützung und für die herzliche Aufnahme in ihr Team.

Besonderer Dank gilt ebenso meiner Familie. Meinen Eltern Silvia Pfeiffer-Kuebart und Dr. Gerhard Kuebart, die meine wissenschaftliche Neugier jeher ideell und finanziell förderten und mir den Wunsch, wissenschaftlich zu arbeiten, sowie dessen Umsetzung, ermöglichten, danke ich zutiefst. Meinen Brüdern Andreas und Julius Kuebart, Frau Laura Timbul und Frau Ann-Cathrin Helling danke ich für gehaltvolle wissenschaftliche Diskurse und fortwährende Ermutigungen. In besonderem Maße bedanke ich mich bei meinem Partner Kris Gierschner, der mein wissenschaftliches Engagement allzeit mit Verständnis wertschätzte und dessen positiver Zuspruch eine besondere Motivation darstellte.