

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde  
der Universität zu Lübeck  
Direktorin Prof. Dr. med. B. Wollenberg

---

UNTERSUCHUNG DER FUNKTIONELLEN BEEINFLUSSUNG  
HUMANER PLASMAZYTOIDER DENDRITISCHER ZELLEN  
DURCH HNSCC -  
DIE REGULATION DER IFN- $\alpha$  SEKRETION

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von  
Sabrina Jeske  
aus Minden

Lübeck 2012

---

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Barbara Wollenberg

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Fetscher

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 16.10.2012

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

---

Für meine Eltern und alle anderen  
- die nie aufgegeben haben



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Ausgangspunkt und Ziele der Arbeit.....	1
1.2 Das humane Immunsystem und Gefahrensignale .....	3
1.2.1 Spezifische und unspezifische Immunabwehr.....	3
1.2.2 Phylogenetisch konservierte Erkennungsmuster der Pathogene .....	4
1.2.3 <i>Toll-like</i> Rezeptoren .....	5
1.2.4 TH1 versus TH2 Antwort – der Einfluss von Zytokinen auf die funktionelle Aktivität des Immunsystems .....	6
1.3 Dendritische Zellen im humanen Immunsystem .....	7
1.3.1 Die plasmazytoide dendritische Zelle .....	8
1.4 CpG Oligodesoxynukleotide .....	14
1.4.1 Unterschiedliche Klassen von CpG ODN .....	15
1.4.2 Erkennung von CpG ODN durch TLR9 .....	17
1.4.3 Wirkungsweise von CpG ODN auf das Immunsystem .....	18
1.5 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches.....	20
1.5.1 Immuneescape.....	21
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>26</b>
2.1 Material.....	26
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	26
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	27
2.1.3 Reagenzien .....	27
2.1.4 Puffer und Zellmedien .....	28
2.1.5 Assays und Module .....	29

---

2.1.6	Antikörper .....	30
2.1.7	Oligodesoxynukleotide .....	31
2.1.8	Zytokine.....	32
2.1.9	Zelllinien und primäre Zellen .....	33
2.2	Methoden.....	34
2.2.1	Zellkulturarbeiten.....	34
2.2.2	Zellkultur.....	34
2.2.3	Bestimmung der Zellzahl .....	34
2.2.4	Kultivierung von HNSCC Zellen .....	35
2.2.5	Isolierung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut.....	36
2.2.6	Separation plasmazytoider dendritischer Zellen mittels magnetischer Zellsortierung.....	37
2.2.7	Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden im Photometer .....	38
2.2.8	Kultivierung und Stimulierung plasmazytoider dendritischer Zellen.....	38
2.2.9	IFN- $\alpha$ ELISA .....	39
2.2.10	Proteinbiochemie.....	41
2.2.11	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) .....	43
2.2.12	Wachstumsanalyse (MTT-Test) .....	45
2.3	Statistische Analyse.....	46
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
3.1	Charakterisierung der IFN- $\alpha$ Sekretion von plasmazytoiden dendritischen Zellen nach Stimulierung mit CpG ODN in Abhängigkeit von Zeit und Konzentration .....	47
3.1.1	Bestimmung der IFN- $\alpha$ Sekretion in Abhängigkeit der Konzentration des Klasse A CpG ODN 2216.....	47
3.1.2	Bestimmung der quantitativen IFN- $\alpha$ Ausschüttung der isolierten pDCs als Antwort auf unterschiedliche Klassen CpG ODN.....	49
3.1.3	Untersuchung der IFN- $\alpha$ Sekretion in Abhängigkeit der Inkubationsdauer. .....	51

---

3.2	Der Einfluss von HNSCC auf die CpG ODN induzierte IFN- $\alpha$ Sekretion .....	55
3.2.1	Ein löslicher Faktor im Tumormilieu bedingt die Hemmung der CpG ODN induzierten IFN- $\alpha$ Ausschüttung .....	55
3.2.2	Vergleich der Auswirkungen von HNSCC auf die unterschiedlichen Klassen der CpG Motive .....	57
3.2.3	Untersuchung zur Auswirkung der Vorinkubation mit HNSCC auf die CpG ODN induzierte IFN- $\alpha$ Sekretion .....	59
3.2.4	Untersuchungen zum Einfluss von IL-6, IL-8 und IL-10 auf die CpG induzierte IFN- $\alpha$ Ausschüttung .....	60
3.2.5	Apoptose und Zelltod von pDCs unter dem Einfluss von HNSCC, Interleukin-6, IL-8, IL-10 und CpG ODN .....	65
3.2.6	Der Einfluss des Interleukin-10-Rezeptor Antikörpers auf die CpG ODN 2216 induzierte IFN- $\alpha$ Sekretion von pDCs unter dem Einfluss von HNSCC und IL-10 .....	67
3.3	IFN- $\alpha$ Sekretion von pDCs in Kultur mit PBMCs .....	69
3.4	Expression der <i>Toll-like</i> Rezeptoren TLR1, TLR7 und TLR9 unter dem Einfluss von HNSCC und CpG ODN .....	70
3.5	Der Einfluss von CpG ODN Motiven und dem IL-10-Rezeptor Antikörper auf die Proliferation von HNSCC .....	74
3.6	Der Einfluss von Phosphothioat-Modifizierungen und Poly-Guanosin Verlängerung am 3'Ende von CpG ODN auf die IFN- $\alpha$ Sekretion und Differenzierung der pDCs .....	76
3.6.1	Funktionsanalyse der IFN- $\alpha$ Induktion nach Modifikation der CpG ODN Sequenz .....	76
3.6.2	Expression von <i>Toll-like</i> Rezeptoren, Migrations- und Reifemarkern von pDCs nach Stimulation mit modifizierten CPG ODN Motiven .....	77
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>82</b>
4.1	Die CpG induzierte IFN- $\alpha$ Sekretion von pDCs ist zeit- und konzentrationsabhängig .....	82
4.1.1	Faktoren die auf die CpG ODN induzierte IFN- $\alpha$ Sekretion von pDCs Einfluss nehmen .....	83

---

4.2	Einfluss von HNSCC auf die Funktionalität der pDCs.....	85
4.2.1	Der Rückgang der TLR9 Expression als Erklärung der verminderten IFN- $\alpha$ Sekretion unter HNSCC Einfluss? .....	86
4.2.2	Die Wirkung von IL-10 auf pDCs .....	87
4.3	Die Wirkung der Strukturunterschiede/-modifikationen der CpG ODN .....	88
4.4	pDC, das Bindeglied zwischen Immunstimulation und Toleranzinduktion ....	82
4.5	Bisherige Therapiemöglichkeiten und Therapieansätze .....	91
4.5.1	Therapeutische Möglichkeiten mit CpG ODN bei Tumorerkrankungen ..	95
4.6	In vitro versus in vivo .....	99
4.6.1	pDCs in Reinkultur versus PBMCs.....	100
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>101</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>103</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>119</b>
<b>8</b>	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>120</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>122</b>
9.1	Abbildungsverzeichnis .....	122
9.2	Tabellenverzeichnis .....	124
9.3	Eidesstattliche Versicherung .....	125
9.4	Lebenslauf .....	126

---

## Abkürzungsverzeichnis

Geläufige Maßeinheiten und Abkürzungen werden als bekannt vorausgesetzt.

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zelle
BDCA	blood dendritic cell antigen
bFGF	basic fibroblast growth factor
CD	cluster of differentiation
COX	Cyclooxygenase
CpG	Cytidin-Guanosin-Dinukleotid
DC	<i>dendritic cell</i> / dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzym-linked immunosorbent assay
et al.	<i>lat.:</i> et alii (Maskulinum) / und andere
FACS	fluorescence-activated cell sorting / Durchflusszytometer
FAP	Fibroblasten-Aktivierungs-Protein
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein (Fluoreszenzfarbstoff)
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> / Granulozyten-Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor
HLA	<i>human leukocyte antigen</i> / humans Leukozyten Antigen
HNSCC	<i>human head and neck squamous cell carcinoma</i> / humans Kopf und Hals Plattenepithelkarzinom
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> / Meerrettich-Peroxidase
IFN	Interferon
i.v.	intravenös
L	Ligand
LMWF	<i>low molecular weight factors</i> / Niedrigmolekulargewicht Faktoren
LTB4	Leukotrien B4
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i> / magnetisch aktivierte Zellsortierung
MAPK	mitogen-activated protein kinase / Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mDC	myeloide dendritische Zelle
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i> / mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> / Haupthistokompatibilitätskomplex

---

ng	Nanogramm ( $10^{-9}$ g)
OD	Optische Dichte
ODN	Oligodesoxynukleotid
PAF	<i>platelet activating factor</i> / Plättchen aktivierender Faktor
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> / periphere mononukleare Blutzellen
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> / Phosphat gepufferte Salzlösung
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin (Fluoreszenzfarbstoff)
PeCy7	Phycoerythrin-Cy7 (Fluoreszenzfarbstoff)
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein (Fluoreszenzfarbstoff)
pg	Pikogramm ( $10^{-12}$ g)
PGE	Prostaglandin
PTO	Phosphothioat
R	Rezeptor
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß/Determinationskoeffizient
RIPA	radio immunoprecipitation assay
SEM	<i>Standard Error Mean</i> / Standardfehler des Mittelwertes
s.c.	subkutan
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> / Natriumdodecylsulfat
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i> / Signalgeber und Aktivator der Transkription 3
TGF	<i>transforming growth factor</i> / umwandelnder Wachstumsfaktor
TH	<i>T helper cell</i> / T-Helferzelle
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zelle
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> / Angiogenese-Wachstumsfaktor

Weitere Abkürzungen sind an gegebener Stelle im Text erklärt.

# 1 Einleitung

## 1.1 Ausgangspunkt und Ziele der Arbeit

Im Rahmen der Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe „Tumorbiologie/ Immuntherapie von Kopf-Hals-Karzinomen“ soll in dieser Doktorarbeit die Funktionsweise der humanen plasmazytoiden Zellen im Abwehrmechanismus des menschlichen Immunsystems gegen Kopf-Hals-Karzinome (HNSCC) genauer untersucht und diskutiert werden.

Kopf-Hals-Karzinome werden von Effektorzellen des Immunsystems infiltriert, jedoch zeigt sich bei den Patienten eine deutliche Verminderung der zellvermittelten Immunfunktionen. In Vorarbeiten konnte auch die Anwesenheit von plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) in soliden Tumoren und in deren drainierenden Lymphknoten nachgewiesen werden. pDCs sind neben ihrer Funktion als Antigen-präsentierende Zellen zusätzlich durch die Bildung von großen Mengen an Typ I IFN (IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ ) charakterisiert und spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von viralen Infektionen. CpG-Oligodesoxynukleotide (CpG ODN) sind kurze Palindromsequenzen und bis heute der einzige definierte mikrobielle Stimulus der von pDCs über die Expression des *Toll-like* Rezeptors-9 erkannt wird und eine Ausschüttung von IFN- $\alpha$  seitens dieser bewirkt. Sie stellen somit ein potentes Gefahrensignal dar und sind in der Lage eine effektive Immunantwort gegen ein gleichzeitig detektiertes Antigen auszulösen. pDCs stellen daher aufgrund ihrer immunstimulierenden Wirkung durch ihre IFN- $\alpha$  Produktion einen vielversprechenden Ansatz in der Krebstherapie dar. Jedoch konnte in Untersuchungen festgestellt werden, dass die Tumorzellen einen negativen Einfluss auf die Funktionalität der IFN- $\alpha$  Produktion der pDCs haben.

Gegenstand der hier vorliegenden Dissertation ist es, den Einfluss, den Tumorzellen des Kopf-Hals-Bereiches auf die plasmazytoide dendritische Zelle nehmen, genauer zu untersuchen. Es soll die Auswirkung auf die Regulation der IFN- $\alpha$  Sekretion untersucht werden, wie dieser Mechanismus funktioniert und ob dieser eventuell umkehrbar ist.

Die Fragestellung dieser Arbeit gliederte sich wie folgt:

- 1) Wie reagieren plasmazytoide dendritische Zellen auf die Stimulation mit CpG ODN?
  - a. Welche Konzentration ergibt einen optimalen Stimulus?
  - b. In welchem Zeitraum findet das Maximum der INF- $\alpha$  Sekretion statt?
  - c. Wie verhält sich die INF- $\alpha$  Sekretion der einzelnen CpG ODN Klassen?  
Welche Unterschiede zeigen sich in der Kinetik?
  
- 2) Welchen Einfluss hat HNSCC auf die CpG ODN induzierte INF- $\alpha$  Sekretion von plasmazytoiden dendritischen Zellen?
  - a. Handelt es sich hierbei um einen löslichen Faktor im Tumormilieu oder um einen Effekt der durch Zell-Zell-Kontakt hervorgerufen wird?
  - b. Ist dieser Einfluss blockierbar?
  
- 3) Welchen Einfluss haben Strukturmodifikationen am CpG ODN auf die induzierte INF- $\alpha$  Sekretion?

## 1.2 Das humane Immunsystem und Gefahrensignale

Das Immunsystem stellt ein ausgeklügeltes Netzwerk an Abwehrzellen, löslichen Proteinen und Organen dar, die es ermöglichen Pathogene zu erkennen und diese zu bekämpfen. Hierbei muss es dem Organismus vor allem aber auch gelingen zwischen körpereigenen funktionstüchtigen Zellen und körperfremden, sowie entarteten körpereigenen Zellen zu unterscheiden. In der Pathogenese von Allergien und Autoimmunerkrankungen, sowie der Entstehung von Krebserkrankungen zeigt sich, dass dieses manches Mal eine große Herausforderung darstellt und auch nicht immer einwandfrei funktioniert.

Betrachtet man nun die Modulation dieses Systems als Therapieoption in der modernen Medizin, ist es somit von grundlegender Wichtigkeit die einzelnen Vorgänge und Regulationsmechanismen zu verstehen, um punktuell und wirksam darin eingreifen zu können.

### 1.2.1 Spezifische und unspezifische Immunabwehr

Innerhalb der immunologischen Abwehr unterscheidet man ein unspezifisches (angeborenes) und ein spezifisches (adaptives/erworbenes) Immunsystem.

Die Hauptfunktionen des unspezifischen Immunsystems bestehen aus Phagozytose, Freisetzung von Mediatoren und Antigenpräsentation. Die wichtigsten Zellen sind hierbei neutrophile Granulozyten, Monozyten, natürliche Killerzellen und Makrophagen, sowie das Komplementsystem. Das angeborene Immunsystem funktioniert über bereits in der Keimbahn kodierte Rezeptoren und kann dadurch z.B. auch zwischen körpereigenen und -fremden Zellen unterscheiden. Somit kann die angeborene Immunabwehr Pathogene bekämpfen, ohne dass der Organismus vorher mit dem Erreger selbst Kontakt gehabt hat. Auch die *Toll-like* Rezeptoren gehören zu diesem System. Die Makrophagen stellen das Bindeglied zwischen unspezifischer und spezifischer Abwehr dar. Nachdem sie einen Erreger phagozytiert haben, werden spezifische Proteine von ihm mit dem *major histocompatibility complex* (MHC) kombiniert und so den T-Lymphozyten präsentiert <sup>[2]</sup>.

Das spezifische Immunsystem zeichnet sich durch die Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen oder veränderten Krankheitserregern aus. Durch die sogenannte somatische Rekombination während der Zellreifung ist es möglich eine große

Variation an Immunglobulinen und Antigenrezeptoren zu gewährleisten, so dass die Zellen der adaptiven Immunabwehr in der Lage sind, Antigene der Angreifer zu erkennen und gezielt zelluläre Abwehrmechanismen und molekulare Antikörper zu bilden (klonale Expansion). Neben antigenpräsentierenden Zellen (APC), zu denen auch die plasmazytoiden dendritischen Zellen gehören, stellen zwei Gruppen von Zellen die wesentlichen Elemente der adaptiven Immunität dar. Die T-Lymphozyten, welche zum einen die zellvermittelte Immunantwort gewährleisten und zum anderen die B-Lymphozyten unterstützen, sowie die B-Lymphozyten selbst, die für die humorale Immunität verantwortlich sind. Nach der Infektion bleiben spezifische Antikörper und Gedächtniszellen erhalten, um bei erneutem Kontakt mit dem Krankheitserreger binnen kurzer Zeit eine angemessene Abwehrreaktion zu ermöglichen. Durch Kontrollmechanismen, wie zum Beispiel die klonale Deletion, werden T-Zellen, die auf körpereigene Antigene reagieren, erkannt und gestoppt [2].

### 1.2.2 Phylogenetisch konservierte Erkennungsmuster der Pathogene

Durch die somatische Rekombination können im Laufe des Lebens etwa  $10^{14}$  -  $10^{18}$  verschiedene T-Zell-Rezeptoren und Immunglobuline generiert werden. Der begrenzende Faktor hierbei ist die Größe des Genoms und somit die Kodiermöglichkeiten [2].

Das Immunsystem macht sich bei der Erkennung von Pathogenen unveränderliche Merkmale zu Nutze, die so genannten Pathogenassoziierten molekularen Muster (engl. „*pathogen-associated molecular patterns*“, PAMP). Diese sind so eng mit dem Überleben des Erregers verbunden, dass dieser sie nicht einfach ändern kann, um etwa der Immunreaktion zu entgehen. Bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) werden als Prototyp der PAMP angesehen. Zu dieser Gruppe gehören zum Beispiel auch das Flagellin von Bakterien, die Lipoteichonsäure gram positiver Bakterien, Peptidoglykan, sowie Varianten der Nukleinsäure wie etwa die doppelsträngige RNA (dsRNA) von Viren oder unmethylierte CpG Motive.

Diese molekularen Muster werden durch die sogenannten Mustererkennungsrezeptoren (engl. „*pattern-recognition receptors*“, PRR), die sich auf und/oder in den Zellen des angeborenen Immunsystems befinden, erkannt. Zu dieser Gruppe gehören zum Beispiel die *Toll-like* Rezeptoren (TLR), das Mannose-bindende Lektin und die Scavenger-Rezeptoren [2].

### 1.2.3 *Toll-like* Rezeptoren

Die *Toll-like* Rezeptoren sind wohl die am besten charakterisierte Gruppe der Mustererkennungsrezeptoren. Seit der Entdeckung des ersten *Toll-like* Rezeptors Mitte der 1990er Jahre, sind jedes Jahr neue Varianten in Menschen und Tieren entdeckt worden. TLRs finden sich in allen Wirbeltieren, auch in einfacheren Organismen, wie zum Beispiel in *Drosophila melanogaster*, der viel untersuchten schwarzbäuchigen Taufliege. Diese zeigt, obwohl sie kein adaptives Immunsystem besitzt, eine effektive Abwehr gegen Pathogene <sup>[3]</sup>. In Untersuchungen an *toll*-negativen-Mutanten entdeckte man, dass diese anfälliger gegenüber Pilzbefall waren. Eher durch Zufall, denn man ging zuerst davon aus, dass die kodierenden Gene verantwortlich für die dorso-ventrale Ausrichtung in der Embryonalentwicklung seien <sup>[4]</sup>.

Dieses legt nahe, dass es sich um ein evolutionär sehr altes System handelt. Die meisten Spezies verfügen über mehr als 10 verschiedene TLRs, wobei manche etwa in der Maus, aber jedoch nicht im Menschen vorkommen.

Als Teil des menschlichen Immunsystems sind zurzeit 10 *Toll-like* Rezeptor Typen identifiziert worden, deren Liganden meist mikrobiellen Ursprungs sind. Durch Heterodimerisierung der TLRs (z.B. TLR2 und TLR6) wird die Erkennungsbreite nochmals erweitert <sup>[5]</sup>.

Die einzelnen Signaltransduktionswege der *Toll-like* Rezeptoren unterscheiden sich in Teilen, weisen jedoch auch einige Übereinstimmungen auf <sup>[6]</sup>. Wird ein Ligand von dem dazugehörigen *Toll-like* Rezeptor erkannt und gebunden, rekrutiert dieser ein Signalmolekül in seine intrazelluläre Signaldomäne. Dieses führt über ein Adapterprotein z.B. MyD88, zu einer Aktivierung des nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) und der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP-Kinase) und zu der Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine. Neben MyD88 wurden noch weitere Adapterproteine identifiziert, die die Spezifität der einzelnen TLR Signalwege garantieren. Zu denen gehören das *TIR domain-containing adapter protein* (TIRAP) und das *TIR domain-containing adapter inducing IFN- $\beta$*  (TRIF). TIRAP scheint eine Rolle in der Kaskade der TLR 2 und TLR4 zu spielen, neben MyD88 <sup>[7]</sup>. TRIF induziert MyD88 unabhängig über die Induktion der *IFN-regulatory factors* (IRF) 3 und 7 die Transkription von IFN Typ I <sup>[8]</sup>.

*Toll-like* Rezeptoren können membranständig lokalisiert sein, im Zytoplasma oder auch endosomal <sup>[2]</sup>.

#### 1.2.4 TH1 versus TH2 Antwort – der Einfluss von Zytokinen auf die funktionelle Aktivität des Immunsystems

T-Zellen sind durch die Expression des T-Zell-Rezeptors gekennzeichnet. Dieser vermittelt die Erkennung von Peptidantigenen, die über MHC-Komplexe der Klasse I oder II dargeboten werden. Die antigenspezifischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des T-Zell-Rezeptors sind mit invarianten Ketten assoziiert, die als CD3 bezeichnet werden. Durch CD3 wird die Signaltransduktion nach Bindung des T-Zell-Rezeptors an einen Antigen-MHC-Komplex vermittelt <sup>[9]</sup>. Für die vollständige T-Zellaktivierung ist neben der Bindung des T-Zell-Rezeptors an den Antigen-MHC-Komplex die Interaktion kostimulatorischer Moleküle wie CD28 bzw. CD154 (CD40L) auf der T-Zelloberfläche und CD80/CD86 (Synonym B7.1/B7.2) bzw. CD40 auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen von Bedeutung <sup>[10-11]</sup>.

Es werden T-Zell-Subpopulationen unterschieden. CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermitteln einen zytotoxischen Effekt gegenüber Zellen, die mit intrazellulären Bakterien oder Viren infiziert sind oder mutierte Oberflächenproteine präsentieren <sup>[12]</sup>. CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die sogenannten T-Helfer-Zellen, regulieren zelluläre und humorale Immunreaktionen. Dabei weisen CD4<sup>+</sup> T-Zellen unterschiedliche Differenzierungen auf, die jeweils durch eine charakteristische Zytokinsekretion gekennzeichnet sind.

Ein wesentlicher Faktor für die Einleitung einer effektiven Immunantwort ist die Stimulation der unterschiedlichen T-Zell Subpopulationen. TH1-Zellen produzieren vor allem IFN- $\gamma$  und IL-12, was die zelluläre Immunität stärkt; dahingegen setzen TH2-Zellen viel IL-4 und IL-5 frei, wichtige Faktoren für die IgE-Produktion und Eosinophilie (allergischer Entzündungstyp) <sup>[2]</sup>. Eine strikte Unterscheidung beim Menschen ist nicht immer möglich, man spricht daher meist eher von einem TH1- oder TH2-ähnlichen Zytokinmuster. Trotzdem hat sich dieses Konzept gut bewährt, um unterschiedliche Erkrankungsabläufe besser zu verstehen.

Die für die TH1- beziehungsweise TH2-Immunantwort charakteristischen Zytokine führen zu einer Inhibition der Ausreifung und Funktion des jeweils anderen Phänotyps. So hemmt IFN- $\gamma$  die Proliferation von TH2 Zellen sowie die IgE-Synthese humaner PBMC in vitro <sup>[13]</sup>. IL-4 induziert hingegen eine verminderte Expression der  $\beta$ 2-Untereinheit des IL-12-Rezeptors auf TH2-Zellen und wirkt somit der TH1-induzierenden Wirkung von IL-12 entgegen und stimuliert die Differenzierung naiver T-Zellen zu TH2-Zellen. Dementgegen induzieren die Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-12 und TGF- $\beta$  die Entwicklung einer TH1-Immunantwort.

So wird ein Ungleichgewicht der TH1/TH2 Antwort in der Entstehung und Aufrechterhaltung vieler chronischer Krankheiten diskutiert. So findet sich bei Allergikern eine TH2-Zytokin Dominanz, genauso wie bei einigen Tumorpatienten, und bei fortgeschrittenen HIV-Infektionen. In diese Richtung zum „Vorteil“ verändert sich das Profil während der Schwangerschaft und bei der Toleranz nach Organtransplantation. Eine Verlagerung Richtung einer TH1 Antwort wird mit der Entstehung von einigen Autoimmunerkrankungen wie Morbus Crohn in Verbindung gebracht <sup>[14]</sup>. Auch wenn dieses sicherlich nicht alleine eine Erklärung sein kann, so scheint die „Fehlpolarisation“ doch zumindest eine Rolle in der Pathophysiologie zu spielen <sup>[15]</sup>.

### 1.3 Dendritische Zellen im humanen Immunsystem

Vor 35 Jahren wurde die Gruppe der dendritischen Zellen erstmals in Mäusen entdeckt und in Ihrer Funktion beschrieben <sup>[16]</sup>. Ihrem Namen entsprechend haben sie typische Bäumchen-artige Cytoplasma-Ausläufer (lat. *dendriticus* = „verzweigt“), die Paul Langerhans 1868 dazu verleiteten, die von ihm mikroskopisch in der Haut entdeckten Langerhans-Zellen, als Nervenzellen zu interpretieren. Dendritische Zellen sind eine heterogene Gruppe von Zellen, die sich durch ihre einzigartige Funktion der Antigenprozessierung und der Antigenpräsentation auszeichnen und somit die Fähigkeit besitzen eine effektive und spezifische Immunantwort einzuleiten. Sie stammen von CD34<sup>+</sup> Zellen des Knochenmarks ab, unterscheiden sich in ihrer Lokalisation, in ihren Oberflächenmolekülen und in ihren Funktionen. Man findet sie in nahezu allen peripheren Geweben des menschlichen Körpers. Dort degradieren, prozessieren und präsentieren sie mit ihren MHC Klasse I und II Rezeptoren aufgenommene Pathogene bzw. deren Bestandteile. Diese DCs wandern aus dem Gewebe in den nächsten drainierenden Lymphknoten ab und treten dort in den T-Zell-Arealen mit T-Zellen in Kontakt. Dort leiten sie je nach ihrem Aktivierungsgrad eine Immunantwort ein. Diese kann in der Einleitung einer TH1/TH2 Antwort, in der Aktivierung von regulatorischen T-Zellen oder in der Anergie der T-Zelle bestehen, falls die Aktivierung durch das kostimulatorische Molekül unterbleibt <sup>[17]</sup>.

Auch von Seiten der T-Helferzellen im aktiven Zentrum des Lymphknotens findet eine Rückkopplung statt. Mittels CD40-Ligation zwischen der unreifen T-Zelle und der DC erhalten DCs ein Stimulationssignal und können weitere Signale an das

Immunsystem mittels Zytokinen/Chemokinen weitergeben. Treffen unreife DCs auf Reste von physiologisch zugrunde gegangenen Zellen, einem Prozess bei dem keine Entzündung stattfindet, bleiben diese DCs in ihrem unreifen Zustand und exprimieren fast keine kostimulatorischen Moleküle. Kommen diese dann in Kontakt mit autoreaktiven T-Zellen, treten diese aufgrund der fehlenden Kostimulation in ein Anergie-Stadium ein. Somit spielen DCs eine wichtige Rolle in der Ausbildung einer „peripheren Toleranzentwicklung“ im humanen Immunsystem.

Dendritische Zellen sind aber nicht nur in der Lage eine adaptive Immunantwort zu initiieren, sondern können durch die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen weitere Immunzellen zum Ort der Infektion beordern und Effektorzellen der angeborenen Immunität aktivieren <sup>[18]</sup>.

Durch ihre kostimulatorischen Fähigkeiten, mit denen die DCs über das Ausmaß und die Richtung der T-Zell-Aktivierung entscheiden, nehmen sie eine Art Kontrollinstanz des Immunsystems ein und sind so in den letzten Jahren zu einem wichtigen Ansatz in der Untersuchung des adaptiven Immunsystems geworden.

### 1.3.1 Die plasmazytoide dendritische Zelle

Schon 1958 wurde diese Zelle histologisch von Lennert beschrieben, aber damals als T-Zell-assoziierte Plasmazelle bezeichnet. Er fand diesen Zelltyp bei der Untersuchung des menschlichen Lymphknotens. Genauere Untersuchungen dieses Zelltyps ergaben, dass dieser auch myeloide Oberflächenmoleküle wie CD31, CD36, CD68 und die IL3-Rezeptor- $\alpha$ -Kette exprimiert, welches ihm dann zunächst den Namen „plasmazytoider Monozyt“ einbrachte <sup>[19]</sup>. 1994 gelang es der Arbeitsgruppe um Steinman, die auch 1973 erstmals die dendritischen Zellen beschrieben, zwei unterschiedliche Subpopulationen von CD4<sup>+</sup> dendritischen Zellen im peripheren Blut zu unterscheiden. Die Gruppe der CD11c<sup>+</sup> und der CD11c<sup>-</sup> Zellen <sup>[20]</sup>. Weitere Untersuchungen zeigten dann, dass die von O'Doherty beschriebene CD11c<sup>-</sup> Subpopulation mit dem von Facchetti benannten Zelltyp des „plasmazytoiden Monozyten“ übereinstimmte. Daraus entstand der auch noch heute bestehende Begriff der plasmazytoiden dendritischen Zelle (pDC) <sup>[21]</sup>.

Ganz unabhängig davon begann man Anfang der 80er Jahre nach dem Ursprung der antiviralen Zytokine Interferon (IFN)- $\alpha$  und Interferon- $\beta$  zu suchen. Es fand sich eine kleine Population an Zellen im peripheren Blut als Hauptproduzent dieser Gruppe

von Zellmediatoren [22-23]. Im Laufe der Jahre wurden diese Zellen weiter spezifiziert und 1999 entdeckten unabhängig voneinander zwei Forschergruppen, dass es sich bei dieser Interferon-produzierenden Zelle um die plasmazytoide dendritische Zelle handelte, die auf die Stimulation mit einem CD40 Liganden oder dem Influenzavirus große Mengen von Typ I IFN produziert [24-25].

pDCs sind immunologisch charakterisiert durch das Vorkommen des (HLA)-DR und einer hohen Expression von CD123 (IL3- $\alpha$  Rezeptor Kette). Sie besitzen keine *Lineage*-spezifischen Marker (CD3, CD19, CD56, CD11c, CD13, und CD33). PDCs exprimieren in ihrer Gesamtheit lymphoide, wie auch myeloide Marker. In vitro können PDCs aus CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen kultiviert werden, doch fehlen ihnen typischen myeloiden Oberflächenmoleküle wie CD11c, CD13 und CD33 [26]. Sie sind aber wiederum positiv für die T-Zellspezifischen Marker CD45RA, CD3 $\epsilon$  und den B-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktor Spi-B, welche die Hypothese ihres lymphoiden Ursprunges unterstützen [27-28]. Bis dato konnte der phylogenetische Ursprung nicht eindeutig geklärt werden. So wird auch diskutiert, ob nicht die Ontogenese der DCs aufgrund ihrer wichtigen Rolle im Immunsystem so flexibel gestaltet ist, dass sie sich aus beiden Richtungen, aus welcher Vorläuferzelle auch immer, entwickeln können [29].

Es gibt zwei pDC-spezifische Oberflächenantigene, das *blood dendritic cell antigen* (BDCA) 2 und 4. Allerdings nimmt die Expression von BDCA-2 mit der Reifung der PDC ab und auch kortikale Thymozyten exprimieren dieses Antigen. BDCA-4 wird auch auf anderen DCs gefunden, die aus Monozyten und aus CD34<sup>+</sup> Stammzellen generiert wurden [30].

Die weitere Analyse der im peripheren Blut vorkommenden plasmazytoiden dendritischen Zelle in Hinsicht auf TLR Rezeptoren zeigte die Expression von TLR7 und TLR9, sowie eine geringe Dichte an TLR1, TLR6 und TLR10 [1].

### 1.3.1.1 Vorkommen und Funktion

Die plasmazytoide dendritische Zelle stellt im humanen Immunsystem rein quantitativ eine verschwindend kleine Zellpopulation des peripheren Blutes dar. Ihr Anteil an den kernhaltigen Zellen des peripheren Blutes wird mit 0,1-0,7% genannt, also eine auf 1000 *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC). pDCs konnten bisher im peripheren Blut [24-25], in den Tonsillen [31] und im Liquor cerebrospinalis [32]

nachgewiesen werden, sowie unter pathologischen Bedingungen auch beim systemischen Lupus erythematoses <sup>[33]</sup>, in der malignen Aszites beim Ovarialkarzinom <sup>[34]</sup>, in der allergischen nasalen Schleimhaut nach Allergenprovokation <sup>[35]</sup> und als den Tumor infiltrierende Zellen beim Kopf-Hals-Karzinom <sup>[36]</sup>. Gehäuft kommen sie in sekundären lymphatischen Organen vor, wo sie in der T-Zell-Region nahe der postkapillären Venolen vorkommen. Seltener werden sie in gesunder Haut und Schleimhaut gefunden <sup>[37]</sup>.

2001 konnte erstmals nachgewiesen werden, dass pDCs nicht nur auf virale Reizung hin, sondern auch auf die Stimulation mit CpG-Oligodesoxynukleotiden (CpG ODN), einer stimulatorischen DNA Sequenz, mit einer hohen Typ I IFN Sekretion reagieren <sup>[38]</sup>. In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Erkennung der immunstimulatorischen DNA Sequenz über den TLR9 Rezeptor der pDC verarbeitet wird <sup>[39-40]</sup>. Dieses ist bei diesem Zelltypus auch den pDCs vorbehalten, denn die CD11<sup>+</sup> myeloiden dendritischen Zellen (mDC) exprimieren im Gegensatz dazu eine Vielzahl an *Toll-like* Rezeptoren, jedoch kein TLR9 <sup>[41-42]</sup>.

Es konnte ebenfalls in vitro beobachtet werden, dass Imidazoquinoline über den *Toll-like* Rezeptor 7 zu einer Aktivierung der pDCs führt <sup>[43]</sup>. Als natürliche Stimuli des TLR7 werden *single stranded* RNA Partikel mehrerer Viren beschrieben unter anderem Hepatitis C <sup>[44]</sup>, das Influenza <sup>[45]</sup>, sowie das Sendai Virus <sup>[46]</sup>.

So ist festzustellen, dass pDCs die einzigen Zellen sind, die auf eine TLR7 oder TLR9 Ligation mit der Ausschüttung von Typ I IFN reagieren, obwohl auch z.B. B-Zellen diese Rezeptoren besitzen und die meisten Zellen, wenn auch wesentlich geringere Mengen, Typ I IFN nach Viruskontakt ausschütten <sup>[47]</sup>. Ergo lassen sich nur die pDCs durch CpG direkt stimulieren, während MDCs auf andere Stimuli reagieren, aber nicht auf CpG ODN <sup>[48]</sup>.

Welche Rolle nimmt also die plasmazytoide dendritische Zelle im humanen Immunsystem ein? Fasst man die bis heute gewonnenen Erkenntnisse zusammen, so ergibt sich das Bild einer modulatorischen Schnittstelle. Sie sind in der Lage durch die Ausschüttung bestimmter Mediatoren eine Vielzahl von anderen immunkompetenten Zellen, wie T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zu aktivieren <sup>[49-50]</sup>. Sie stellen somit eine Verbindung zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem dar.

Die Aktivierung einer naiven pDC durch einen Stimulus führt zu einer vermehrten Expression von kostimulatorischen Molekülen und zur Ausschüttung von Zytokinen.

Die plasmazytoiden dendritischen Zellen zeichnen sich besonders durch ihre Fähigkeit aus große Mengen an Typ I IFN ausschütten zu können, welches eine wichtige Rolle in der Induktion einer TH1 Immunantwort spielt <sup>[51]</sup>. Sie besitzen ebenfalls die Fähigkeit nach Stimulation mit CpG ODN und CD40-Ligand durch Ausschüttung von Interleukin (IL)-12 diese TH1 Antwort noch zu verstärken <sup>[1]</sup>. Des Weiteren werden auch IL-6, Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  und IL-8 von der aktivierten pDC ausgeschüttet.

Genauso wie pDCs eine TH1 Antwort induzieren können, so sind sie aber auch in der Lage unter dem Einfluss von IL-3 und CD40-Ligand in Richtung einer Toleranzinduktion zu wirken. Dies geschieht durch eine Polarisation der Zytokinproduktion, die eine TH2 Antwort einleiten, wie IL-4 und IL-10 <sup>[52]</sup>.

Durch ihre Aktivierung tritt die pDC in einen Reifungsprozess ein, in dessen Verlauf sie die Fähigkeit IFN zu produzieren verliert. Während dieses Prozesses ändert sich aber nicht nur ihre Funktion, sondern auch ihre Morphologie. Die reife pDC ist durch ihre Entwicklung von Ausläufern (Dendriten), sowie erhöhte Expression von MHC-Molekülen, kostimulatorischen Molekülen und des Lymphknoten-Homing-Rezeptors CCR7 gekennzeichnet. Dieser Rezeptor erkennt Chemokine, die nur in der T-Zell-Zone von Lymphknoten produziert werden. Exprimiert wird er auch von den naiven T-Zellen, die daraufhin in die T-Zell-Zone migrieren. Dort treffen diese zwei Zelltypen dann aufeinander <sup>[53]</sup>.

Ob die pDCs nun als professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC) bezeichnet werden können, ist umstritten. Durch den BDCA2 Rezeptor könnten sie in der Lage sein, Antigene aufzunehmen und zu präsentieren <sup>[54]</sup>. Nach einer Infektion mit dem Influenza-Virus sind sie in der Lage Antigene zu präsentieren und Antigen-spezifische zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und TH1-Zellen zu expandieren <sup>[55]</sup>. Im Vergleich zu den klassischen DCs, den mDCs, ist diese Fähigkeit jedoch wesentlich geringer ausgeprägt und so besitzen sie auch im Gegensatz zu diesen nicht die direkte Fähigkeit eine Proliferation von naiven T-Zellen zu induzieren, sondern, wie schon zu Beginn beschrieben, die Fähigkeit Antigen-spezifische T-Zellen in ihrer Differenzierung zu polarisieren und zu expandieren <sup>[56]</sup>.

### 1.3.1.2 Interferon- $\alpha$ (IFN- $\alpha$ )

1957 wurde der Begriff Interferon in Anlehnung an das englische *to interfere* (eingreifen, sich einmischen) von Isaacs und Lindemann durch ihre Erkenntnisse in der Untersuchung von hitzeinaktivierten Influenza-Viren begründet <sup>[57]</sup>. Heute werden drei Typen Interferone unterschieden. IFN- $\alpha$  gehört zusammen mit IFN- $\beta$ , IFN- $\omega$  und IFN- $\tau$  zu den Typ I Interferonen. Interferon Typ II beinhaltet IFN- $\gamma$  und Typ III die Interleukine 28A, 28B und 29, auch als IFN- $\lambda$  1, 2 bzw. 3 bezeichnet <sup>[58]</sup>.

IFN- $\alpha$  ist ein Protein aus 166 Aminosäuren. Es gibt 23 bekannte Varianten, die alle durch unterschiedliche Gene kodiert werden. Es bindet wie alle anderen Typ I Interferon an den Typ I IFN-Rezeptor (IFN-R) der Zielzellen.

Die Aktivierung der Gene zur Kodierung des IFN- $\alpha$  wird durch eine Reihe von Transkriptionsfaktoren reguliert. Neben dem in pDCs konstitutiv aktivierten *nuclear factor-kappa B* (NF- $\kappa$ B), spielt in diesem Signaltransduktionsweg besonders der *interferon regulatory factor 7* (IRF) eine besondere Rolle. Durch einen externen Stimulus wird zusätzlich zu dem konstitutiv gebildeten IRF-7 die de novo Expression durch Aktivierung von NF- $\kappa$ B und der p38 *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinase eingeleitet, welches die Expression von Typ I Interferonen induziert <sup>[59]</sup>. Die so gebildeten Mengen an IFN- $\alpha$  werden sekretiert und binden an den Typ I Interferon Rezeptor. Durch diese Bindung wird der Jak/Stat abhängige Transduktionsweg aktiviert, was zur Bildung des *interferon stimulated gene factor* (ISGF) 3-Komplexes führt. Dieser Komplex wiederum induziert im Nukleus die weitere Bildung von IRF-7. Auf diese Weise wird ein positiver *feedback-loop* induziert, womit eine große Menge an IFN- $\alpha$  produziert werden kann <sup>[60-61]</sup>. Durch den in pDCs bereits konstitutiv exprimierten IRF-7 erklärt sich die Eigenschaft der pDC bereits kurz nach ihrer Aktivierung große Mengen an Typ I Interferonen ausschütten zu können <sup>[59]</sup>.

Auch wenn die meisten anderen Zellen Typ I Interferon als „Gefahrensignal“ bei einer viralen Infektion ausschütten, so zeichnet sich die pDC dadurch aus, dass sie schnell große Mengen ausschütten kann und dass ihre TLR7 und TLR9 Rezeptoren auch auf inaktivierte und nichtinfektiöse virale Nukleinsäuren reagieren. Somit ist eine Infektion der Zelle nicht notwendig. Dieser Mechanismus umgeht somit die Fähigkeit mancher Viren die frühe Interferon Produktion einer infizierten Zelle blockieren zu können <sup>[62-63]</sup>.

Durch die Bindung von sezernierten Typ I Interferonen an den Rezeptor auf der Zelloberfläche werden nicht infizierte Zellen resistent gegen das Virus, in dem sie Enzyme exprimieren, die die virale Replikation hemmen<sup>[64]</sup>. Dazu zählen die dsRNA-aktivierte Serin-Threonin-Proteinkinase, welche die Virusreplikation inhibiert, sowie die 2'-5'-Oligoadenylatzyklase und RNase L, Enzyme die die virale mRNA degradieren<sup>[64]</sup>. Zusätzlich zu den antiviralen Funktionen, vermitteln Typ I Interferone auch eine Reihe regulierender Effekte, wie z.B. Erhöhung der MHC I Expression<sup>[65]</sup>, die Inhibition der IL-12 Expression von mDCs<sup>[66]</sup>, die Erhöhung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen<sup>[50]</sup>, die Induktion einer B-Zell-Antwort einschließlich Proliferation und Immunglobulinklassenwechsel<sup>[67]</sup>, die Verbesserung des Überlebens von T-Zellen<sup>[68]</sup>, sowie die Ausreifung von MDCs<sup>[69]</sup>. Aufgrund dieser Einwirkungen auf viele verschiedene Mechanismen des Immunsystems werden die Typ I Interferone produzierenden Zellen als Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität bezeichnet<sup>[50, 65]</sup>.

### 1.3.1.3 Pathophysiologische Bedeutung

Aufgrund ihrer Funktion als Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität, ihrer Fähigkeit zur schnellen IFN- $\alpha$  Produktion und der Einleitung weiterer Maßnahmen des Immunsystems spielt die plasmazytoide dendritische Zelle auch eine Rolle in der Krankheitsentstehung und –aufrechterhaltung.

So ist ihre Rolle bei viralen Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen und bei Tumorerkrankungen Gegenstand vieler Untersuchungen.

So konnte gezeigt werden, dass auch die pDCs vom HI-Virus infiziert werden. Sie tragen den CD4 Rezeptor, sowie die HIV-Korezeptoren CXCR4 und CCR5<sup>[70]</sup>. Ihre auf die Infektion hin abnehmende Anzahl und der Verlust ihrer Fähigkeit IFN- $\alpha$  zu produzieren korreliert mit einer erhöhten Viruslast und einer Zunahme der opportunistischen Infektionen<sup>[71-72]</sup>. Im Gegenzug wurde bei Langzeitüberlebenden HIV-Patienten eine erhöhte Anzahl an pDCs festgestellt<sup>[71]</sup>.

Auch in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen spielen pDCs eine Rolle. Die Konzentration an IFN- $\alpha$  im Blutplasma von Patienten mit systemischem Lupus erythematoses gleicht der von gesunden Patienten kurz nach einer Virusinfektion<sup>[73]</sup>. Ursächlich hierfür sind die Komplexe aus anti-dsDNA-Antikörpern und DNA im Serum der Erkrankten, die zu einer Aktivierung der Interferon Ausschüttung führen

[74]. Gleichzeitig zeigt sich eine erhöhte Anzahl von aktivierten pDCs in den Hautläsionen der Patienten [33]. Diese Anreicherung in der Haut lässt sich auch bei Psoriasis Patienten beobachten [37].

Da Typ I IFN die Proliferation von bestimmten Tumoren inhibieren, liegt die Vermutung nahe, dass auch hier pDCs eine wichtige Rolle spielen. So können pDCs in der peritumoralen Region von Ovarialkarzinomen nachgewiesen werden, aber anstatt eine effektive Immunantwort auszulösen, geschieht das Gegenteil. Eine spezifische Immunantwort durch eine T-Zell-Aktivierung wird verhindert [34]. Auch bei Kopf-Hals-Tumoren konnte eine Alteration der pDC Funktion beobachtet werden [36].

#### 1.4 CpG Oligodesoxynukleotide

Prof. Dr. Busch aus Bonn war der erste, der 1866 von der Beobachtung berichtete, dass sich die Geschwülste bei Patienten mit Geschwüren der Haut oder malignen Drüsensarkomen des Halses zurückbildeten, wenn der Patient zur gleichen Zeit an dieser Stelle eine infektiöse Entzündung entwickelte (Berliner klinische Wochenschrift, 23.März 1868 S137f). Die gleiche Beobachtung und die Wirkung auf Sarkome machte der New Yorker Chirurg William Coley 1893 und fing daraufhin an einige Patienten mit bakteriellen Lysaten (Streptokokken-Lysate, später „*Coley's toxine*“ genannte) lokal zu behandeln. Er konnte zeigen, dass sich bei einem Teil seiner behandelten Patienten die Tumore vorübergehend zurückbildeten [75]. Damit war der Grundgedanke der Möglichkeit einer Immuntherapie bei malignen Tumorerkrankungen geboren.

Allerdings dauerte es weitere 100 Jahre bis dieser Gedanke wieder aufgegriffen wurde. Das Verständnis des Immunsystems war bis dahin noch zu lückenhaft und auch die standardisierte Herstellung von Lysaten kaum möglich. Zudem rückten andere Therapieoptionen wie die Strahlentherapie, deren Entwicklung etwa zur gleichen Zeit begann, in den Vordergrund.

1976 stellte Morales die intravesikale Applikation von „*Bacille Calmette-Guérin*“, dem attenuierten Lebendimpfstoff gegen Tuberkulose, als Therapiemöglichkeit des Carcinoma in situ der Harnblase vor [76]. 1984 konnte der Wirkmechanismus aufgeklärt werden. Tokunaga et al. fanden heraus, dass die antitumorale Wirkung des Tuberkelbazillen-Lysates durch ihre darin enthaltenen DNA Bestandteile

hervorgerufen wird <sup>[77]</sup>. 1992 konnten dann Yamamoto et al. zeigen, dass die DNA von Bakterien diesen Effekt hervorruft, aber nicht die von Wirbeltieren <sup>[78]</sup>.

Das ließ den Schluss zu, dass sich die DNA von Vertebraten und Bakterien in ihrer Zusammensetzung unterscheidet und lieferte einen Erklärungsansatz wie das Säugetierimmunsystem zwischen eigener und bakterieller DNA unterscheidet. Dieser Unterschied und die immunstimulatorische Wirkung konnte später auf spiegel-symmetrische Nukleotidsequenzen (Palindrome) mit einem zentralen Cytosin-Guanosin-Dinukleotid zurückgeführt werden und durch synthetische ODNs reproduziert werden <sup>[79]</sup>. Die immunstimulatorisch wirksamen Palindromsequenzen besitzen ein zentrales unmethyliertes Cytosin-Guanosin-Dinukleotid (CpG Cytosin-Guanosin-Dinukleotid mit Phosphatbindung), das in einem bestimmten Basenkontext eingebettet ist. Alterationen der flankierenden Basen, die Inversion von CG zu G, oder die Methylierung des Cytosins heben den Effekt auf <sup>[80]</sup>. Diese CpG-Sequenzen treten in bakterieller DNA mit einer Häufigkeit von 1:16, in der DNA der Vertebraten etwa mit 1:60 auf. Zudem sind 80% dieser Motive in der DNA von Vertebraten an der 5'Position methyliert und somit immunologisch inaktiv. Im Gegensatz dazu sind die Cytosine der bakteriellen DNA alle unmethyliert.

Durch kurze synthetische CpG ODNs von ungefähr 8 bis 30 Basen Länge lässt sich die Wirkung von bakterieller DNA imitieren. Um ihren Abbau durch Nukleasen zu verhindern, wurden die CpG-Motive weiter entwickelt und durch ein Phosphothioat-rückgrat stabilisiert. Diese Phosphothioatmodifikation besitzt selbst eine zusätzliche immunstimulatorische Aktivität <sup>[81]</sup>.

#### 1.4.1 Unterschiedliche Klassen von CpG ODN

Neben der Modifizierung des ODN-Gerüsts lassen sich durch die Wahl der flankierenden Basen unterschiedliche Wirkungen erzielen. Ebenso finden sich Unterschiede zwischen den einzelnen Säugetierspezies. So wirkt ein für die Maus wirksam beschriebenes CpG ODN nur schwach immunstimulatorisch auf das humane Immunsystem. Weitere Untersuchungen zeigten, dass sich zwar die Wirkung im murinen und humanen Immunsystem unterschieden, jedoch nicht die durch das CpG ODN induzierte Signaltransduktionkaskade <sup>[82-83]</sup>.

Im humanen Immunsystem konnten drei verschiedenen Klassen (Typ A bis C) von CpG ODN anhand ihrer INF- $\alpha$  Produktion und ihrer Wirkung auf B-Zellen identifiziert werden <sup>[84]</sup>.

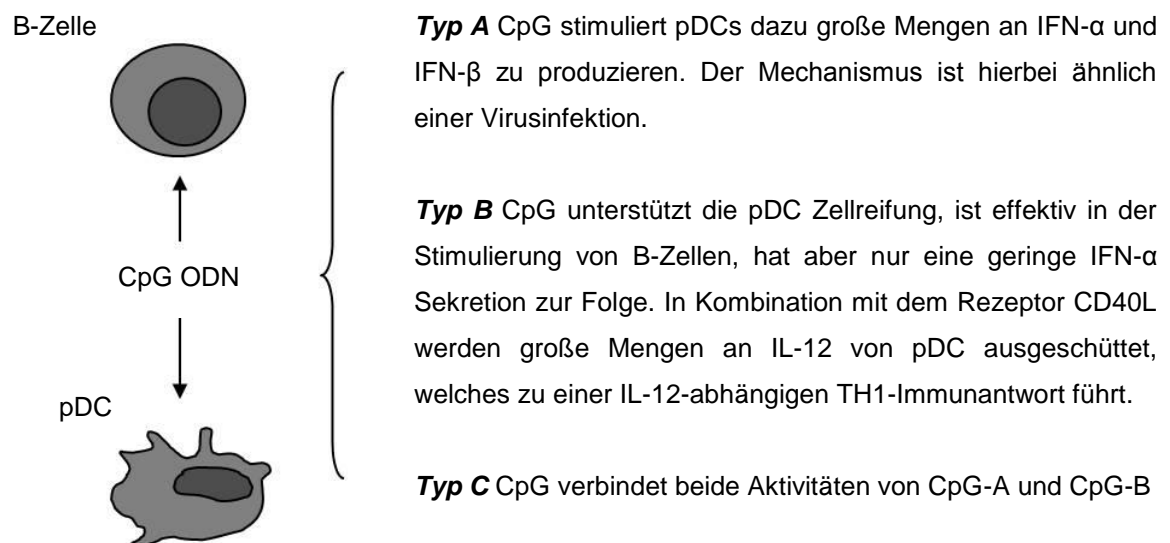
Der Prototyp des Typ A ODN ist das ODN 2216. Die CpG Motive dieser Klassen induzieren sehr hohe Mengen an Typ I Interferon, eine vergleichbar große Menge wie durch Stimulation mit einem Virus <sup>[38]</sup>. Es zeigt kaum eine Wirkung auf isolierte B-Zellen. Seine Struktur zeichnet sich durch Poly-G Motive an beiden Enden, ein Palindrom im Zentrum und Phosphothioatbindungen an beiden Enden, sowie im Zentrum Phosphodiesterbindungen aus. Durch die induzierte Ausschüttung von großen Mengen an Interferon bewirkt Typ A CpG folglich unter anderem eine Antigenunabhängige Aktivierung von CD8<sup>+</sup> *Memory*-T-Zellen, eine TH1 gerichtete Immunantwort und erhöht die lytische Aktivität von NK-Zellen.

Beim Typ B CpG (Prototyp ODN 2006) sind die Phosphodiesterverbindungen komplett durch Phosphothioate ersetzt. Es bewirkt in erster Linie eine Aktivierung von B-Zellen und imitiert die Gegenwart von intrazellulären Bakterien. Die Expression von Antigen-präsentierenden und kostimulatorischen Molekülen wird gesteigert, die Synthese von Immunglobulinen bei Antigenkontakt wird verstärkt und die B-Zelle außerdem zur Sekretion von IL-6 und IL-10 angeregt <sup>[80]</sup>. In pDCs induziert es die phänotypische und funktionelle Ausreifung. Die reifen pDCs exprimieren MHC II, die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40, sowie den Reifemarker CD83 und den Chemokinrezeptor CCR7 <sup>[1]</sup>. Im Gegensatz zu Typ A CpG induziert es nur eine sehr schwache IFN- $\alpha$  Produktion, somit sind dessen sekundäre Effekte auch wesentlich schwächer ausgeprägt <sup>[85]</sup>. Die durch Typ B aktivierten pDCs produzieren inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-6, sowie die Chemokine CXCL8 (IL8), MIP-1 $\alpha$  und  $\beta$ , welche die Rekrutierung von TH1 Effektorzellen hervorrufen und CXCL10 (IP10), welches zur Rekrutierung von CXCR3<sup>+</sup> Zellen führt wie z.B. aktivierte T-Zellen <sup>[38, 82, 86-87]</sup>. In Gegenwart von CD40 Ligand bewirkt es die Ausschüttung von IL12p70, welches das *Priming* naiver T-Zellen zu TH1 Zellen verstärkt <sup>[1]</sup>. Der direkte Kontakt der aktivierten T-Zelle und der B-Zelle bewirkt die verstärkte Produktion Antigen-spezifischer Immunglobuline durch die B-Zelle.

Die dritte CpG Klasse, das Typ C CpG ODN vereint die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Typ A und B CpG ODNs. Es induziert eine IFN- $\alpha$  Produktion der PDCs wie ein Typ A CpG ODN. Im Gegensatz dazu besitzt das Typ C aber kein chimärisches Phosphodiester-Phosphothioat-Rückgrat oder Poly-G Enden.

Solch ein Phosphothioate CpG ODN mit einer Palindrom Sequenz am 5' oder 3' Ende induziert sehr effizient die Effekte, die für die beiden anderen Typen beschrieben sind. Unter anderem auch die B-Zell Stimulation. Das Typ C CpG ODN verstärkt ebenfalls deren Expression von kostimulatorischen Molekülen, sorgt für eine IL-6 und IL-10 Sekretion und Proliferation der B-Zellen <sup>[84, 88]</sup>.

Die wesentlichen Charakteristika der drei CpG ODN Typen zeigt Abbildung 1.



**Abbildung 1: Die drei definierten Klassen der CpG ODN Motive**

#### 1.4.2 Erkennung von CpG ODN durch TLR9

Trotz der Erkenntnisse über die obligaten Bestandteile und den Aufbau der immunstimulatorischen CpG ODN war lange unklar über welchen Erkennungsmechanismus dieser Effekt vermittelt wird.

Untersuchungen zeigten, dass das CpG nur nach intrazellulärer Aufnahme in endosomale Kompartimente und Ansäuerung seine Wirkung entfalten kann <sup>[89]</sup>. Die Untersuchung der durch CpG ODN ausgelösten Signaltransduktionskaskade zeigte unter anderem eine Beteiligung des *myeloid differentiation factor* (MyD) 88 und des *TNF-Rezeptor assoziierten Faktors* (TRAF) 6, so dass ein Rezeptor aus der *Toll-like* Rezeptor Familie als CpG Rezeptor immer wahrscheinlicher wurde <sup>[90]</sup>. Durch die

Untersuchung mit verschiedenen TLR knock out Mäusen gelang es schließlich den Toll-like Rezeptor 9 für die Erkennung und Weiterverarbeitung von CpG Motiven zu identifizieren<sup>[39]</sup>. Bauer et al. konnten diese Beobachtung in Mäusen auch für das humane Immunsystem bestätigen. Sie konnten zudem zeigen, dass es auch möglich ist eine CpG-Antwort in TLR9 transfizierten Zellen auszulösen<sup>[40]</sup>.

Bisher ist TLR9 der einzige bekannte Rezeptor für die CpG ODNs. Da sich aber die Wirkungsweisen der verschiedenen CpG Klassen unterscheiden, liegt die Vermutung nahe, dass noch weitere Korezeptoren oder ähnliches bei der Erkennung eine Rolle spielen. Denn wie die pDC das CpG ODN aufnimmt, unterscheidet sich. Die Aktivierung des TLR9 durch multimerische Typ A CpG ODN passiert in Transferrinrezeptor positiven Endosomen, die Aktivierung mit Typ B CpG ODN in Lysosome-assoziierten Membranprotein-1 positiven Endosomen<sup>[91]</sup>.

#### 1.4.3 Wirkungsweise von CpG ODN auf das Immunsystem

Die meisten Zellen des humanen Immunsystems nehmen CpG ODNs endozytotisch auf, wenn sie darauf treffen, aber nur wenige können spezifisch auf diesen Stimulus reagieren. Verantwortlich für die Fähigkeit zur Erkennung der CpG Motive als molekulares Gefahrensignal von Viren oder Bakterien ist der *Toll-like* Rezeptor 9. Dieser wird nur von pDCs und B-Zellen exprimiert, somit werden auch nur diese zwei Zelltypen direkt durch CpG ODN aktiviert. Die Effekte auf andere Zellen des Immunsystems wie NK-Zellen und T-Zellen sind daher indirekt. Sie werden über ausgeschüttete Zytokine und Zell-Zell-Kontakte vermittelt.

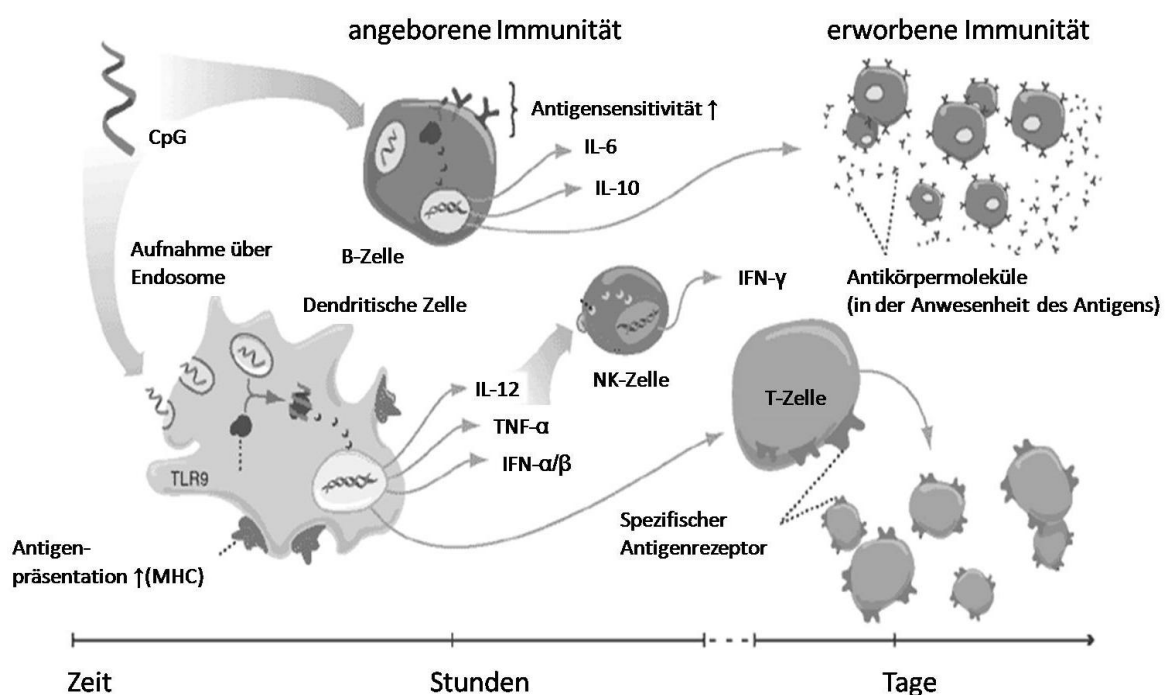
Die Wirkung auf das Immunsystem kann in zwei Stufen eingeteilt werden: 1. eine Aktivierung des angeborenen, unspezifischen Immunsystems und 2. die Verstärkung der spezifischen, erworbenen Immunabwehr.

In der ersten Phase reagieren die pDCs und die B-Zellen indem kostimulatorische Moleküle exprimiert werden und Chemokine, wie IL-12 und IFN- $\gamma$  ausgeschüttet werden, die eine TH1 Antwort bedingen<sup>[85, 92]</sup>. Die pDCs schütten eine große Menge an INF- $\alpha$  aus und treten in einen Reifungsprozess ein. Innerhalb der nächsten Stunden kommt es zu den sekundären Effekten, der Aktivierung der NK-Zellen, Induktion von zytotoxischen T-Zellen etc.

Im zweiten Schritt kommt es dann zu einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems, welche vor allem in der Stimulation von B-Zellen besteht. Wenn

diese mit CpG stimuliert werden, werden sie gegenüber einer Stimulierung über den B-Zell-Rezeptor sensibler. Dadurch wird die spezifische Antikörperproduktion von B-Zellen durch CpG und dem Antigen synergistisch stimuliert <sup>[3, 93]</sup>. Außerdem wird ein Immunglobulin-Klassenwechsel induziert, hin zu Subtypen die besonders wirksam in der Abwehr von infizierten Zellen sind <sup>[67]</sup>.

Durch das multimodale Eingreifen von CpG ODN kommt es zu einer zielgerichteten Antwort, die beide Achsen des Immunsystems umfasst. Es bietet die Möglichkeit eine Infektion nachzuahmen, ohne wirklichen Krankheitserreger und dadurch das gesamte Immunsystem natürlich zu stimulieren [Abbildung 2]. Dieses macht sie interessant in der Entwicklung neuer und effektiver Immuntherapien.



**Abbildung 2 <sup>[94]</sup>: Wirkung von CpG auf das Immunsystem.**

DNA, die ein oder mehrere CpG Motive enthält, wird per Endozytose von den meisten Zelltypen aufgenommen, hat aber nur eine direkte aktivierende Wirkung auf Zellen, die den TLR9 Rezeptor exprimieren (im Menschen B-Zellen und plasmazytoide DCs). Diese Zellen erschaffen dann ein TH1-Zytokinmilieu durch die Ausschüttung von IFN-α, IFN-β, IL-12, IP-10 und anderen TH1-Antwortfördernden Zytokine und Chemokine. NK Zellen werden sekundär aktiviert, produzieren IFN-γ und verstärken ihre lytische Aktivität. Zusätzlich werden die B-Zellen sensibler gegenüber der Aktivierung des eigenen B-Zell-Rezeptors und B-Zellen wie auch pDCs erhöhen die Expression an kostimulatorischen Molekülen, welches ihre Fähigkeit eine T-Zell Antwort zu aktivieren verbessert.

## 1.5 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches

Tumore des Kopf-Hals-Bereiches sind Tumore des oberen Aerodigestivtraktes und umfassen maligne Tumore des Mund- und Rachenraums, der Nase und der Nasennebenhöhle, sowie des Kehlkopfes. Sie stehen mit einer Prävalenz von 6% an sechster Stelle in der Gruppe der Neoplasien weltweit. Beim Mann stehen diese Karzinome mit 7,9% an 4. Stelle der Tumorstatistik, gleichauf mit Blasenkrebs nach Prostata-, Lungen- und Darmkrebs. Bei der Frau mit 3,9% an 9.Stelle <sup>[95-96]</sup>. Weltweit wurden 2002 etwa 500.000 Neuerkrankungen diagnostiziert <sup>[97]</sup>. Die Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches rangieren, mit einer Inzidenz von 13.500 Neuerkrankungen, in der Bundesrepublik Deutschland derzeit in der Tumorstatistik auf Platz 7 <sup>[98]</sup>. Wobei die Zahl sich 1973-1992 in den alten Bundesländern mehr als verdoppelt hat <sup>[99]</sup>. In den USA gab es 40.490 Neuerkrankungen im Jahr 2006, 11.170 Patienten verstarben daran <sup>[100]</sup>.

Etwa 95% dieser malignen Tumore sind Plattenepithelkarzinome, sogenannte *head and neck squamous cell carcinoma* (HNSCC). Der Rest verteilt sich auf Adenokarzinome, adenoidzystische Karzinome, Non-Hodgkin-Lymphome, Melanome und Sarkome <sup>[101]</sup>.

Die Inzidenzrate und Lokalisation variieren in Abhängigkeit von der geographischen Region und der Verteilung der bekannten Risikofaktoren wie Rauchen und hochprozentigem Alkohol. Betelnuss- und Tabakkauen, sowie der Genuss stark gewürzter Speisen gelten als verantwortlich für die hohe Inzidenz der Mundhöhlenkarzinome in Südostasien. Das Erkrankungsrisiko sinkt wiederum mit hohem Früchte- und Gemüseanteil an der Ernährung <sup>[102-103]</sup>. Ebenso werden virale Infektionen z.B. mit dem humanen Papillomavirus oder dem Epstein-Barr-Virus als Ursache beschrieben <sup>[104-105]</sup>. Auch findet sich eine Korrelation verschiedener Genmutationen mit der Entstehung der Karzinome, z.B. eine p53-Genmutation <sup>[104, 106]</sup>. Berufliche Exposition kann zur Entstehung beitragen. Folgende Schadstoffe werden als Risikofaktoren eingestuft: Asbest (anerkannte Berufskrankheit Nr. 4104), Teerinhaltsstoffe, Zement, ionisierende Strahlung, Senfgas, Chrom, Nickel.

In Nord-Amerika und Europa sind Tumore des Mundes, des Oropharynx und des Larynx häufig. Die Lokalisation im Bereich des Nasopharynx ist häufiger in den mediterranen Ländern und in Fernost. In Südost-China und Taiwan sind Kopf-Halskarzinome, im speziellen des Nasopharynx, die häufigste Todesursache junger Männer <sup>[107]</sup>. Nach einer Untersuchung gelten orale und oropharyngeale Karzinome

als die am ehesten zu verhindernde Krebsentität, da sie zu 80% in Verbindung zu hartem Alkohol und Tabak steht <sup>[108]</sup>.

Die Plattenepithelkarzinome entwickeln sich häufig aus präkanzerösen Schleimhautveränderungen, die als Leukoplakien, Erythroplakien oder Pachydermien auffallen.

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose weisen mehr als  $\frac{2}{3}$  der Patienten mit HNSCC die fortgeschrittenen Tumorstadien III und IV auf <sup>[109]</sup>.

Trotz moderner chirurgischer Verfahren, der Einführung neuer Bestrahlungstechniken und des Einsatzes adjuvanter Chemotherapeutika blieb die 5-Jahresüberlebensrate in den letzten 30 Jahren nahezu unverändert niedrig <sup>[110]</sup>.

### 1.5.1 Immuneescape

Als *Immuneescape* bezeichnet man die Fähigkeit maligner Tumore trotz ihrer phänotypischen Unterscheidung vom gesunden Körpergewebe sich der Detektion und Reaktion des Immunsystems zu entziehen. Denn obwohl HNSCC von Immunzellen infiltriert werden, zeigen die Patienten eine geminderte Immunantwort.

Die Mechanismen mit denen es der Tumor schafft dem Immunsystem auszuweichen, können das Ergebnis mehrerer Veränderungen sein. Viele Tumore zeigen eine verminderte Synthese der MHC I Moleküle, des  $\beta_2$ -Mikroglobulin oder anderer Komponenten des antigenprozessierenden Systems, inklusive bestimmter Transporterproteine und Untereinheiten des Proteasoms. Es gibt Tumore, besonders die schnell wachsenden und mit hohem Metastasierungspotential, die keine Antigene mehr präsentieren bzw. Antigene präsentieren, die eine immunologische Toleranz induzieren oder durch eine vermehrte Expression von Glykokalyx Molekülen ihre Antigene darunter „verstecken“. Auch lösliche Faktoren die vom Tumor sezerniert werden tragen dazu bei <sup>[111]</sup>.

Mechanismen des *Immuneescape* sind auch für HNSCC beschrieben worden.

Es zeigen sich Fehler in der zellvermittelten Immunität und Anergy, die mit Progress der Krankheit korrelieren. T-Zell Lymphozytopenie und Dysfunktion, monozytäre Dysfunktion und Zell suppressierende Faktoren tragen dazu bei <sup>[112]</sup>.

Das Fehlen des B7-Proteins oder der Antigenpräsentation durch MHC II hat sich in in vitro Untersuchungen mit HNSCC Zellen dafür verantwortlich gezeigt, dass keine T-Zell Proliferation induziert wird. Im Gegenzug war es möglich diese Reaktion durch Transfektion des B7.1 Gens in die HNSCC Zellen wiederzuerlangen <sup>[113]</sup>. 24% der

HNO Tumore zeigen zudem einen völligen Verlust von MHC Klasse I Molekülen, was die spezifische Reaktion des Immunsystems unmöglich macht <sup>[114]</sup>. Denn die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Tumorzellen wie Spectrin, Integrin und anderen Oberflächenmolekülen wie der MHC sind notwendig um eine erste, unspezifische und temporäre Bindung zwischen der Tumorzelle und der T-Zelle zu ermöglichen. Ohne diese ist eine Reaktion nicht möglich.

Die funktionelle Aktivität von Lymphozyten, in den bei Operationen gewonnenen Lymphknoten von HNSCC Patienten, wurde untersucht. Dabei zeigte sich bei Lymphozyten aus Lymphknoten nahe dem Primärtumor eine signifikante Abnahme der IL-2 induzierten Zytotoxizität im Vergleich zu weiter entfernten. Durch weitere in vitro Experimente konnte angenommen werden, dass durch die Lymphknoten gebildete lösliche Faktoren dafür verantwortlich sind <sup>[115]</sup>.

CD1d-reaktive natürliche Killer-T-Zellen mit einer unveränderlichen T-Zell Rezeptor  $V\alpha 14$  Neuordnung (iNKT) sind eine spezielle Subpopulation von Lymphozyten. Auch hier findet eine Fehlregulation statt. Eine reduzierte Anzahl an zirkulierenden iNKT in HNSCC Patienten korreliert mit einer schlechten klinischen Prognose <sup>[116]</sup>.

Dafür findet sich eine erhöhte Anzahl an  $CD34^+$  Stammzellen im peripheren Blut der Patienten, die über das von HNSCC produzierte *granulocyte-monocyte colony-stimulating factor* (GM-CSF) in verstärktem Maße aus dem Knochenmark mobilisiert werden. Diese tragen zu der reduzierten funktionellen Kompetenz der T-Lymphozyten im peripheren Blut bei, denn die proliferationsfördernde Wirkung von IL-2 auf die T-Zellen der Patienten konnte nach Entfernung der  $CD34^+$  Zellen wieder greifen <sup>[117-118]</sup>. Zudem werden diese  $CD34^+$  Stammzellen durch HNSCC produziertes VEGF chemotaktisch angelockt und im Tumor zu endothelialen Zellen ( $CD31^+/CD144^+$ ) für eine verstärkte Gefäßneubildung differenziert <sup>[119-120]</sup>.

Der negativ regulierende Einfluss der  $CD34^+$  Zellen wirkt sich wahrscheinlich über den *transforming growth factor* (TGF)- $\beta$  auf die Quantität der  $CD8^+$  Zellen, sowie über die funktionelle Beeinflussung der  $CD4^+$ -T-Zellen aus <sup>[121-122]</sup>.

Dieser Faktor spielt auch eine Rolle in der durch den Tumor induzierten Suppression des Immunsystems durch regulatorische T-Zellen. Die Überexpression der Cyclooxygenase 2 (COX-2) und die Produktion von Prostaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ ) der HNSCC Zellen induzieren Type 1 regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) ( $CD4^+$ ,  $CD25^{high}$ ,  $Foxp3^+$ ). Die negativ regulierende Wirkung dieser  $T_{reg}$  in der Tumorumgebung ist bedingt durch ihre Sekretion von IL-10 und TGF- $\beta$  <sup>[123]</sup>.

Auch pDCs die den Tumor infiltrieren leiten keine TH1 Antwort ein und somit keine effektive antitumorale Immunabwehr, sondern in Abwesenheit eines mikrobiellen Stimulus - durch den CD40 Ligand und ihre intrinsische Fähigkeit ICOS-L während der Differenzierung hochzuregulieren - CD8<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen [49, 124]. Diese sind anergisch und nicht-zytotoxisch, aber in der Lage eine primäre T-Zell Antwort durch IL-10 Sekretion zu inhibieren. Die durch den CD40 Ligand gereiften plasmazytoiden DCs bahnen eine TH2 Antwort, eine Toleranzinduktion [34, 52].

DCs im Tumormilieu zeigten nicht mehr detektierbare Level an kostimulatorischen Molekülen, vereinbar mit dem Phänotyp einer naiven, nicht aktivierten DC. Die Zellen von HNSCC Patienten zeigten eine substantiell niedrige Expression von MHC Klasse II, bei Mäusen zeigte sich auch eine niedrige Expression von B7-2 und bestimmten Adhäsionsmolekülen [125]. Dies korreliert mit ihrer Unfähigkeit eine allogene und antigenspezifische T-Zell Antwort zu polarisieren [126].

Auch HNSCC Zellen exprimieren den CD40 Rezeptor und aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen den dazugehörigen Liganden, den „CD40 Ligand“. Die Ligation inhibiert die spontane und Fas-induzierte Apoptose der HNSCC Zellen. Gleichzeitig steigert es die Sekretion von IL-8, VEGF und PGE<sub>2</sub>. Die Kostimulation mit *epidermal growth factor* Rekombinant (EGFr) steigert zusätzlich die Sekretion von IL-8, VEGF und PGE<sub>2</sub> [127].

#### 1.5.1.1 Lösliche Faktoren im Mikromilieu

Viele der oben genannten Mechanismen werden durch lösliche Faktoren vermittelt. Diese Faktoren im sogenannten Mikromilieu des Tumors werden direkt durch den Tumor sezerniert oder indirekt durch die Beeinflussung von Immunzellen.

Die Zytokine die im Tumormilieu von HNSCC identifiziert wurden sind unter anderem IL-1 $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), PGE<sub>2</sub>, sowie der *basic fibroblast growth factor* (bFGF) [128-129].

Die Heranreifung der für die Vermittlung der Immunantwort nötigen DCs aus Progenitorzellen wird durch den Tumor mittels der Ausschüttung von VEGF und auch GM-CSF verhindert [130]. Stattdessen werden diese CD34<sup>+</sup> Stammzellen, wie oben beschrieben, durch VEGF chemotaktisch angezogen und unter anderem im Tumor zu endothelialen Zellen (CD31<sup>+</sup>/CD144<sup>+</sup>) für eine verstärkte Gefäßneubildung differenziert [119-120]. Ein erhöhter Plasmalevel an VEGF korreliert mit einer schlechteren Prognose der Patienten [131].

Der bFGF gehört mit VEGF zu den potenten Mediatoren der Neoangiogenese in Tumoren und ist auch in HNSCC Zellen stark exprimiert. Die Exposition der Zellen mit IFN- $\alpha$  reduziert wiederum deren Expression<sup>[132]</sup>.

IL-10 spielt ebenfalls eine Rolle in der fehlerhaften DC Funktion. Es wird hauptsächlich durch die vom Tumor induzierten T<sub>reg</sub> sezerniert. IL-10 hemmt die Differenzierung von Monozyten zu DCs und somit die Generierung von antigenpräsentierenden Zellen<sup>[133]</sup>. Es verhindert außerdem eine primäre T-Zell Antwort, da es unter anderem die dafür nötige Expression von MHC II und kostimulatorischen Molekülen hemmt. Zusätzlich wird die IL-12 Produktion von aktivierten Makrophagen und DCs inhibiert, sowie die IFN- $\gamma$  Produktion<sup>[111]</sup>. DCs induzieren wiederum nach IL-10 Kontakt eine Toleranz und regulatorische T-Zellen<sup>[134]</sup>. HNSCC Tumore selbst scheinen keine autonome IL-10 Produktion zu betreiben<sup>[135]</sup>.

IL-4 gehört wie IL-10 zur Gruppe der immunsupprimierenden Zytokine und spielt ebenso eine Rolle bei der Herabregulierung der zellvermittelten und der TH1 gewichteten Immunantwort, indem es die Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu TH2 Zellen stimuliert und die Wirkung des Makrophagen-aktivierenden IFN- $\gamma$  antagonisiert. Außerdem besteht die biologische Aktivität in der Initiierung einer IgE Sekretion von B-Zellen<sup>[111, 136]</sup>.

IL-8 ist der dritte Trigger der Neoangiogenese in HNSCC Tumoren und gehört zusammen mit IL-1, IL-6 und GM-CSF zu den proinflammatorischen und proangiogenese Zytokinen<sup>[129]</sup>. IL-8 fördert außerdem die Proliferation und Chemotaxis von Granulozyten und in vitro konnte sogar die direkte Proliferationsstimulation auf HNSCC Zelllinien gezeigt werden. Den gleichen Effekt auf das Wachstum von HNSCC Zelllinien hat auch IL-6<sup>[137]</sup>. Außerdem reduziert es die Expression des CD80 auf HNSCC Zellen und trägt somit zu einer beeinträchtigten T-Zell Aktivierung bei<sup>[138]</sup>. Ein dauerhaft hoher IL-6 Plasmaspiegel kann zu Immundefizienz und Kachexie, sowie Hyperkalziämie führen, alles auch Symptome HNSCC Erkrankter<sup>[139]</sup>. Es wirkt auf das Immunsystem, indem es die B-Zell Differenzierung und IgG Sekretion induziert, sowie die Differenzierung von neutrophilen Granulozyten stimuliert. Außerdem wirkt es als ein potentes endogenes Pyogen und induziert die Expression von akut-Phase Protein-Genen, wie z.B. des C-reaktiven Proteins<sup>[111]</sup>. IL-6 verhindert durch die Aktivierung des *signal transducer*

*and activator of transcription 3* (STAT3) Apoptose Prozesse in Zellen in einer Entzündungsreaktion, auch in Tumorzellen <sup>[140]</sup>.

Diese proinflammatorischen Zytokine führen zu einer Entzündungsreaktion in der Umgebung des Tumors und dazu, dass die umliegenden Zellen zusätzlich für ihn wichtige Wachstumsfaktoren und Zellmediatoren wie z.B. das PGE<sub>2</sub> produzieren, welches unter anderem die Bildung von T<sub>reg</sub> induziert <sup>[141-142]</sup>.

IL-1 $\alpha$  gehört auch zu den Zytokinen, die von HNSCC Zellen sezerniert werden und ist ein autokriner Faktor, der die Aktivierung proliferationsfördernder Transkriptionsfaktoren und Zielgene im Tumor stimuliert und zwar via intrazellulärer oder membrangebundener IL-1 Rezeptoren, die relativ unzugänglich sind für antagonistische Antikörper <sup>[143]</sup>. Es besitzt eine hohe Wirkungskraft in der Induktion von IL-8 und GM-CSF in HNSCC <sup>[144]</sup>.

Die Phospholipid-Metaboliten PGE<sub>2</sub>, Leukotrien B4 (LTB<sub>4</sub>), und *platelet activating factor* (PAF) sind Entzündungsmediatoren und finden sich im Mikromilieu von HNSCC. PGE<sub>2</sub> und LTB<sub>4</sub> werden von in vitro Tumorzellkulturen und HNSCC Zelllinien produziert; PAF fand sich nicht in den in vitro Kulturen. Es wird angenommen, dass es reaktiv von den Immunzellen produziert wird. Durch IL-1 lässt sich die PGE<sub>2</sub> Sekretion des Tumors steigern <sup>[145]</sup>. Das PGE<sub>2</sub> induziert Type 1 regulatorische T-Zellen <sup>[123]</sup>.

Die immunregulierende Wirkung des TGF- $\beta$  im Tumormilieu setzt sich aus seiner Inhibierung der Proliferation und Differenzierung von T-Zellen und seiner Wirkung auf neutrophile Granulozyten, Endothelzellen und Mastzellen zusammen. Es verhindert eine Immun- und Entzündungsreaktion dieser Zellen und wurde als Tumorprodukt entdeckt <sup>[111]</sup>.

Ein weiterer Faktor in HNSCC Tumoren sind die *p15E-low molecular weight factors* (LMWF) (<25kD) benannt nach der Ähnlichkeit des Antigens zu dem immunsuppressiven retroviralen transmembranösen Hüllenprotein p15E. Dieser Faktor inhibiert die chemotaktisch N-formyl-methionyl-Leuzyphenylalanin induzierte Polarisation von Monozyten <sup>[146]</sup>. Die operative Entfernung des HNSCC Tumors führt zur Wiedererlangung der defizienten Monozyten Polarisation <sup>[147]</sup>.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Begasungsbrutschrank	FA. BINDER
Bench	Fa. W. Pabisch
BioPlex <sup>®</sup> -Array-Reader	FA. BIO-RAD
Biophotometer	FA. EPPENDORF
Blot Papier	FA. BIO-RAD
Eismaschine	FA. SCOTSMAN
Geldokumentationsgerät	FA. BIO-RAD
Heizblock (neoBlock 12-2503)	FA. NEOLAB
Inkubatorschüttler	FA. EDMUND BÜHLER GMBH
Kryoröhrchen	FA. SARSTEDT
MACS LS Columns	FA. MILTENYI BIOTEC
Microfuge <sup>®</sup> 18	FA. BECKMANN COULTER <sup>TM</sup>
Microplate Spectrometer, Benchmark Plus	FA. BIO-RAD
Mikroskop (Wilovert S)	FA. WILL
Nitrocellulosemembran	FA. BIO-RAD
FACSCanto	FA. BD
Power Pac HC <sup>TM</sup>	FA. BIO-RAD
Rüttler (MTS 2/4 digital)	FA. IKA <sup>®</sup>
Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell	FA. BIO-RAD
Trans-Blot Transfer Nitrocellulosepapier	FA. BIORAD
Vortexer	FA. IKA <sup>®</sup>
Waage (SDC 52)	FA. SCALTEC
Wasser-Deionisierungsmaschine	FA. STERLING BERKEFELD
Zellschaber	FA. SARSTEDT
Zentrifuge (Allegra <sup>TM</sup> 25R)	FA. BECKMANN COULTER <sup>TM</sup>

## 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Anodenpuffer Roti-Blot A	FA. ROTH
Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	FA. ROTH
Bovine serum albumin powder (BSA)	FA. SIGMA-ALDRICH
Bromphenolblau	FA. ROTH
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	FA. SIGMA-ALDRICH
Human Cytokine Th1/Th2	FA. BIO-RAD
Lymphocyte Separation Medium	FA. PAA
Milchpulver	FA. BIORAD
Mycoplasma-Off	FA. MINERVA BIOLABS
Ponceau S	FA. ROTH
Qiaquick Gel Extraction Kit	FA. QIAGEN
Reaktionsgefäße	FA. SARSTEDT
Saponin	FA. SIGMA
Schwefelsäure 40%	FA. MERCK
TMB Substrat 1 und 2	FA. BENDER MEDSYSTEMS
Trypanblau-Lösung	FA. SIGMA
Tween 20	FA. BIO-RAD
Kathodenpuffer Roti-Blot K	FA. ROTH

## 2.1.3 Reagenzien

Aminosäuren, nicht essentielle	FA. GIBCO
Aqua Spüllösung	FA. DELTASELECT
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	FA. GIBCO
PBS Dulbecco's Phosphat Puffer	FA. PAA LABORATORIES
Blasticidin Agar, E'coli FastMedia™	FA. INVIVOGEN
Blasticidin TB, E'coli FastMedia™	FA. INVIVOGEN
Foetal Bovine Serum (FCS)	FA. GIBCO
Glycin	FA. CARL ROTH GMBH & CO.
Natriumpyruvat	FA. SIGMA-ALDRICH
Schwefelsäure	FA. CARL ROTH GMBH & CO.
Tris EDTA	FA. FLUKA CHEMIE GMBH

---

Tween 20	FA. BIO-RAD
X-Vivo 15	FA. CAMBREX

#### 2.1.4 Puffer und Zellmedien

MACS-Puffer	PBS 0,5% FCS 2mM EDTA pH 7,2
Wasch-Puffer	PBS 0,5‰ Tween 20
Assay-Puffer	1l PBS 0,5ml Tween 20 5g BSA
TAE 50fach	242g Tris 57,1ml Eisessig 100ml 0,5% EDTA
Zellkulturmedium	500ml DMEM 50ml FCS, hitzeinaktiviert 5ml Natriumpyruvat 5ml nicht essentielle Aminosäuren 500ml X-Vivo
Elektrophoresepuffer 10fach	1% SDS 0,25M Tris 1,92M Glycin
4N Schwefelsäure	62,3ml deionisiertes Wasser 37,7ml Schwefelsäure 40%

---

### 2.1.5 Assays und Module

AP-Conjugate Substrate Kit	FA. BIORAD
BDCA-4 Cell Isolation Kit	FA. MILTENYI BIOTEC
Cytokin Reagent Kit	FA. BIO-RAD
IFN- $\alpha$ ELISA Module Set	FA. BENDER
Human Serum Diluent Kit	FA. BIO-RAD
CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1) MicroBead Kit	FA. MILTENYI BIOTEC
Venor PCR Detection Kit	FA. MINERVA

## 2.1.6 Antikörper

Folgende in den Tabelle 1 undTabelle 2 aufgeführte Antikörper wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

**Tabelle 1: Daten der in dieser Arbeit verwendeten FACS Antikörper**

Name	Isotyp	Fluoreszenz	Konzentration	Herkunft
Anti-BDCA2	mouse IgG1, κ	APC, PE	*	FA. MILTENYI
Anti-CD40	mouse IgG2b, κ	APC	*	FA. BD
Anti-CD80	mouse IgM	FITC	*	FA. BD
Anti-CD86	mouse IgG1, κ	PE	*	FA. BD
Anti-CD123	mouse IgG1, κ	PE	*	FA. BD
Anti-CCR7	mouse IgG2a, κ	PE-Cy7	*	FA. BD
Anti-CXCR3	mouse IgG1, κ	APC	*	FA. BD
Anti-CXCR4	mouse IgG2a, κ	PE-Cy5	*	FA. BD
Anti-HLA-DR	mouse IgG2a, κ	PerCP	*	FA. BD
Anti-Lin-1	Mouse IgG1, κ/IgG2b, κ	FITC	*	FA. BD
Anti-TLR3	mouse IgG1, κ	PE	*	FA. EBIOSCIENCE
Anti-TLR9	mouse IgG1, κ	FITC	*	FA. IMGENEX
Anti-TLR9	rabbit IgG2a, κ	PE	*	FA. EBIOSCIENCE
Goat-anti-rabbit		FITC	*	FA. BD

\* zur Färbung der Zellen mit den Antikörpern wurden 2µl pro Probenröhrchen (nach Abzentrifugation der Zellen und Resuspension in 1% BSA PBS Lösung) verwendet.

**Tabelle 2: Daten der in dieser Arbeit verwendeten Westernblot Antikörper**

Name	Isotyp	kDa	Verdünnung	Herkunft
Anti-TLR1	Rabbit IgG	84	20µl/10ml	FA. IMGENEX
Anti-TLR3	Mouse IgG	97	20µl/10ml	FA. IMGENEX
Anti-TLR7	Rabbit IgG	121	20µl/10ml	FA. IMGENEX
Beta Actin-Loading Control		43	10µl/10ml	FA. ABCAM
Goat anti mouse	Goat IgG		3,5µl/10ml	FA. BIORAD
Goat anti rabbit	Goat IgG		3,5µl/10ml	FA. BIORAD

**Tabelle 3: Daten der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper zur Funktionsanalyse**

Name	Isotyp	Klon	Konzentration	Herkunft
Anti-IL-10R (CD 210)	Mouse igG	#37607	2,5µl/ml	FA.R&D SYSTEMS

### 2.1.7 Oligodesoxynukleotide

Die angegebenen Oligonukleotide waren alle negativ auf Endotoxin getestet. Sie wurden in Konzentrationen von 3µg/ml bzw. 6µg/ml eingesetzt. Die Stocklösungen wurden nach Herstellerangaben in Tris EDTA angesetzt.

Ein Teil der Oligonukleotide, wie angegeben, wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Molekulare Medizin der Universität Lübeck im Rahmen dieser Dissertation in Ihrer Wirkung auf pDCs untersucht.

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Sequenzen der verwendeten CpG-Oligonukleotide:

**Tabelle 4: Daten der in dieser Arbeit verwendeten CpG ODN**

CpG ODN	Länge (nt)	Sequenz 5' → 3'	Herkunft
2006	24	<b>TCG TCG</b> TTT TGT <b>CGT</b> TTT GTC <b>GTT</b>	Fa. InvivoGen
2006 PTO	24	<b>TCG TCG</b> TTT TGT <b>CGT</b> TTT GTC <b>GTT</b> + Phosphothioatmodifikation	Institut für molekulare Medizin*
2216	20	ggG GGA <b>CGA</b> TCG TCG ggg gG	Fa. Metabion, InvivoGen
2216-15g	30	ggG GGA <b>CGA</b> TCG TCG ggg ggg ggg ggg	Fa. Operon
Poly-g30	31	ggg ggg ggg ggg ggg ggg ggg ggg ggg ggg	Fa. Operon
TM6-C <sup>Me</sup> (tetraCH2)	24	TC <sup>Me</sup> G TGT TC <sup>Me</sup> G TGT TC <sup>Me</sup> G TGT TC <sup>Me</sup> G TGT	Institut für molekulare Medizin*
TM6 <sub>4</sub> (tetraHex)	24-mer	<b>TCG</b> TGT <b>TCG</b> TGT <b>TCG</b> TGT <b>TCG</b> TGT	Institut für molekulare Medizin*
S-TM6 <sub>4</sub> (tetraHex PTO)	24-mer	<b>TCG</b> TGT <b>TCG</b> TGT <b>TCG</b> TGT <b>TCG</b> TGT + Phosphothioatmodifikation	Institut für molekulare Medizin*

Kleinbuchstaben: Phosphothioatverbindung; Großbuchstaben: Phosphodiesterverbindung; fett: CpG Dinukleotide

\* Institut für Molekulare Medizin der Universität zu Lübeck

### 2.1.8 Zytokine

rekombinantes humanes IL-6 FA. BIOSOURCE

rekombinantes humanes IL-8 FA. BIOSOURCE

rekombinantes humanes IL-10 FA. BIOSOURCE

Die gelieferten Interleukine wurden nach Herstellerangaben in sterilem H<sub>2</sub>O gelöst, alliquotiert und bei -20°C verwahrt. Die weitere versuchsbezogene Verdünnung erfolgte, wenn nötig mit PBS mit 1%BSA als Trägerprotein.

### 2.1.9 Zelllinien und primäre Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDC) und die *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) wurden aus Spenderblut gesunder Blutspender der Blutspendezentrale der Transfusionsmedizin UKSH Campus Lübeck gewonnen. Die Spender hatten keine Allergien und standen nicht unter Medikation. Für die Verwendung des Spenderbluts lag ein von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck befürworteter Ethikantrag (Aktenzeichen: 06-027) vor.

Die verwendeten HNSCC Zelllinien BHY und PCI13 sind immortalisierte Tumorzellen. PCI13 stammt von einem 50 jährigem Patienten mit einem Tumor im retromolaren Trigonum (T3 N1 M0) und wurde 1989 von Heo et al. etabliert. Diese Zelllinie wurde unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von Dr. T. Whiteside aus Pittsburgh, Pennsylvania, USA zur Verfügung gestellt.

BHY wurde von einem Tumor eines 52 jährigen Japaners mit differenziertem HNSCC des unteren Alveolus 1997 von Kawamata et al. etabliert. Dieser Tumor zeigte im Speziellen ein hoch invasives Wachstum zum Unterkiefer und zur Muskelschicht (DSMZ Germany No. ACC 404).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkulturarbeiten

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Um eine Kontaminierung der Zellkultur mit Bakterien und Pilzen zu verhindern, wurde auf sauberes und steriles Arbeiten geachtet.

Nach UV-Belichtung und 20 minütiger Lüftung der Werkbank wurde die Arbeitsfläche vor Gebrauch mit Mycoplasma-Off<sup>®</sup> gereinigt. Alle verwendeten Materialien wie EPPENDORF-Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden im Dampfsterilisator für 15min bei 121°C autoklaviert. Nicht autoklavierbare Geräte wurden regelmäßig mit 70%igem Ethanol gereinigt. Um Verunreinigungen und ungewollte Vermischungen der Zellen mit anderen zu verhindern, wurde immer nur mit einer Zelllinie unter der Sterilbank gearbeitet.

### 2.2.2 Zellkultur

Die Zellkulturen wurde in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und bei einem CO<sub>2</sub> Anteil von 5% in der Atmosphäre vorgenommen. Die Zellen wurden immer, wenn nicht anders angegeben, in dem unter Punkt 2.1.4 beschriebenen Zellkulturmedium inkubiert.

### 2.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung des Anteils der vitalen, lebenden Zellen wurde der Trypanblau-Ausschlusstest angewendet. Hierbei färben sich tote Zellen im Gegensatz zu vitalen blau, da der zugegebenen Farbstoff auf Grund ihrer nicht mehr intakten Zellmembran in das Zellinnere eindringen kann. Die Zellzahl wurde nach geeigneter Verdünnung der Zellsuspension in der Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ermittelt.

## 2.2.4 Kultivierung von HNSCC Zellen

Die adhärennten HNSCC-Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> unter Verwendung des unter 2.1.4 beschriebenen Zellmediums kultiviert. Für die Subkultivierung wurden die Zelllinien bei einer Konfluenz von 70-80% mit Trypsin-EDTA von den Zellkulturflaschen abgelöst, in DMEM resuspendiert und zum Pelletieren zentrifugiert (200g, 8min, 30°C). Nach dem Resuspendieren des Zellpellets wurde die gewünschte Verdünnung der Zellsuspension in neue Zellkulturflaschen überführt. Die Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen mit dem *Venor PCR Detection Kit* auf Mycoplasmen-Kontaminationen untersucht.

### 2.2.4.1 Inkubation von HNSCC Zellen mit CpG ODN, Interleukinen und IL-10R Antikörper

Für die Testung der Wirkung von Interleukinen, CpG ODN und IL-10R Antikörper auf das Wachstum von HNSCC Zellen wurden diese zu Populationen von 5.000/*Well* (BHY) bzw. 2.500/*well* (PC113) in *flat-bottom* Mikrotiterplatten inkubiert. Je nach zu untersuchendem Zusatz wurde dieser dem Kulturmedium zugesetzt. Die Konzentrationen entsprachen dabei denen der bei den pDCs angewendeten (siehe 2.2.8). Das Wachstumsverhalten wurde anschließend mit dem MTT Test bestimmt (siehe 2.2.12).

### 2.2.4.2 Einfrieren von Zellen und Zellkulturüberstand

Zur Langzeit-Aufbewahrung wurden die Zelllinien im Verhältnis 1:1 mit 2-fach konzentriertem Einfriermedium (20% FCS, 10% DMSO, 70% DMEM) versetzt und in Kryoröhrchen unter Verwendung eines mit Isopropanol gefüllten Einfrierkarussells bei -80°C eingefroren.

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturüberstände wurden nach 24h aus der Zellkulturflasche entnommen, aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

#### 2.2.4.3 Auftauen von eingefrorenen Zellen und Zellkulturüberstand

Die in Kryoröhrchen tiefgefrorenen Zellen wurden zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und um das DMSO auszuwaschen in 10ml vorgewärmtes FCS-haltiges (10%) Nährmedium überführt und abzentrifugiert (300g, 30°C, 8min).

Der Waschvorgang wurde wiederholt und nach Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpräzipitat in ebenfalls vorgewärmtes Kulturmedium aufgenommen und in Kulturflaschen angezüchtet. Nach 24h erfolgte die mikroskopische Begutachtung der Zellen sowie der erste Mediumwechsel.

Die tiefgefrorenen Zellkulturüberstände wurden stets auf Eis aufgetaut und zeitnah verwendet. Einmal aufgetauter Zellkulturüberstand wurde verworfen.

#### 2.2.5 Isolierung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut

Zur Isolation peripherer Blutlymphozyten (PBMC = peripher blood mononuclear cells) wurde frisches Spenderblut von gesunden Blutspendern aus dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Lübeck verwendet. Zur Gewinnung des sogenannten *buffy coat* wurde das Blut per Dichtegradientenzentrifugation über *Lymphocyte Separation Medium* aufgetrennt. Als *buffy coat* bezeichnet man die Leukozytenmanschette, die man beim Abzentrifugieren von Vollblut erhält. Diese besteht aus den plasmafreien zellulären Bestandteilen des Blutes mit einem reduzierten Gehalt an Erythrozyten.

Das Trennmedium besitzt aufgrund seiner spezifischen Dichte von 1,077 g/ml die Eigenschaft, in einer Dichte-Zentrifugation mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten) an der Phasengrenze zwischen Blutserum und Trennmedium anzureichern. Wegen ihrer höheren Dichte sedimentieren Erythrozyten und Granulozyten in bzw. unter der Trennschicht. Thrombozyten hingegen separieren wegen ihrer geringeren Dichte in die Serumschicht oberhalb des Trennmediums und des *buffy coats*.

Zu Beginn der Isolation der PBMCs wurde das Vollblut steril aus den Konservenbeuteln entnommen und mit der doppelten Menge PBS verdünnt. Dann wurde die Blut-PBS-Mischung in einem 50ml Polypropylen-Röhrchen über 20ml Separationsmedium vorsichtig geschichtet. Anschließend wurden diese bei 600g ohne Abbremsen für 30min bei 20°C zentrifugiert und am Ende auf 4°C

heruntergekühlt. Danach wurde die entstandene Interphase vorsichtig mit der Zellkulturpipette aufgenommen und in MACS-Puffer 1:1 verdünnt. Die Zellen wurden insgesamt zwei Mal in MACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation mit 300g, 10min, 4°C), bevor das Pellet zur Lyse von Erythrozyten mit der doppelten Menge Aqua Spüllösung – H<sub>2</sub>O 1min 10sek zügig resuspendiert wurde. Gleich darauf wird der Lyse-Effekt durch Zugabe von MACS-Puffer gestoppt und die Zelllösung erneut zentrifugiert (300g, 10min, 4°C). Die Zellen wurden nochmals gewaschen und durch Filtern mit einem 75µm Filter von Zellklumpen befreit.

#### 2.2.6 Separation plasmazytoider dendritischer Zellen mittels magnetischer Zellsortierung

Zur Isolierung von plasmazytoiden Dendritischen Zellen aus PBMCs wurde das Prinzip des *magnetic activated cell sorting* (MACS) angewendet. Dabei wurden spezifische Antikörper verwendet, die chemisch an ferromagnetische (Eisen-)Mikropartikel (beads) von etwa 50nm Durchmesser gebunden sind. Für die Isolierung wurde mit dem *BDCA-4 Cell Isolation Kit* von Milteny Biotec gearbeitet.

Nach 15 minütiger Inkubation der gewonnen PBMCs mit den *microbeads* und dem dazugehörigen *blocking* Reagenz (je 100µl pro 10<sup>8</sup> Zellen) bei 6-12°C, wurden diese mit MACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und mit 500µl pro 10<sup>8</sup> Zellen resuspendiert. Bevor die Zellsuspension durch die Separationssäulen gegeben wird, werden diese mit MACS-Puffer equilibriert und die Zellsuspension abermals vorher über einen Zellfilter von Zellklumpen befreit. Diese Separationssäulen enthalten eine paramagnetische Matrix und werden in einen starken Permanentmagneten befestigt. Beim Durchfließen der Zellsuspension mit den markierten Zellen werden diese in der Matrix durch die magnetische Wirkung auf das Eisenteilchen festgehalten. Alle „versehentlich“ zurückgebliebenen unmarkierten Zellen, werden durch mehrmaliges Spülen der Säule entfernt.

Um die separierten Zellen aus der Säule zu eluieren wurde diese außerhalb des Magnetfeldes mit 3ml MACS-Puffer bestückt und die Zellen wurden mit Hilfe eines Stempels aus der Säule gedrückt. Durch Wiederholen des Vorgangs mit einer neuen Säule wurde die Reinheit der Zellen optimiert.

### 2.2.7 Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden im Photometer

Die Konzentration der käuflich erworbenen und im Versuch eingesetzten CpG Oligonukleotide wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers überprüft. Dazu wurden die Oligonukleotide mit 10 mM Tris HCl (pH 8) 1:50 verdünnt und im Photometer bei 260nm gemessen. Optimale OD-Werte liegen zwischen 0,1 und 1,0. Aus den gemessenen OD-Werten errechnen sich die zugehörigen Konzentrationen folgendermaßen:

$$\begin{aligned} \text{Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] &= \text{OD}_{260\text{nm}} \cdot \frac{\text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{spez. Absorptionskoeffizient}_{\text{ssDNA}}}{1000} \mu\text{g}/\mu\text{l} \\ &= \text{OD}_{260\text{nm}} \cdot \frac{50 \cdot 33}{1000} \mu\text{g}/\mu\text{l} \end{aligned}$$

### 2.2.8 Kultivierung und Stimulierung plasmazytoider dendritischer Zellen

#### 2.2.8.1 Inkubation von pDCs mit Oligonukleotiden, Interleukinen und dem IL-10 Rezeptorantikörper

Die per magnetischer Sortierung gewonnene pDC Zellsuspension wurde mit frischem DMEM/xVivo Medium (im Verhältnis 1:1) auf die gewünschte Zellkonzentration verdünnt. Inkubationsansätze wurden in einer 96-well Platte durchgeführt. Die Zellzahl pro Well lag bei 50.000 Zellen in Volumina von 100 $\mu$ l, wenn nicht anders angegeben. Die CpG ODN Lösungen und Interleukine wurden standardisiert nach Anleitung der Hersteller verdünnt. Im Fall der CpG ODN wurde je nach Versuchsansatz 3 $\mu$ l/ml (Endkonzentration von etwa 375nM) oder 6 $\mu$ l/ml (etwa 750nM) Oligonukleotid zugegeben. Interleukin-10 wurden in den Konzentrationen 1ng/ml, 10ng/ml und 100ng/ml, IL-6 mit 10pg/ml, 100pg/ml, 1ng/ml und 10ng/ml, sowie IL-8 in den Konzentrationen 10 pg/ml, 100pg/ml, 1ng/ml eingesetzt <sup>[129, 148-150],[135]</sup>. Der IL-10R AK wurde in einer Konzentration von 2,5 $\mu$ g/ml verwendet <sup>[148]</sup>.

Die Zugabe von CpG ODN und der Interleukine erfolgte (wenn nicht anders angegeben) direkt beim Ansetzen des Versuches. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 24h bzw. 48h inkubiert. Bei Versuchen zur

Abhängigkeit der Immunstimulation von der Inkubationszeit wurde die Inkubationszeit variiert. Die Inkubationszeiten sind bei der Beschreibung der jeweiligen Versuche angegeben.

#### 2.2.8.2 Inkubation von pDCs mit HNSCC Zellen/Überstand

Die wie unter Punkt 2.2.4 beschrieben kultivierten HNSCC Zellen wurden bei 70%-80% Konfluenz mit Trypsin-EDTA von den Zellkulturflaschen abgelöst, in DMEM resuspendiert und dann zentrifugiert (200g, 8min, 30°C). Das so gewonnene Zellpellet wurde wiederum resuspendiert, die Zellzahl ermittelt und auf eine für den jeweiligen Versuch praktikable Zellzahl pro  $\mu\text{l}$  verdünnt. Die Koinkubation von HNSCC Zellen und plasmazytoiden Zellen fand, wenn nicht anders angegeben, in dem Verhältnis 1:4 statt.

#### 2.2.9 IFN- $\alpha$ ELISA

Für die Konzentrationsbestimmung von IFN- $\alpha$  im Zellkulturüberstand wurde das *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) Module Set der Firma BENDER verwendet.

Der *Coating*-Antikörper (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS) adhärierte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C in 96 *well flat bottom* Mikrotiterplatten. Zum Blocken unspezifischer Bindungen kam nach dem Waschen der Wells mit Waschpuffer 250 $\mu\text{l}$  Assay Puffer pro *well* zum Einsatz. Der Ansatz wurde für zwei Stunden verschlossen mit Parafilm und Deckel bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert, bevor die Platten zweimal mit dem Waschpuffer erneut gespült wurden.

100 $\mu\text{l}$  des vorbereiteten IFN- $\alpha$  Standard in definierten Konzentrationen von 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 63pg/ml, 32pg/ml, 16pg/ml, 8pg/ml, sowie eine *blank* Probe (Assay Puffer) und 100 $\mu\text{l}$  Assay Puffer plus 20 $\mu\text{l}$  der zu analysierenden Überstände wurden in die entsprechenden Wells gegeben. Dann wurde je 50 $\mu\text{l}$  gebrauchsfertiges Meerrettich-Peroxidase (HRP) Konjugat (HRP Konjugat im Verhältnis 1:1500 mit Assay Puffer) zu jedem Well dazugegeben, die Mikrotiterplatte mit Parafilm vor Verdunstung geschützt und für zwei Stunden bei 100rpm und Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

Tetramethylbenzidin (TMB) Substrat wurde kurz vor Beendigung der Inkubationszeit frisch angesetzt (je ein Teil Substrat 1 und ein Teil Substrat 2) und davon 100µl pro well, nach dreimaligem Waschen mit 250µl/well Waschpuffer, gegeben. Dieser Ansatz wurde für 20min im Dunkeln bei 100rpm und Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

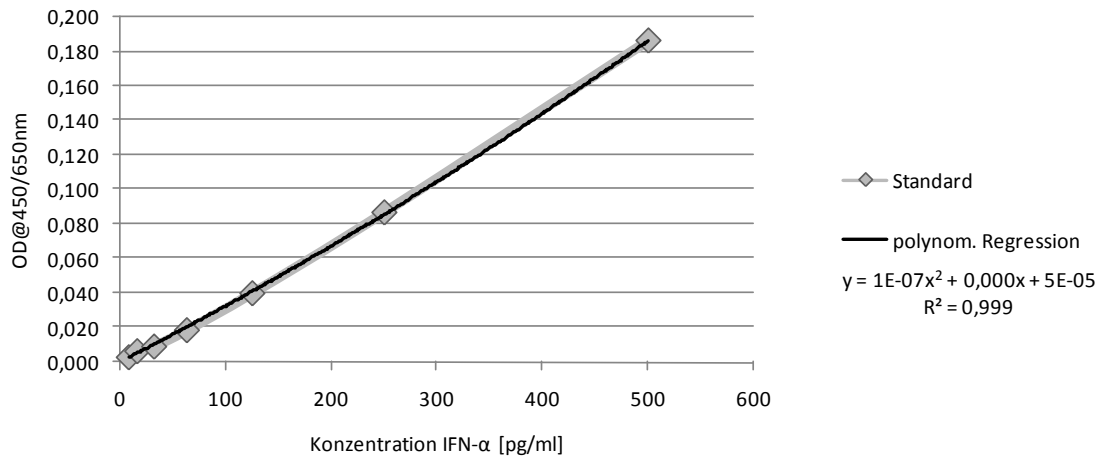
Zum Schluss wurde die Farbreaktion durch Zugabe von jeweils 100µl 4N Schwefelsäure gestoppt, welches einen Farbumschlag von blau in gelb hervorruft. Die Extinktion der gelben Farblösung wurde photometrisch bei 450nm mit einem Referenzfilter von 650nm quantifiziert.

#### 2.2.9.1 Bestimmung der IFN- $\alpha$ Konzentration aus der Extinktion

Um aus der mit dem Photometer gemessenen Extinktion die Konzentration (pg/ml) der zu analysierenden Proben an IFN- $\alpha$  zu bestimmen, wurde mit Hilfe der auf jeder Platte mitgeführten Standardreihe mit verschiedenen genau definierten IFN- $\alpha$  Konzentrationen eine Standardkurve erstellt. Die Messdaten wurden in einem Diagramm gegen die eingesetzte IFN- $\alpha$  Konzentration aufgetragen. Durch die Mitführung eines bezüglich seiner Konzentration bekannten Standards wird die Probenkonzentration anhand der erstellten Standardkurve bestimmt.

Die standardmäßig Verdünnung der Proben von 1:5 wurden dabei berücksichtigt. Im Falle von weiteren Verdünnungen, wurden diese ebenfalls in die Berechnung einbezogen.

Das Detektionslimit lag laut Herstellerangaben bei 3,16pg/ml.



**Abbildung 3: IFN-α ELISA Standardkurve mit polynomischer Regression**

Anhand der Mittelwerte der mitgeführten Standardreihe der durchgeführten IFN-α ELISAs wurde diese Kurve erstellt. Mit Hilfe der Umkehrfunktion der Formel der polynomischen Regression  $x = -1500 + 10 \cdot \sqrt{(22495 + 10^5 \cdot y)}$  wurden die photometrisch gemessenen Extinktionen in µg/ml umgerechnet.

## 2.2.10 Proteinbiochemie

### 2.2.10.1 Proteinisolierung

Die per Lymphorese gewonnenen und mit Tumorüberstand inkubierten plasmazytoiden Zellen wurden aus den *Wells* mit PBS gespült und nach einem Waschschriff mit 1x PBS (140mM NaCl, 10mM Na-Phosphat) RIPA-Puffer (1x PBS, 1% Igepal CA-630, 0,5% Natrium-Deoxycholat, 0,1% SDS) und Proteinase- und Phosphataseinhibitoren (30% Aprotinin, 10% PMSF, 10% Natrium-Orthovanodat, 20% Natriumfluorid, 10% Phosphataseinhibitor-Cocktail) zugegeben, die Zellen von der Zellkulturflasche mit einem Zellschaber abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden 30-60 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 13000g 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 2-4µl Proteinsuspension in Abhängigkeit der zu erwartenden Proteinkonzentration für die Bradford Proteinbestimmung mit dem BIORAD Protein Assay zugegeben. Nach der Zugabe von 2xSDS *Loading-Dye* (0,25 M Tris-HCl, pH6.8, 15% β-Mercaptoethanol, 30% Glycerin, 7% SDS, 0,3% Bromphenolblau) wurden die Proteine 15min bei 65°C denaturiert.

### 2.2.10.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte spektrophotometrisch nach der Bradford-Methode. Durch die Bindung des ionischen Farbstoffs *Coomassie brilliant blue* G-250 an basische Aminosäuren der Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs (465nm ohne Protein, 595nm mit Protein). Die Zunahme der Absorption bei 595nm wird im Spektralphotometer erfasst und auf diese Weise die Proteinkonzentration der Lösung ermittelt, die anhand einer Eichgeraden bestimmt wird. Zur Erstellung der Eichgeraden wurden BSA-Lösungen von 10µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml, 75µg/ml, 100µg/ml und 150µg/ml hergestellt. Dann wurde das BIORAD Protein Assay im Verhältnis 1:5 zu den entsprechenden BSA-Verdünnungen hinzugegeben, vermischt und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung bei 595nm photometrisch gemessen. Nach erfolgter Proteinisolierung wurden vor Zugabe des 2fachen SDS-Puffers 10µl der Suspension abgenommen und 1:10 mit Aqua Spüllösung verdünnt. 80µl der verdünnten Probe wurden mit 20µl BIORAD Protein Assay vermischt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend photometrisch gemessen. Liegen die so bestimmten Konzentrationen außerhalb der Eichgeraden, wurden dem entsprechend weitere Verdünnungsschritte durchgeführt. Die jeweiligen Verdünnungen der Proben wurden bei der anschließenden Berechnung des Proteingehaltes berücksichtigt.

### 2.2.10.3 Western-Hybridisierung (Westernblot)

Der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte per Elektroblothing bei 0,8-20 mA in einer *Trans-Blot Semi-dry Transfer Cell* für 45min. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die Nitrozellulosemembran mit PonceauS-Lösung (0,2%PonceauS, 3%Trichloressigsäure) gefärbt. Um unspezifische Bindungen von Antikörpern an die Membran zu unterbinden, wurde die Membran 1h mit 3% Magermilchpulver in 1fach TBS (10x TBS: 24,2g Tris-Base, 80g NaCl; pH 7,6) gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit einem Primärantikörper für mindestens 4h oder über Nacht. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen (5min) in 1fach TBS entfernt. Nach einer zweistündigen Inkubation mit einem an Alkalische-Phosphatase (AP) gekoppelten Sekundärantikörper (1:3000) und erneutem Waschen in 1fach TBS (3x 10min) wurden die Proteine durch Zugabe

des AP-Substrates sichtbar gemacht. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper und die eingesetzten Konzentrationen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

## 2.2.11 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

### 2.2.11.1 Bestimmung der Expressionslevel mittels FACS – Analyse

Das *fluorescence-activated cell sorting* – die FACS Analyse stellt eine Möglichkeit dar Größe, Granularität und die Oberflächenantigene von Zellen darzustellen und zu quantifizieren.

Auch hier werden Antikörper zur Hilfe genommen, diesmal mit Fluoreszenzpartikel markiert. Die Zellen werden einzeln durch eine Detektierkammer gesogen und am Messpunkt führen dann die Größe, die Form, die Membranoberfläche und die intrazellulären Granula zur Lichtstreuung eines Laserstrahls. Die Lichtstreuung wird durch einen Photodetektor in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (forward scatter) und einen im rechten Winkel dazu liegend (sideward scatter) registriert und in elektrische Signale umgewandelt. Der Laserstrahl regt außerdem das Chromophor der verwendeten Antikörper zur Emission von Lichtquanten an, die ebenfalls aufgetrennt nach ihrer Wellenlänge detektiert werden.

Da die Auftrennung der einzelnen Fluoreszenzintensitäten aufgrund der sich überlappenden Spektren der Chromophore nicht immer sauber gelingt, muss dieser Fehlerbereich abgezogen werden. In der sogenannten Kompensation werden die sich überlappenden Bereiche registriert und dadurch in den späteren Messungen automatisch berücksichtigt. Speziell dafür bereitgehaltene Kompensationsbeads werden mit den später zu messenden Fluoreszenz-Antikörpern inkubiert und erlauben dann die Justierung der Signale. Die Kompensationsparameter wurden im Vorhinein für jede verwendete Zellentität erstellt und dann für alle Messungen beibehalten. Die Auswertung erfolgte mithilfe der BD FACSDiva™ Software.

### 2.2.11.2 Präparation der Zellen für die FACS – Messung

Um die Zellen aus den Wells zu lösen, wurden diese dreimal mit 200 µl PBS gespült. Nicht kultivierte Zellen in Lösung wurden direkt in ein FACS-Röhrchen gegeben. Um ausreichend Zellen für die Analyse vorzuhalten, wurden pro FACS-Röhrchen  $2 \times 10^4$  bis  $2 \times 10^5$  Zellen überführt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und die Zellen nochmals mit PBS gewaschen, um Reste des Mediums und ähnliches welches die Antikörperbindung beeinflussen könnte, zu entfernen.

Die Zellen wurden dann mit 50µl PBS resuspendiert und mit 2µl des Antikörpers (wenn nicht anders angegeben) auf Eis im Dunkeln für 20min inkubiert.

Grundsätzlich wurden diese Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt und auch das verwendete PBS wurde gekühlt und auf Eis gelagert. Die Zentrifuge wurde bei einer Temperatur von 4°C verwendet.

Unter der Fragestellung intrazellulärer Antigene wurden die Zellen mit 50µl 0,1% Saponin (in PBS) und dem Antikörper inkubiert. Saponin ist ein Glycosid mit einer hohen Affinität zu Cholesterol. Durch die Interaktion kommt es zur Bildung von Poren, die die Zellmembran permeabel machen. Als Negativkontrolle wurde immer auch eine Probe ohne Antikörper inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 500µl PBS zu Probe dazugegeben und das Ganze erneut abzentrifugiert. Bei nichtfluoreszierenden Primärantikörpern wurden 50µl PBS und 2µl Sekundärantikörper dazugegeben und nochmals für 20 Minuten inkubiert. Um überschüssige Antikörper auszuwaschen, wurden die Proben insgesamt dreimal mit 500µl resuspendiert und abzentrifugiert.

Um eine für die Messung optimale Zellsuspension zu erreichen, wurden die Zellen mit 500µl PBS resuspendiert. Die Messungen am FACSCanto wurden mit Hilfe der FACSDiva Software immer gleich im Anschluss vorgenommen.

### 2.2.11.3 Bestimmung des Überlebens von Zellen mittels FACS –Analyse

Zum Nachweis der Vitalität der gemessenen plasmazytoiden Dendritischen Zellen wurden tote und apoptotische Zellen mit Propidiumiodid (PI) bzw. Annexin V angefärbt.

Phosphatidylserin (PS) findet sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran einer vitalen Zelle. Während der Apoptose wird PS auf die Außenseite

der Membran transloziert. Das fluoreszenzmarkierte Annexin V bindet an PS und ermöglicht es somit apoptotische Zellen durchflusszytometrisch nachzuweisen. Werden Zellen nekrotisch und ihre Membran durchlässig, kann Annexin V in die Zellen eindringen und sich an die Innenseite der Membran binden. Daher können bei alleiniger Färbung von Zellen mit Annexin V apoptotische nicht von nekrotischen unterschieden werden. Man kombiniert daher die Annexin V Markierung mit einer Propidiumiodidfärbung. Das Propidiumiodid dringt nur in Zellen mit durchlässiger Membran, also in nekrotische Zellen ein. Lebende Zellen sind somit Annexin negativ und PI negativ, apoptotische Zellen Annexin positiv und PI negativ, nekrotische Zellen Annexin positiv und PI positiv.

#### 2.2.12 Wachstumsanalyse (MTT-Test)

Die Reaktion der Zellvitalität auf die untersuchten Stimulantien und Zytokine wurde mit Hilfe des MTT-Tests untersucht. Dieser Test dient der Quantifizierung von lebenden Zellen durch folgendes Prinzip: Das Tetrazoliumsalz MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) besitzt einen Tetrazolring und ist, gelöst in phenolrotfreiem Medium oder PBS, gelb gefärbt. Die mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen sind in der Lage, diesen Tetrazolring enzymatisch zu spalten, so dass violettfarbene Formazankristalle entstehen, die in wässriger Lösung unlöslich sind und ausfallen. Durch Zugabe von Isopropanol (100%) werden die Kristalle gelöst und die Absorption der violetten Färbung spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 550nm bis 600nm messbar. Die optische Dichte des Farbstoffes ist dabei direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen und korreliert mit deren Stoffwechselaktivität.

Nach Kultivierung der Zellen unter Zusatz bestimmter zu untersuchender Stimulanzien unter festgelegten Kulturbedingungen erfolgte die Auswertung mittels MTT-Test. Dazu wurden 10% der MTT Gebrauchslösung (1 Vial MTT Trockensubstanz + 3ml PBS) pro Volumen Zellkultur hinzugegeben. Die 96-well Mikrotiterplatten wurden für eine Stunde unter Standardbedingungen im Zellkulturschrank inkubiert. Durch Zusatz der MTT *Solubilization Solution* im Verhältnis 1:1 wurde die Reaktion gestoppt, die Zellen lysiert und die entstandenen Formazankristalle aufgelöst. Bei der anschließenden Messung in einem Mikrotiterplatten-Photometer wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 570nm

gemessen. Von diesem Wert wurde die Extinktion bei 690nm abgezogen, um die durch Medium und Präzipitate entstehende Absorption heraus zurechnen.

Zur Auswertung der gemessenen Werte wird die Extinktion der vitalen ohne Zusätze inkubierten Zellen als 100 % gesetzt und die weiteren gemessenen Werte in Relation zu diesem Ausgangswert berechnet. Bei allen Angaben handelt es sich um Mittelwerte, die sich aus der Anzahl der Messungen ergeben, die an mindestens zwei verschiedenen Versuchstagen durchgeführt wurden.

### 2.3 Statistische Analyse

Die Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel  $\bar{x}$  mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM; *Standard Error Mean*) angegeben. Bei einigen Experimenten wurde zum Vergleich der Mittelwerte ein zweiseitiger Student-t-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt bzw. die ANOVA Varianzanalyse für Vergleiche zwischen den einzelnen Stimuli. Für den Vergleich z.B. der mittleren Fluoreszenz-intensitäten (MFI), die nicht einer Normalverteilung entsprechen, kam der Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test (Rangsummentest) zur Anwendung. Statistische Signifikanz wurde bei  $p < 0,05$  angenommen und ist durch Markierung mit einem \* angezeigt. Sind unter Berücksichtigung besonderer Fragestellungen die Unterschiede zweier Stichproben statistisch nicht signifikant, so ist dieses durch <sup>†</sup> gekennzeichnet. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Berechnung der statistischen Werte, aus mindestens  $n \geq 5$ . Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Microsoft<sup>®</sup> Office 2007 Programms Excel.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der IFN- $\alpha$ Sekretion von plasmazytoiden dendritischen Zellen nach Stimulierung mit CpG ODN in Abhängigkeit von Zeit und Konzentration

Die Wirkungsweise der CpG Motive ist seit einiger Zeit Gegenstand intensiver Forschungen. Ihr Vermögen Immunzellen zu stimulieren und somit die körpereigene Immunabwehr anzuregen, scheint ein vielversprechender Ansatz in der Entwicklung neuer innovativer Therapien verschiedenster Krankheiten. Das Verständnis der Eigenschaften und des Verhaltens der Zielzellen, in dieser Doktorarbeit speziell der plasmazytoiden dendritischen Zellen, ist dabei von großer Bedeutung und Teil der Grundlagenforschung.

Um die IFN- $\alpha$  Ausschüttung plasmazytoider dendritischer Zellen als Antwort auf die Stimulation mit verschiedenen CpG Motiven zu untersuchen, wurden diese wie im Material und Methoden Teil beschrieben isoliert und inkubiert.

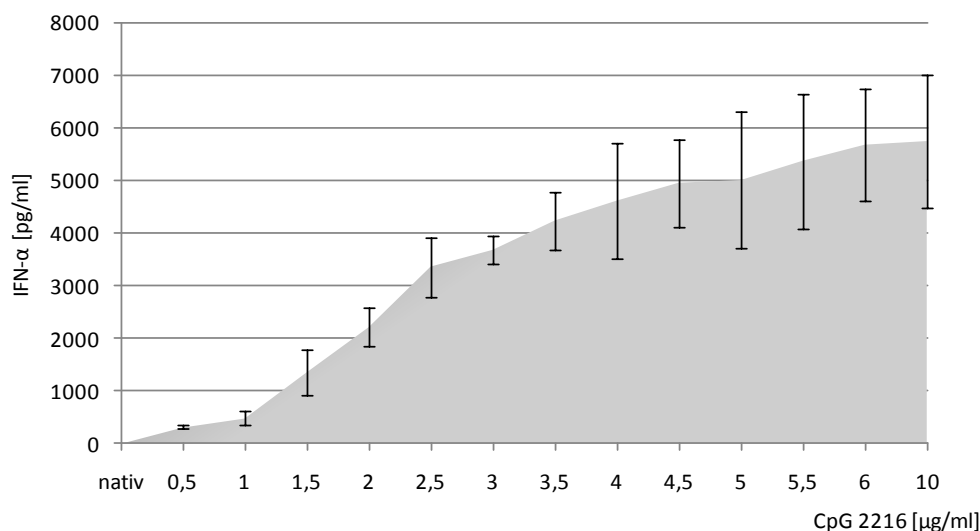
Es zeigt sich ein Einfluss der Konzentration und der Zeitkomponente auf die Menge des ausgeschütteten IFN- $\alpha$ .

##### 3.1.1 Bestimmung der IFN- $\alpha$ Sekretion in Abhängigkeit der Konzentration des Klasse A CpG ODN 2216

Zur genaueren Charakterisierung der Dosis-Wirkungs-Beziehung im Sinne der Abhängigkeit der Konzentration des ausgeschütteten IFN- $\alpha$  von der Menge an zugegebenem Stimulus, wurden die isolierten pDCs mit CpG ODN 2216 in 0,5 $\mu$ g Schritten aufsteigenden Konzentrationen im Bereich von 0,5 $\mu$ g/ml bis 6 $\mu$ g/ml und abschließend mit 10 $\mu$ g/ml inkubiert. Die ausgeschüttete Menge IFN- $\alpha$  wurde nach 24h photometrisch bestimmt und anhand der Standardkurve unter Berücksichtigung der Verdünnungen in pg/ml umgerechnet.

Vor dem Hintergrund der Wirksamkeit eines Wirkstoffes ist die Dosis-Wirkungs-Beziehung von zentraler Bedeutung. Ab welcher Konzentration treten Effekte auf? Wie stark sind die Effekte in Abhängigkeit von der Konzentration? So verursacht beispielsweise eine doppelte Dosis nicht zwingend einen doppelt so großen Effekt. Man spricht dann von einer nicht linearen Dosis-Wirkungs-Beziehung. Diese nicht

lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung konnte auch bei der Untersuchung der CpG ODN induzierten IFN- $\alpha$  Sekretion beobachtet werden. Die mittlere effektive Konzentration ( $EC_{50}$ ) beschreibt die effektive Konzentration, bei der ein halbmaximaler Effekt beobachtet werden kann.



**Abbildung 4: Zusammenhang zwischen der zugegebenen Menge an CpG ODN 2216 und dem Anstieg der IFN- $\alpha$  Sekretion**

Die aus Spenderblut isolierten pDCs wurden zu je  $5 \times 10^4$  Zellen in 96 *U bottom well* Mikrotiterplatten für 24h mit den auf der x-Achse angegebenen Konzentrationen CpG ODN 2216 inkubiert. Die Menge an eingesetztem Stimulans zur Menge an sekretiertem IFN- $\alpha$  verhält sich nicht proportional zueinander, es zeigt sich eine nicht lineare Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Die doppelte Menge Stimulans bewirkt nicht die Sekretion der doppelte Menge IFN- $\alpha$ . Das Verhältnis zwischen  $3 \mu\text{g/ml}$  und  $6 \mu\text{g/ml}$  entspricht 4,3, das von  $5 \mu\text{g/ml}$  und  $10 \mu\text{g/ml}$  1,6. Der Kurvenverlauf ist im Bereich von  $1 \mu\text{g/ml}$  bis  $4,5 \mu\text{g/ml}$  steil, dann wird die Zunahme der IFN- $\alpha$  Ausschüttung bei Steigerung der CpG Konzentration geringer und der Kurvenverlauf beginnt abzuflachen.  $EC_{100}$  wird im arithmetischen Mittel der IFN- $\alpha$  Konzentration im Bereich von  $6 \mu\text{g/ml}$  bis  $10 \mu\text{g/ml}$  ( $\bar{x}_{arith.} = 5710,6 \text{pg/ml}$ ) angenommen. Somit ergibt sich die  $EC_{50}$  für CpG ODN 2216 bei  $2,6 \mu\text{g/ml}$ . Gezeigt sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen  $\pm$  SEM aus  $n=4$ .

Bereits bei der kleinsten eingesetzten Menge ODN 2216 von  $0,5 \mu\text{g/ml}$  ist eine IFN- $\alpha$  Sekretion mit dem ELISA detektierbar (Abbildung 4). Die IFN- $\alpha$  Ausschüttung betrug in dem Fall im Mittel  $309 \text{pg/ml}$  pro  $5 \times 10^4$  pDCs. Die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung des eingesetzten ODN 2216 verhält sich nicht linear. Die doppelte Menge Stimulans bewirkt nicht die Sekretion der doppelte Menge IFN- $\alpha$ . Der im Verhältnis größte Anstieg der IFN- $\alpha$  Konzentration bei Dosissteigerung findet im Bereich  $1 \mu\text{g/ml}$  bis  $4,5 \mu\text{g/ml}$  statt, danach beginnt die Kurve allmählich abzuflachen, bis eine Dosissteigerung um 66% (von  $6 \mu\text{g/ml}$  auf  $10 \mu\text{g/ml}$ ) nur noch ein IFN- $\alpha$  Zunahme von

68pg/ml absolut bewirkt. Deshalb wird im Bereich von 6-10µg/ml die maximale effektive Konzentration ( $EC_{100}$ ) erreicht. In diesem Bereich findet keine wesentliche Steigerung der IFN- $\alpha$  Sekretion mehr statt. Rein mathematisch liegt die mittlere effektive Konzentration ( $EC_{50}$ ) somit bei 2,6µg/ml CpG ODN 2216.

Für die weiteren Versuche wird anhand dieser Ergebnisse eine ODN Konzentration von 3µg/ml und/oder 6µg/ml gewählt, diese entsprechen in etwa der  $EC_{50}$  und  $EC_{100}$  des klassischen Klasse A CpG ODN 2216.

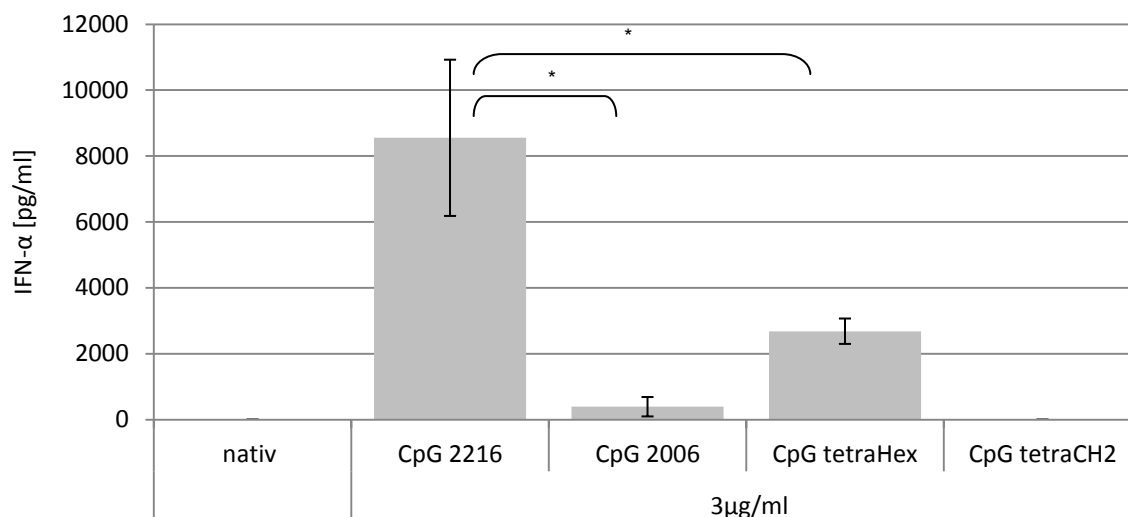
### 3.1.2 Bestimmung der quantitativen IFN- $\alpha$ Ausschüttung der isolierten pDCs als Antwort auf unterschiedliche Klassen CpG ODN

Die aus dem Blut gesunder, allergie- und medikationsfreier Spender per magnetischer Zellsortierung gewonnenen pDCs wurden mit jeweils 3µg/ml des Typ A CpG 2216, des Typ B CpG 2006 inkubiert und die IFN- $\alpha$  Produktion nach 24h gemessen.

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Molekulare Medizin wurde das CpG TM6<sub>4</sub> (im Verlauf tetraHex genannt) in Hinsicht auf seine Eigenschaften als IFN- $\alpha$  Stimulans untersucht. Das Derivat TM6<sub>4</sub>-C<sup>Me</sup> (im Verlauf tetraCH2 genannt), ein von TM6<sub>4</sub> abgeleitetes ODN, mit einem methyliertem nonsens CpG-Motiv diente als Negativkontrolle, ebenso wie nicht stimulierte Zellen.

Die Hexanukleotidsequenz *TCGTGT* in *cis* im CpG ODN TM6<sub>4</sub> führt zu einer stärkeren Internalisierung. Dieses Motiv enthält ein CpG Nukleotid innerhalb einer Sequenz, die eine starke CpG-spezifische Stimulation auf B-Zellen ausübt, also Eigenschaften eines Klasse B CpG Motivs aufweist <sup>[151]</sup>.

Die photometrisch gemessene Extinktion wurde anhand der Standardkurve und der daraus bestimmten Regression unter Berücksichtigung der Verdünnungen in pg/ml umgerechnet.



**Abbildung 5: IFN- $\alpha$  Ausschüttung als Reaktion auf verschiedenen Klassen CpG ODN in pg/ml**

CpG 2216 zeigt als das klassische Typ A CpG die größte induzierte IFN- $\alpha$  Ausschüttung der hier untersuchten unterschiedlichen CpG Motive. Mit 8553pg/ml liegt die Konzentration von IFN- $\alpha$  fast 22mal höher als nach Stimulation mit dem Typ B CpG 2006 (394pg/ml) ( $p=0,027$ ). Die Konzentration nach Stimulation mit CpG tetraHex liegt etwa 3mal niedriger (2685pg/ml) als nach Stimulation mit CpG 2216 ( $p=0,043$ ). Gezeigt sind die Werte nach 24h Inkubation mit je 3 $\mu$ g/ml ODN. Native pDCs fungieren als Negativkontrolle, sowie CpG tetraCH2, ein von TM6<sub>4</sub> abgeleitetes ODN mit nonsens CpG-Motiv, als Negativkontrolle für den immunstimulatorischen Effekt. Gezeigt sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen  $\pm$  SEM aus  $n=20$ .

Basal lag die IFN- $\alpha$  Produktion unterhalb der Nachweisgrenze (Detektionslimit laut Herstellerangaben 3,16pg/ml) (Abbildung 5).

CpG 2216 hat, wie erwartet, von den getesteten CpG Motiven die größte Potenz die IFN- $\alpha$  Sekretion zu stimulieren. Nach Stimulation mit CpG 2216 zeigte sich ein deutlicher Konzentrationsanstieg. Auf die Einzelzelle bezogen errechnete sich eine durchschnittliche IFN- $\alpha$  Sekretion pro pDC von 0,017pg innerhalb von 24h bei Inkubation mit 3 $\mu$ g/ml CpG 2216. Die einzelnen CpG Varianten zeigen unterschiedliche Potenzen bezüglich der Stimulierung der IFN- $\alpha$  Sekretion. Mit 8553pg/ml liegt die Konzentration von IFN- $\alpha$  bei Stimulation mit 3 $\mu$ g/ml CpG 2216 für 24h fast 22mal höher als nach Stimulation mit dem Typ B CpG 2006 (394pg/ml). Die Konzentration nach Stimulation mit CpG tetraHex beträgt etwa ein Drittel (2685pg/ml) der nach Stimulation mit CpG 2216 gemessenen Konzentration.

Die Inkubation der pDCs mit dem CpG tetraCH2 als Negativkontrolle zeigte keine detektierbare Konzentration an IFN- $\alpha$  in den untersuchten Überständen. Das CpG tetraHex zeigte mit im Mittel gemessenen 2685pg/ml eine geringere Potenz als CpG

2216 aber eine in der Hinsicht höher stimulatorische Aktivität als das Typ B CpG 2006.

Die Konzentration [pg/ml] an IFN- $\alpha$  kann direkt in Bezug gesetzt werden zur IFN-Aktivität [U/ml] da es diesem direkt wie folgt entspricht <sup>[152]</sup>:

1 U/ml = 2,5 pg/ml

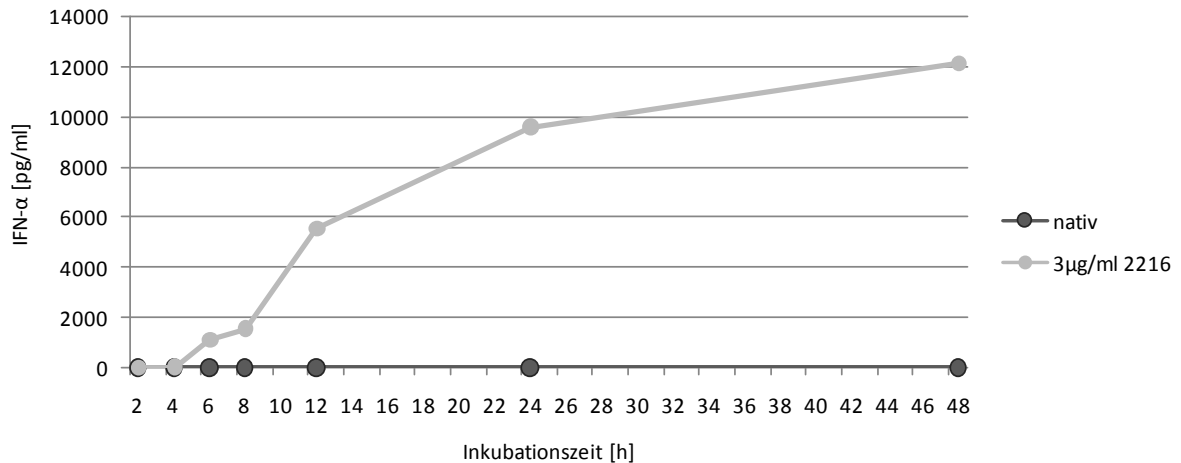
1 pg/ml = 0,4 U/ml

### 3.1.3 Untersuchung der IFN- $\alpha$ Sekretion in Abhängigkeit der Inkubationsdauer

Im folgenden Abschnitt wird gezeigt, wie sich die IFN- $\alpha$  Sekretion, bezogen auf die Zeit, verhält. Isolierte pDCs haben in vitro eine relativ begrenzte Lebensdauer, die unter Einsatz von Wachstumsstimulanzien verlängert werden kann. Beschrieben ist das für IL-3, aber auch für CpG ODN 2006 <sup>[1]</sup>. In dieser Arbeit wurde bewusst auf den Einsatz von IL-3 verzichtet, da zusätzliche nicht durch CpG und/oder HNSCC bedingte Veränderungen des pDC Phänotyps vermieden werden sollten.

#### 3.1.3.1 Kinetik der IFN- $\alpha$ Sekretion des CpG ODN 2216

Zur Klärung, ab welchem Zeitpunkt sich die erste messbare IFN- $\alpha$  Sekretion im Zellkulturüberstand findet und in welchem Zeitraum die stärkste Konzentrationszunahme des Zytokins stattfindet, wurden die frisch isolierten pDCs mit 3 $\mu$ g/ml des Klasse A CpG ODNs 2216 inkubiert. Die Messung der IFN- $\alpha$  Konzentration erfolgte nach 2h, 4h, 6h, 8h, 12h, 24h und 48h. Native Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt.



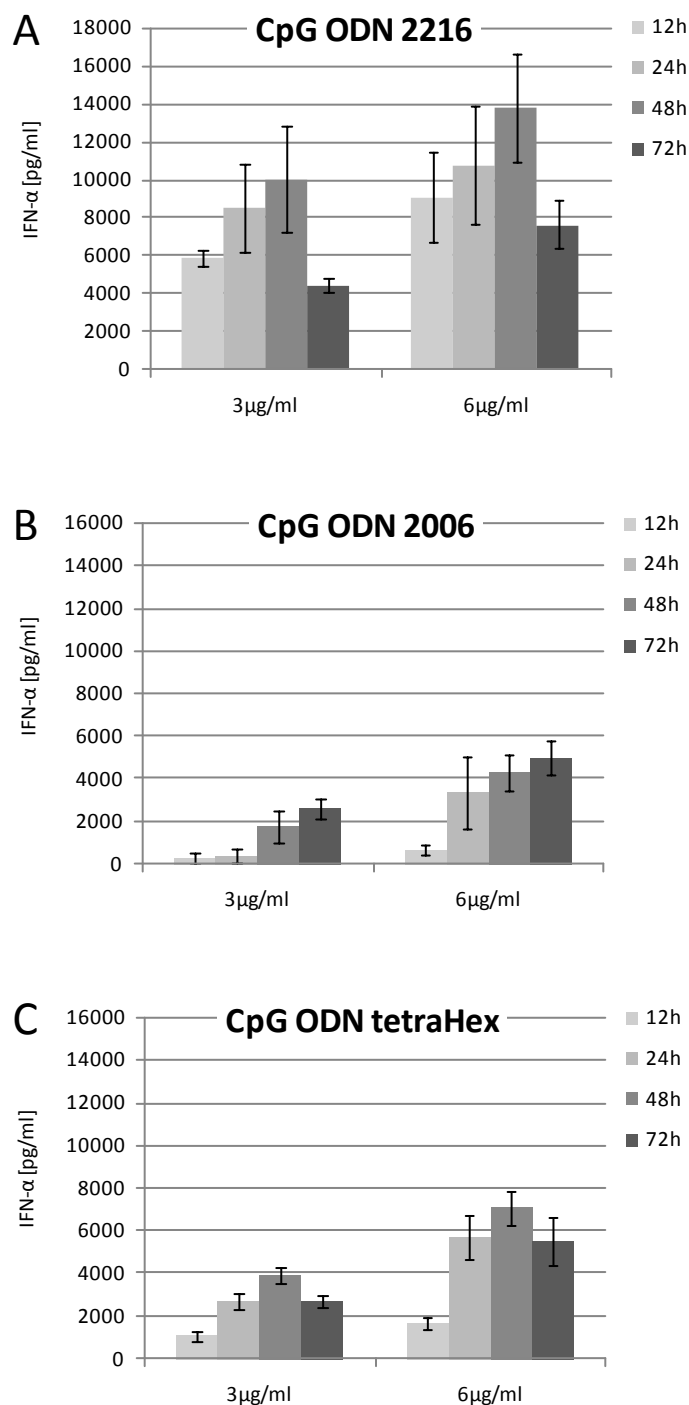
**Abbildung 6: Verlauf der IFN- $\alpha$  Ausschüttung nach Inkubationsbeginn mit CpG 2216**

Je 50.000 pDCs wurden mit 3µg/ml CpG 2216 für die Dauer von 2h/4h/6h/8h/12h/24h und 48h inkubiert. Die Konzentration von IFN- $\alpha$  im Kulturüberstand wurde photometrisch bestimmt. Die erste messbare IFN- $\alpha$  Sekretion zeigt sich >4h nach Inkubationsbeginn. Im Bereich von 8h-12h Stunden nach Inkubationsbeginn findet der größte Anstieg der IFN- $\alpha$  Ausschüttung statt. Nach 12 stündiger Inkubation flacht der Kurvenverlauf etwas ab, dennoch verdoppelt sich in etwa die Menge an IFN- $\alpha$  im Überstand noch innerhalb der nächsten 36 Stunden. Exemplarisch sind hier die Ergebnisse aus einem Versuchsdurchlauf dargestellt.

Der Hauptanteil der IFN- $\alpha$  Sekretion findet innerhalb der ersten 12h statt (Abbildung 6). Die kleinste mit dem ELISA detektierbare IFN- $\alpha$  Konzentration zeigt sich nach Ablauf von 4h. Nach 8h Inkubationszeit findet die stärkste relative Zunahme pro Zeit statt. Setzt man die IFN- $\alpha$  Konzentration nach 48h=100%, so werden 50% innerhalb der ersten 12h ausgeschüttet.

### 3.1.3.2 Vergleich der IFN- $\alpha$ Ausschüttung verschiedener ODNs über einen Zeitraum von 72h

Die per magnetischer Zellsortierung aus Vollblut gewonnenen plasmazytoiden dendritischen Zellen wurden zu  $5 \times 10^4$  Zellen in 100µl Gesamtvolumen pro Well über 12h/24h/48h/72h inkubiert. Es wurden jeweils 3µg/ml oder 6µg/ml ODN zugegeben. Native Zellen und das ODN tetraCH2 wurden als Negativkontrolle mitgeführt. Ein Mediumwechsel wurde für die Gesamtzeit der Inkubation nicht durchgeführt.



**Abbildung 7: Verlauf der IFN- $\alpha$  Konzentration [pg/ml] im pDC Zellkulturüberstand in Relation zur Inkubationszeit mit**

**A: CpG ODN 2216;**

**B: CpG ODN 2006;**

**C: ODN tetraHex**

pDCs gesunder Spender wurden mit dem Klasse A CpG ODN 2216, dem Klasse B CpG ODN 2006 und dem ODN tetraHex für 12h/24h/48h/72h inkubiert. Angegeben sind die Konzentrationen an IFN- $\alpha$  am Ende der kompletten Inkubationszeit. Das Medium wurde für die Dauer der zu untersuchenden Inkubationszeit belassen. Native Zellen und das ODN fungierten als Negativkontrollen (Daten nicht gezeigt). Trotz der bekannten kurzen Lebenszeit von pDCs in Kultur zeigt sich mit Dauer der Inkubationszeit bei allen untersuchten ODN eine Zunahme der IFN- $\alpha$  Konzentration bis 48h nach Inkubationsbeginn. Gezeigt sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen  $\pm$  SEM aus n=6.

**A:** Die stärkste Zunahme der CpG 2216 induzierten IFN- $\alpha$  Konzentration findet innerhalb der ersten 12h nach Inkubationsbeginn statt. Nach 48h nimmt die Konzentration wieder ab.

**B:** Hier steigt die IFN- $\alpha$  Konzentration auch noch bis 72h nach Inkubationsbeginn an. Anzumerken ist, dass für ODN 2006 ähnlich wie für IL-3 eine lebensverlängernde Wirkung auf pDCs beschrieben ist <sup>[1]</sup>. Der größte Anstieg findet nach Ablauf von 12h statt, bzw. bei einer Konzentration von 3 µg/ml ODN 2006 sogar erst nach 24h.

**C:** Auch unter der Stimulation mit ODN tetraHex, einem ODN mit Klasse B Eigenschaften mit besserer Internalisierung durch eine eingebaute Hexanukleotidsequenz, fällt die IFN- $\alpha$  Konzentration nach 48h ab. Der größte Anstieg findet erst nach 12h statt, ähnlich wie beim ODN 2006, aber später als beim ODN 2216. Die IFN- $\alpha$  Konzentration liegt nach 12h aber etwa 3-4-mal höher als beim ODN 2006.

Vergleicht man die Kinetik der drei ODN CpG 2216, 2006 und tetraHex über 72h, so zeigen sich Unterschiede (Abbildung 7 A-C). Das typische Klasse A CpG 2216 induzierte die stärkste IFN- $\alpha$  Sekretion innerhalb der ersten 12h (Abbildung 7 A). Die Konzentration nimmt dann in den kommenden 36h weiter zu, aber in geringerem Maße als zuvor. Nach Ablauf von 48h sinkt die IFN-Konzentration wieder, bis 72h nach Inkubationsbeginn auf etwa 50%.

Anders verhält es sich beim typischen Klasse B CpG ODN 2006 (Abbildung 7 B). Hier steht die Aktivierung von B-Zellen in den immunstimulatorischen Eigenschaften im Vordergrund. Der anteilmäßig größte Konzentrationsanstieg von IFN- $\alpha$  findet erst nach 12h Stunden (6 $\mu$ g/ml ODN) bzw. nach 24h (3 $\mu$ g/ml) statt. Ein zweiter Unterschied zeigt sich nach Ablauf von 48h. Im Gegensatz zum CpG 2216 fällt hier die IFN- $\alpha$  Konzentration nicht ab. Das dritte hier untersuchte Motiv, das ODN tetraHex, zeigt wie das ODN 2006 ebenfalls einen späteren Anstieg der IFN- $\alpha$  Konzentration. Dieser findet bei beiden Konzentrationen erst nach 12h Inkubationszeit statt. Das ODN tetraHex hat Klasse B Charakteristika, zeichnet sich aber durch seine besseren Internalisierungseigenschaften aus als CpG ODN 2006 [151]. Die Induktionskapazität liegt insgesamt höher als beim ODN 2006 (siehe hierzu auch 3.1.2). Die IFN- $\alpha$  Konzentration sinkt nach 48h ähnlich wie beim ODN 2216 ab, allerdings in geringerem Maße, genauer gesagt um etwa 20- 30% je nach ODN Konzentration.

### 3.2 Der Einfluss von HNSCC auf die CpG ODN induzierte IFN- $\alpha$ Sekretion

Im zweiten Teil der Arbeit wurde in funktionellen Untersuchungen die Wirkung von CpG ODN auf pDCs unter Einfluss von HNSCC im Detail untersucht.

Bei einer Vielzahl von Karzinomen ist bekannt, dass sie Veränderungen des Immunsystems hervorrufen, die sie dann zu ihrem Vorteil nutzen.

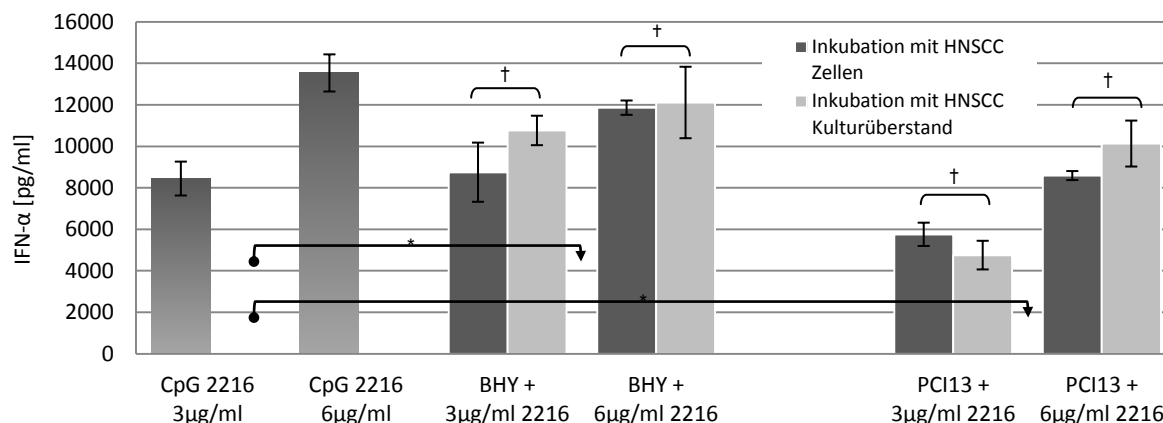
Das auch pDCs unter dem Einfluss von HNSCC dazuzählen, konnten schon Hartmann, Wollenberg et al. 2003 zeigen <sup>[36]</sup>. Sie zeigten, dass die Stimulierbarkeit durch CpG ODN in Gegenwart von HNSCC sinkt und vermuteten als Ursache eine Abnahme der TLR9 Rezeptors Expression. Dennoch konnte der Mechanismus hinter der Immunmodulation seitens des Tumors und der Einfluss, den der Tumor auf die pDCs nimmt, bis heute nicht genau identifiziert werden.

#### 3.2.1 Ein löslicher Faktor im Tumormilieu bedingt die Hemmung der CpG ODN induzierten IFN- $\alpha$ Ausschüttung

Zur weiteren Charakterisierung des einflussnehmenden Mechanismus wurde untersucht, ob ein Zell-Zell-Kontakt nötig ist oder, ob es sich um einen löslichen Faktor im Tumormilieu handelt, der für die Alterationen in der Funktionalität der plasmazytoiden dendritischen Zellen verantwortlich ist.

Exemplarisch für die in vitro Versuche wurden zwei HNSCC Zelllinien ausgewählt, deren Zytokinprofile sich, wie in Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe gezeigt, voneinander unterscheiden <sup>[135]</sup>. BHY eine Zelllinie in deren Zellkulturüberstand sich eine sehr hohe Konzentration an IL-6 (3750pg/ml) und eine niedrigere Konzentration von IL-8 (820pg/ml) findet. Der Zellkulturüberstand der PCI13 Zelllinie zeigt dagegen eine niedrigere Konzentration an IL-6 (620pg/ml), aber dafür eine annähernd ähnlich hohe Konzentration an IL-8 (780pg/ml) wie BHY. Die Zytokine IL-4 und IL-10 wurden in deutlich geringeren Konzentrationen im Zellkulturüberstand beider Zelllinien gemessen. Das immunsuppressiv wirkende Zytokin IL-10, sowie auch IL-1 werden primär nicht vom Tumor selbst produziert, sondern das Tumormilieu induziert unter anderem in mDCs deren Sekretion. IL-1 stimuliert wiederum in HNSCC die verstärkte Ausschüttung der tumorstimulierenden und -relevanten Zytokine IL-4, IL-6 und GM-CSF <sup>[153]</sup>.

pDCs der gleichen gesunden Spender wurden jeweils mit CpG 2216, mit CpG 2216 und Tumorzellen im Verhältnis 1:4 bzw. Tumorüberstand inkubiert. Exemplarisch sind in Abbildung 8 die Ergebnisse nach 48h Inkubation dargestellt.



**Abbildung 8: Auswirkung von HNSCC auf die CpG induzierte IFN- $\alpha$  Sekretion**

pDCs der gleichen Spender wurden jeweils mit CpG 2216, mit CpG 2216 und Tumorzellen im Verhältnis 1:4 bzw. Tumorüberstand für 48h inkubiert. Deutlich zu sehen ist die schon bekannte Alteration der IFN- $\alpha$  Sekretion durch HNSCC. Im Mittel beträgt die Reduktion der IFN- $\alpha$  Sekretion ~15% bei BHY und ~40% bei PCI 13. Eine Dosissteigerung des CpG ODN 2216 hat dabei eine leicht kompensatorische Wirkung. So liegt die Verminderung bei BHY bei einer ODN 2216 Konzentration von 6µg/ml um 5% Punkte niedriger und bei PCI13 um 6% Punkte. Der Unterschied zwischen Inkubation mit HNSCC Zellen und Zellkulturüberstand ist bei beiden Zelllinien nicht signifikant <sup>†</sup> ( $p \geq 1,1$ ). Der Unterschied zwischen der IFN- $\alpha$  Sekretion nach Stimulation nur mit CpG 2216 und Tumor ist unter Einfluss beider Zelllinien signifikant \* ( $p < 0,05$ ). Daher kann angenommen werden, dass der für die Hemmung der CpG induzierten IFN- $\alpha$  Sekretion verantwortliche Faktor bzw. Faktoren im Zellkulturüberstand gelöst sind und ein Zell-Zell-Kontakt zu diesem Zweck nicht nötig ist. Gezeigt sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen  $\pm$  SEM aus  $n=6$ .

Die Verminderung der CpG induzierten IFN- $\alpha$  Sekretion durch HNSCC konnte reproduziert werden <sup>[36]</sup>. Dabei zeigt sich ein quantitativer Unterschied zwischen den beiden untersuchten HNSCC Zelllinien. Bei beiden Zelllinien konnte zudem gezeigt werden, dass der Unterschied zwischen der IFN- $\alpha$  Sekretion unter HNSCC Zelleinfluss und unter dem Einfluss von HNSCC Zellkulturüberstand nicht signifikant ist. Es kann also angenommen werden, dass der für die Reduktion verantwortliche Mechanismus keinem Zell-Zell Kontakt zu Grunde liegt. Gleiches konnte auch schon für den Einfluss von HNSCC auf  $T_{reg}$  gezeigt werden <sup>[154]</sup>.

Der supprimierende Einfluss der Zelllinie PCI13 auf die IFN- $\alpha$  Sekretion von pDCs ist größer als die der BHY Zelllinie. So ist die Konzentration unter BHY Einfluss um etwa 15% niedriger, unter PCI13 Einfluss um bis zu 45%. Die Dosissteigerung des CpG ODN 2216 hat dabei eine leicht kompensierende Wirkung. So liegt die Verminderung

bei BHY bei einer ODN 2216 Konzentration von 6µg/ml um 5 Prozentpunkte niedriger und bei PCI13 um 6 Prozentpunkte.

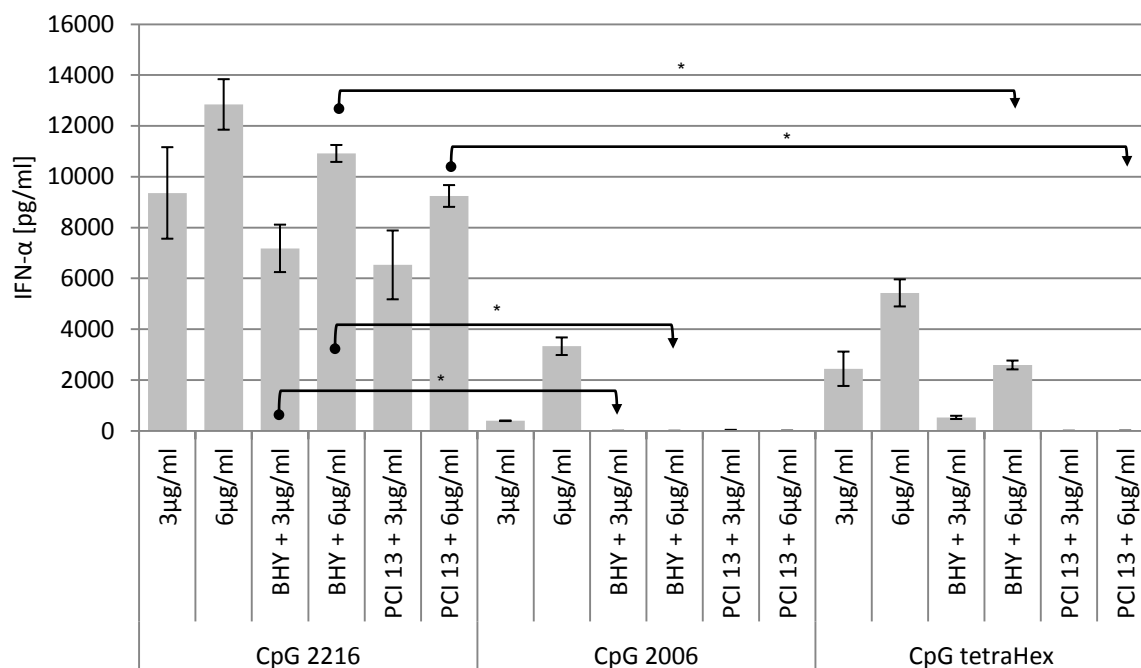
### 3.2.2 Vergleich der Auswirkungen von HNSCC auf die unterschiedlichen Klassen der CpG Motive

Wie schon beschrieben, können CpG ODN mit verschiedenen Rückgratmodifikationen und verschiedenen Sequenzmotiven Unterschiede in den Kinetiken des durch sie verursachten immunstimulatorischen Effektes aufweisen.

Im Folgenden sollte untersucht werden ob und in welcher Weise sich Unterschiede unter Einfluss von HNSCC in der CpG induzierten IFN-α Sekretion zeigen.

Wie reagiert die CpG induzierte IFN-α Sekretion des Klasse B CpG 2006 auf den Einfluss von HNSCC Zellen? Hat die bessere Internalisierung des ODN tetraHex einen Einfluss auf die Reduzierung der IFN-α Sekretion seitens des Tumors?

pDCs derselben Spender wurden für 24h mit den ODN 2216, 2006 und tetraHex plus/minus HNSCC Zellkulturüberstand inkubiert. Native Zellen und das nonsens ODN tetraCH2 liefen als Negativkontrolle mit (Daten nicht gezeigt). Ein zwischenzeitlicher Mediumwechsel fand nicht statt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die IFN-α Konzentration mit der ELISA Technik bestimmt und mithilfe der erstellten Standardkurve in pg/ml umgerechnet.



**Abbildung 9: Unterschiede des HNSCC Einflusses auf die verschiedenen Klassen CpG ODN**

pDCs der gleichen Spender wurden mit dem typischen Klasse A CpG ODN 2216 sowie dem Klasse B CpG ODN 2006 mit und ohne Tumorzellüberstand für 24h inkubiert. Das ODN tetraCH2 und native Zellen dienten als Negativkontrolle (Daten nicht gezeigt). Das ODN TetraHex ein CpG mit Klasse B Charakteristika und einer intrazelluläre Aufnahme fördernden zusätzlichen Hexanukleotid-Sequenz wurde zusammen mit den CpG 2006 unter dem Einfluss des Tumormilieus auf seine IFN- $\alpha$  Induzierbarkeit im Vergleich zum CpG 2216 untersucht. Wie schon gezeigt ist die CpG induzierte IFN- $\alpha$  Sekretion von pDCs unter Kulturbedingungen mit HNSCC Zellkulturüberstand reduziert. Ist die Induktion mit dem CpG 2216 noch möglich, so unterbleibt diese völlig unter dem Einsatz des ODN 2006 als Stimulans. Werden die pDCs mit dem ODN tetraHex inkubiert, so zeigt sich im BHY Einfluss eine um mehr als 50% reduzierte IFN- $\alpha$  Konzentration im Zellkulturüberstand nach 48h ( $p=0,005$ ). Unter dem Einfluss von PCI13 unterbleibt diese dann ganz. Gezeigt sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen  $\pm$  SEM aus  $n=5$ . \* signifikant † nicht signifikant

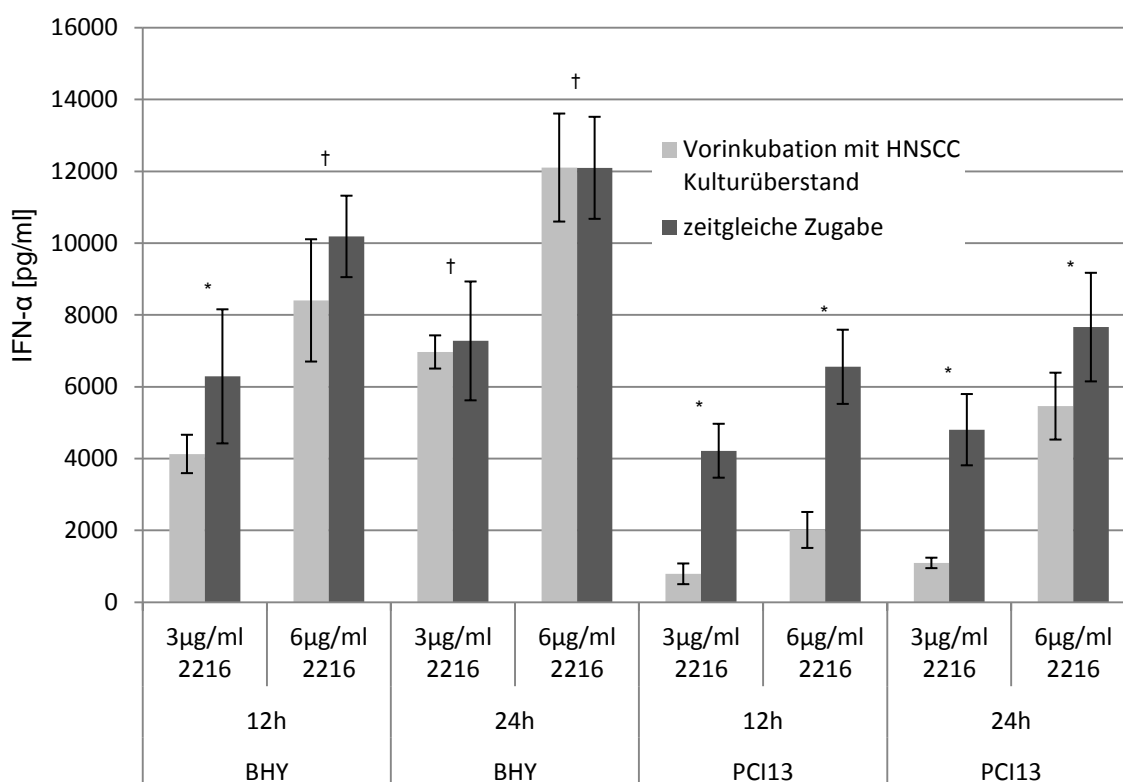
HNSCC hemmt die CpG induzierte IFN- $\alpha$  Ausschüttung, aber nicht alle CpG ODN Klassen gleichermaßen (Abbildung 9). Kann mit CpG ODN 2216 und tetraHex noch eine IFN- $\alpha$  Sekretion unter Tumoreinfluss induziert werden, so unterbleibt diese bei der Stimulation mit CpG ODN 2006 vollkommen ( $p=0,006$ ). Mit dem ODN tetraHex ist unter dem Einfluss von BHY noch eine IFN- $\alpha$  Sekretion induzierbar. Ähnlich wie beim CpG 2216 ist aber auch diese in ihrer Quantität reduziert ( $p=0,001$ ). Bei der Inkubation mit PCI13 wird die Sekretion hingegen völlig unterbunden ( $p=0,001$ ). Das ODN tetraCH2 diente als Kontrolle und zeigt wie erwartet keine IFN- $\alpha$  Sekretion (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.3 Untersuchung zur Auswirkung der Vorinkubation mit HNSCC auf die CpG ODN induzierte IFN- $\alpha$ Sekretion

In dieser Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob es einen zusätzlichen Einfluss auf die Funktionalität der pDCs hat, wenn die Zugabe des CpG Motivs 2216 12h/24h nach Inkubationsbeginn mit HNSCC erfolgt.

Zu diesem Zweck wurden die aufgereinigten pDCs gesunder Spender 24h bzw. 36h mit HNSCC Kulturüberstand inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der CpG ODN Motive für weitere 24h bzw 12h. Die gesamte Inkubationszeit lag somit bei 48h. Als Positivkontrolle wurden Zellen der gleichen Spender zeitgleich mit HNSCC Zellkulturüberstand und den CpG Motiven inkubiert. Native Zellen und ODN tetraCH2 fungierten als Negativkontrollen (Daten nicht gezeigt).

Die mit HNSCC Zellkulturüberstand vorinkubierten pDCs zeigen eine, im Vergleich zu den gleichzeitig mit CpG inkubierten Zellen, stärkere Verminderung ihrer IFN- $\alpha$  Sekretion. Es kann also angenommen werden, dass mit dem Einfluss den der Tumor auf die pDCs nimmt deren Funktionalität dauerhaft einschränkt wird und das pDCs die vor CpG Kontakt bereits mit HNSCC und dessen Zytokinmilieu in Berührung gekommen sind, keine volle Kapazität bezüglich ihrer IFN- $\alpha$  Sekretion mehr erreichen. Besonders die Vorinkubation mit dem Zellkulturüberstand der PCI13 Zelllinie hat eine signifikante Verminderung zur Folge (25-75%). Auch die Dauer der Vorinkubation spielt eine Rolle, so hat eine Verlängerung der Vorinkubation mit HNSCC eine weitere Absenkung der IFN- $\alpha$  Konzentration im Zellkulturüberstand zur Folge. Die 24h Vorinkubation mit BHY zeigt nur eine sehr geringe, statistisch nicht signifikante Verminderung, die 36 stündige Vorinkubation zeigt eine signifikante Verminderung der Sekretion. Bei PCI13 zeigt sich dieser Effekt deutlicher, so ist die IFN- $\alpha$  Konzentration nach 24h Vorinkubation um 25% niedriger, bei 36h Vorinkubation um 75%.



**Abbildung 10: Auswirkungen einer vorausgehenden Vorhemmung mit HNSCC Kulturüberstand auf die CpG induzierte IFN- $\alpha$  Ausschüttung**

Die pDCs wurden vor der Zugabe des Stimulans mit HNSCC Tumorüberstand für 24h bzw. 36h inkubiert und dann ohne Mediumwechsel für weitere 24h bzw. 12h mit CpG 2216 inkubiert. Auch hier sieht man wieder das unterschiedliche Ausmaß der Einflussnahme der beiden HNSCC Zelllinien. PCI13 zeigt eine stärkere und signifikante ( $p < 0,05$ ) Verminderung der CpG induzierten IFN- $\alpha$  Sekretion als BHY. Bei BHY zeigt sich im Vergleich der Mittelwerte auch diese Tendenz, jedoch ist diese statistisch nur bei einer 36h Vorhemmung und der Zugabe von 3µg/ml CpG ODN statistisch signifikant ( $p = 0,018$ ). Die Vorinkubation und auch deren Dauer haben einen signifikanten Einfluss ( $p < 0,05$ ) auf die IFN- $\alpha$  Sekretion. Ebenfalls unter PCI13 ausgeprägter als unter BHY. Gezeigt sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen  $\pm$  SEM aus  $n = 5$ . \* signifikant † nicht signifikant

### 3.2.4 Untersuchungen zum Einfluss von IL-6, IL-8 und IL-10 auf die CpG induzierte IFN- $\alpha$ Ausschüttung

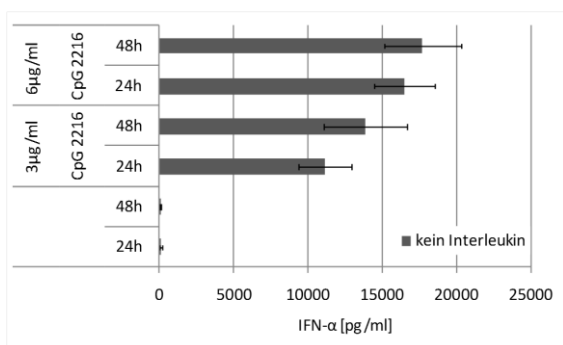
In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass Tumore des Kopf-Hals-Bereiches von vielen Lymphozyten und auch pDCs infiltriert werden [36]. Die Beeinflussung durch Zytokine und Chemokine seitens des Tumors bei HNSCC spielt hierbei eine wichtige Rolle. Untersuchungen von HNSCC-Zelllinien zeigten einen deutlichen Anstieg der Zytokine IL-6 und IL-8 im Zellkulturüberstand, sowie eine Steigerung der Sekretion von IL-10, TNF- $\alpha$  und GM-CSF im Mikromilieu des

Tumors. Die Zytokine IL-6 und IL-8 sind an einer Vielzahl onkogener Prozesse wie der Angiogenese und Metastasierung bei Kopf-Hals-Karzinomen beteiligt <sup>[155]</sup>. IL-10 wurde ursprünglich aufgrund seiner inhibitorischen Eigenschaften als *cytokine synthesis inhibitory factor* bezeichnet. Es beeinflusst u.a. Makrophagen in ihrer Zytokinsekretion, so dass die TH1 Subpopulation der T-Helfer Zellen runter reguliert wird <sup>[156]</sup>. Auch von TH2 Zellen wird es sekretiert und führt zu einer Minderexpression von MHC II auf APC <sup>[157-158]</sup>. Besonders interessant ist, dass Homologe des IL-10 Gens in verschiedenen viralen Genomen gefunden wurden, u.a. im Epstein-Barr-Virus und im Zytomegalievirus <sup>[159-160]</sup>. Diese IL-10 homologen Gene können ähnliche biologische Effekte auslösen wie das IL-10 <sup>[161]</sup>. Aufgrund ihrer Eigenschaften und Vorkommen im HNSCC Milieu wurde im Folgenden auf diese drei Zytokine fokussiert.

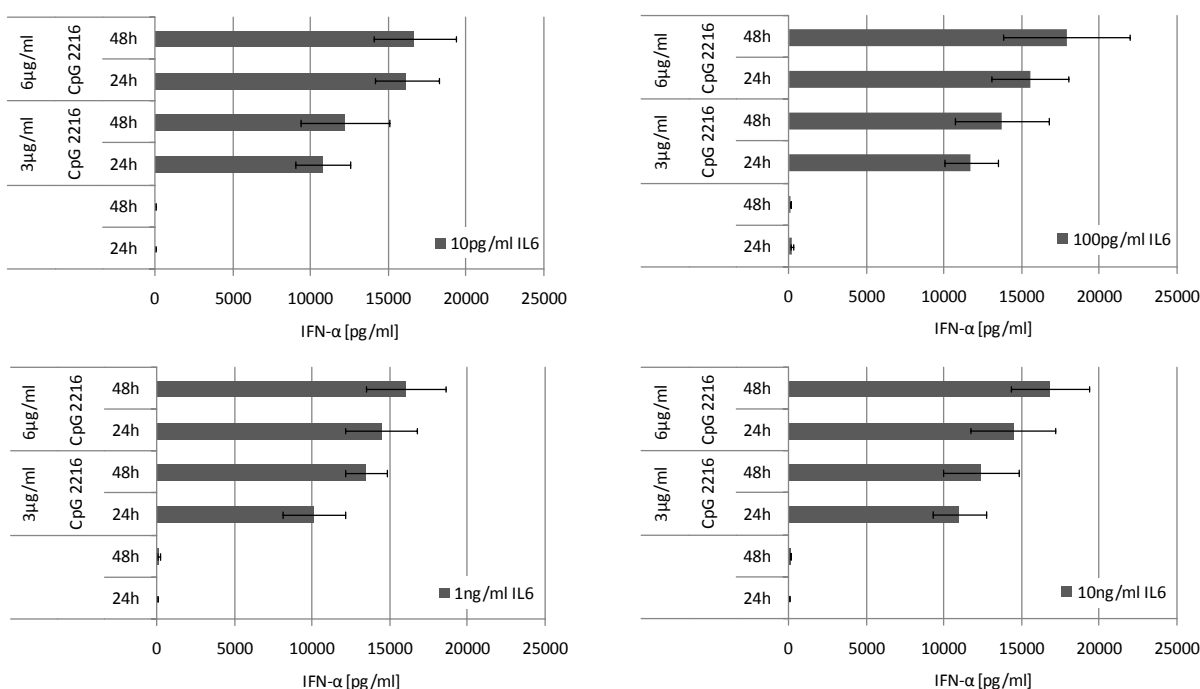
Die untersuchten IL-6 Konzentrationen wurde anhand von gemessenen Serum-Durchschnittswerten von HNSCC Patienten (19,5pg/ml) und dem gemessenen Höchstwert (312pg/ml), sowie Messungen im Zellkulturüberstand von HNSCC Zelllinien (bis etwa 4000pg/ml) gewählt <sup>[135, 150]</sup>. IL-8 wurde in den Konzentrationen 10pg/ml, 100pg/ml und 1ng/ml eingesetzt, sowie IL-10 mit 1ng/ml, 10ng/ml und 100ng/ml. Auch hier wurden die Konzentrationen anhand von Messdaten und Literaturangaben festgelegt <sup>[129, 135, 148, 162]</sup>.

Es konnte kein Effekt seitens IL-6 und IL-8 (Daten nicht gezeigt) bezüglich der CpG ODN 2216 induzierten IFN- $\alpha$  Sekretion von pDCs festgestellt werden. In Abbildung 11 sind exemplarisch die Messdaten der Inkubation mit IL-6 dargestellt. Bei keiner der eingesetzten Konzentrationen konnte eine signifikante Konzentrationsveränderung gemessen werden. Auch unterschiedliche Kombinationen der Zytokine IL-6 und IL-8 zeigten keinen Einfluss auf die IFN- $\alpha$  Sekretion (Daten nicht gezeigt).

A



B

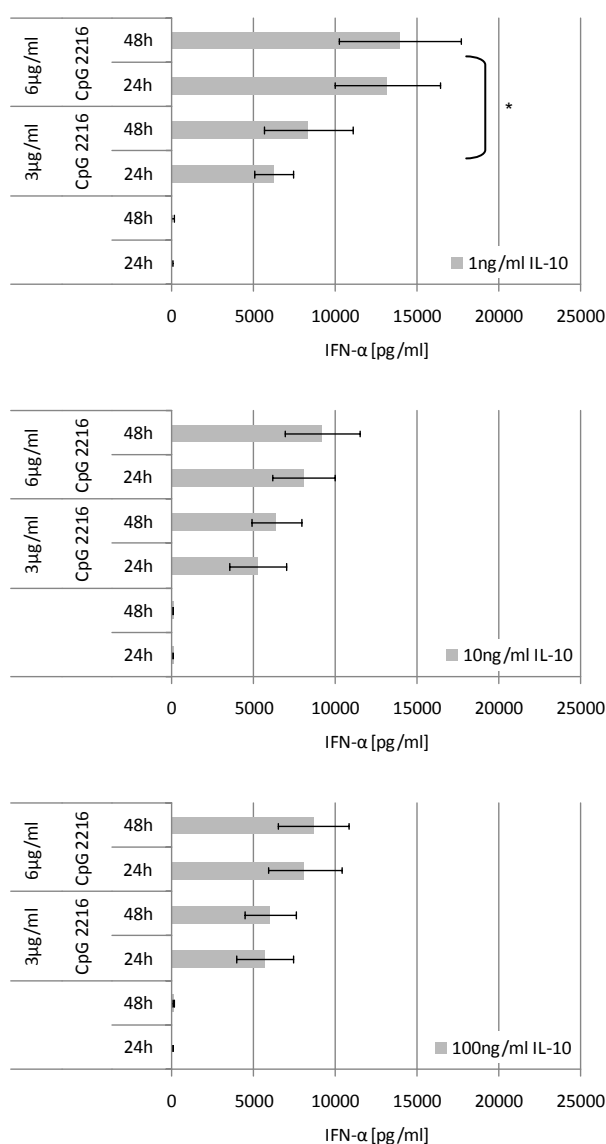


**Abbildung 11: Wirkung von Interleukin-6 auf die CpG ODN 2216 induzierte IFN- $\alpha$  Sekretion**

pDC derselben Spender wurden mit CpG ODN 2216 und unterschiedlichen Konzentrationen IL-6 für 24h und 48h inkubiert. Die gewählten Konzentrationen orientierten sich an gemessenen Serum-Durchschnittswerten von HNSCC Patienten (19,5pg/ml) und dem gemessenen Höchstwert (312pg/ml), sowie Messungen im Zellkulturüberstand von HNSCC Zelllinien (bis etwa 4000pg/ml) [135, 150]. Abb.11.A zeigt die Positivkontrolle pDCs inkubiert mit ODN 2216. Native Zellen, sowie die Inkubatin nur mit IL-6 ohne CpG Motiv fungierten als Negativkontrolle. IL-6 nimmt keinen Einfluss auf die IFN- $\alpha$  Sekretion von pDCs. Gezeigt sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen  $\pm$  SEM aus n=4.

In den Untersuchungen mit Interleukin-10 konnte ein Einfluss auf die IFN- $\alpha$  Sekretion nachgewiesen werden. Schon Duramad et al. konnten einen regulatorischen Einfluss auf die IFN- $\alpha$  Sekretion in Untersuchungen mit pDCs beschreiben [148]. Dieses konnte in den eigenen Versuchen gezeigt werden.

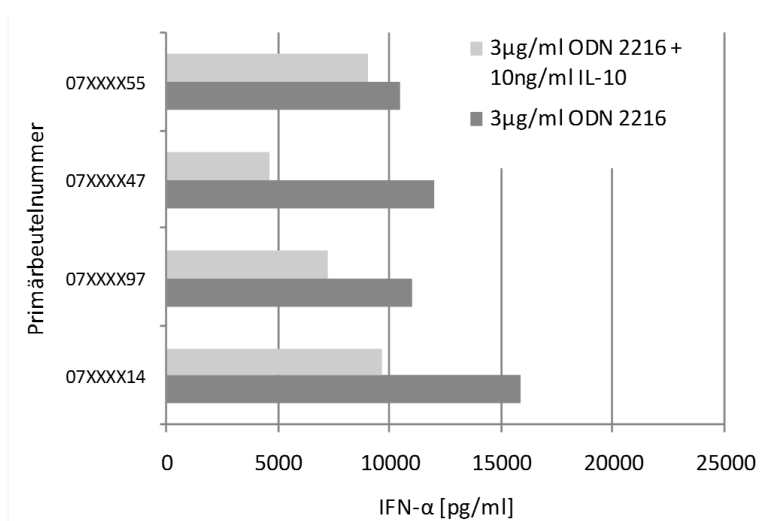
Der Effekt von Interleukin-10 auf die CpG induzierte IFN- $\alpha$  Sekretion ist konzentrationsabhängig (Abbildung 12). Die maximale Wirkung wird bei einer Konzentration von 10ng/ml erreicht ( $p=0,008$ ). Bei einer Konzentration von 1ng/ml lässt sich der mindernde Effekt durch eine Dosissteigerung und eine längere Inkubationsdauer des ODN 2216 noch reduzieren. Bei einer Konzentration von 10ng/ml IL-10 trifft das dann nicht mehr zu und der Unterschied zwischen der Zugabe von 3 $\mu$ g/ml und 6 $\mu$ g/ml ODN 2216 ist geringer. Bei einer ODN Konzentration von 3 $\mu$ g/ml ist der Effekt von 1ng/ml IL-10 bereits größer als bei 6 $\mu$ g/ml ( $p=0,016$ ). Die Menge an ausgeschüttetem Zytokin als Antwort auf die CpG Stimulation verändert sich unter 10ng/ml IL-10 nur noch gering. Insgesamt hat eine weitere Steigerung der IL-10 Konzentration auf 100ng/ml keinen zusätzlichen ( $p=0,822$ ) Effekt auf die sekretierte Menge an IFN- $\alpha$ .



**Abbildung 12: Einfluss der IL-10 Konzentration auf die CpG ODN 2216 induzierte IFN- $\alpha$  Sekretion**

50 000 pDCs der gleichen Spender wurden mit 1ng/ml, 10ng/ml und 100ng/ml IL-10 plus 3 $\mu$ g/ml bzw. 6 $\mu$ g/ml ODN 2216 für 24h und 48h inkubiert. Das zeigte, dass der Effekt von IL-10 konzentrationsabhängig ist – konzentrationsabhängig vom IL-10 und auch von der Menge an CpG als Stimulus der IFN- $\alpha$  Sekretion. Die maximale Wirkung des Interleukins ist bei Stimulation mit 6 $\mu$ g/ml ODN 2216 bei einer Konzentration von 10ng/ml erreicht. Hingegen zeigt sich bei Stimulation mit 3 $\mu$ g/ml bereits zwischen 1ng/ml und 10ng/ml IL-10 kein großer Unterschied. Bei einer Konzentration von 1ng/ml lässt sich der verminderte Effekt durch eine Dosissteigerung und eine längere Inkubationsdauer des ODN 2216 noch vermindern. Bei 10ng/ml IL-10 trifft das dann nicht mehr zu. Der maximale Effekt von IL-10 auf die IFN- $\alpha$  Sekretion liegt bei einer Konzentration von 10ng/ml. Eine weitere Steigerung der IL-10 Zugabe auf 100ng/ml zeigt keinen größeren Effekt. Positivkontrolle siehe Abbildung 11 A. Gezeigt sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen  $\pm$  SEM aus  $n=4$ . \* signifikant † nicht signifikant

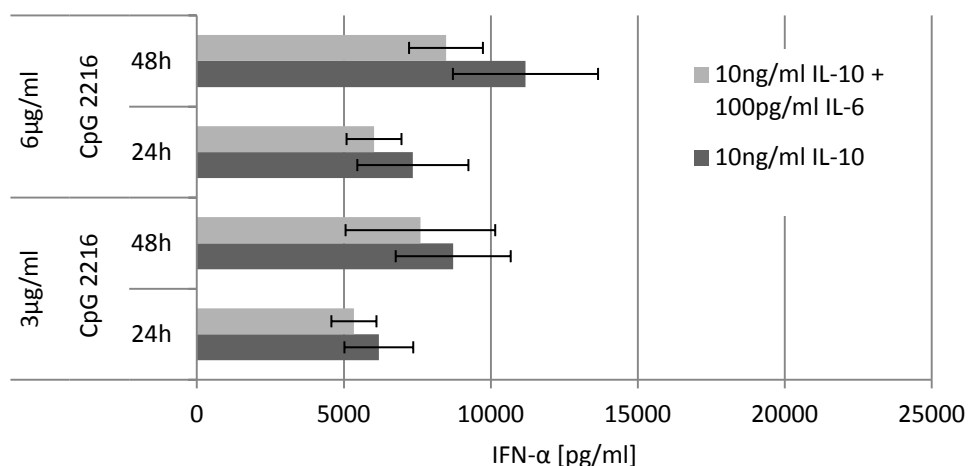
Bei weiteren Untersuchungen fiel die in Abbildung 13 dargestellte große Schwankungsbreite der Verminderung der IFN- $\alpha$  Sekretion nach Zugabe von IL-10 auf. Die vier im Einzelnen untersuchten Spender-pDC Populationen zeigten eine Schwankungsbreite von ca. 45%. Die Verminderung der IFN- $\alpha$  Sekretion betrug im Vergleich mit der jeweiligen Positivkontrolle in den vier Fällen 14%, 62%, 52% und 39%.



**Abbildung 13: Wirkung von IL-10 auf die CpG ODN 2216 induzierte IFN- $\alpha$  Sekretion gesunder Spender-pDCs**

pDCs gesunder Spender wurden mit dem typischen Klasse A CpG ODN 2216 und IL-10 in einer Konzentration von 3  $\mu\text{g/ml}$  bzw. 10 ng/ml für 48h inkubiert. Als jeweilige Positivkontrolle wurden Zellen der gleichen Population nur mit dem ODN 2216 inkubiert. Die IL-10 induzierte Verminderung der IFN- $\alpha$  Sekretion schwankte je nach pDC Population zwischen 14% und 62%.

Desweiteren wurde in Kombinationsuntersuchungen mit Interleukin-10 und IL-6 bzw. IL-8 ein stärkerer Effekt der IL-10 Wirkung unter Zugabe von IL-6 beobachtet (Abbildung 14). Die Kombination mit IL-8 zeigte hingegen diesen Effekt nicht (Daten nicht gezeigt). Die aus der Kombination dieser zwei Zytokine bewirkte zusätzliche Verminderung der CpG ODN 2216 induzierten IFN- $\alpha$  Sekretion im Vergleich zu IL-10 alleine betrug im Mittel 13%.



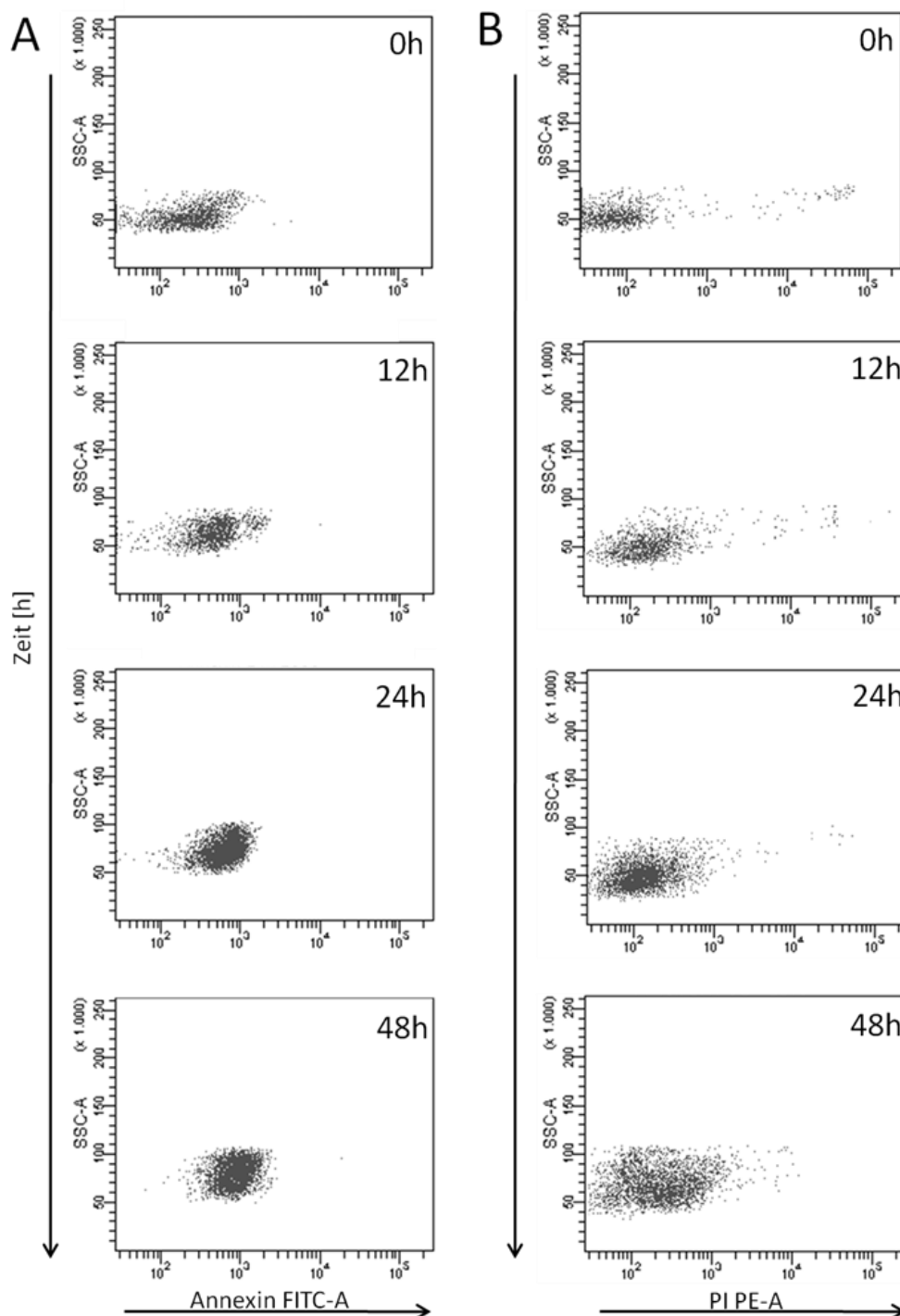
**Abbildung 14: Synergistischer Effekt von IL-10 und IL-6 bezüglich der Verminderung der CpG ODN 2216 induzierten IFN- $\alpha$  Sekretion**

pDCs wurden in Kombination mit IL-10 (1ng/ml) und IL-6 (100pg/ml), sowie dem Stimulus ODN 2216 für 24h bzw. 48h inkubiert. Als Positivkontrolle wurden pDCs derselben Spender mit CpG ODN 2216 und IL-10 inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die im Zellkulturüberstand vorhandene Konzentration mit dem ELISA Verfahren bestimmt. Es zeigt sich ein synergistischer Effekt von im Mittel 13% unter Kombination der beiden Interleukine im Vergleich zur Reduktion des IFN- $\alpha$  unter IL-10 alleine. Gezeigt sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen  $\pm$  SEM aus n=3.

### 3.2.5 Apoptose und Zelltod von pDCs unter dem Einfluss von HNSCC, Interleukin-6, IL-8, IL-10 und CpG ODN

Um auszuschließen, dass die Reduktion und Veränderungen der Funktionalität bezüglich der IFN- $\alpha$  Sekretion von pDCs durch Apoptose und Zelltod bedingt ist, wurde dies mittels FACS Analyse untersucht.

Die eingesetzten Konzentrationen der getesteten Substanzen orientierten sich hierbei an den in den Versuchen verwendeten Mengen.



**Abbildung 15: Exemplarische Darstellung der Apoptose- und Zelltoduntersuchung von pDCs unter verschiedenen Inkubationsbedingungen anhand der Versuchsreihe mit BHY Tumorüberstand im Durchflusszytometer**

pDCs wurde über einen Zeitraum von 48h inkubiert und die Zahl apoptotischer Zellen mittels Annexin V-FITC Färbung im FACS bestimmt (A). Im Vergleich zur Kontrolle (pDCs in DMEM/xVIVO) war der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen nach Zugabe von Tumorzellen, Tumorüberstand, IL-6, IL-8, IL-10 oder die unterschiedlichen CpG ODN, sowie in Kombination etwa gleich. B: Gleiches gilt für die Detektion toter Zellen. Auch hier konnte keine Zunahme toter Zellen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Die Zunahme apoptotischer bzw. toter Zellen war unter allen Bedingungen ähnlich, so dass eindeutig die Dauer der Inkubation, also die Zeit einen Einfluss auf die Vitalität der pDCs hat.

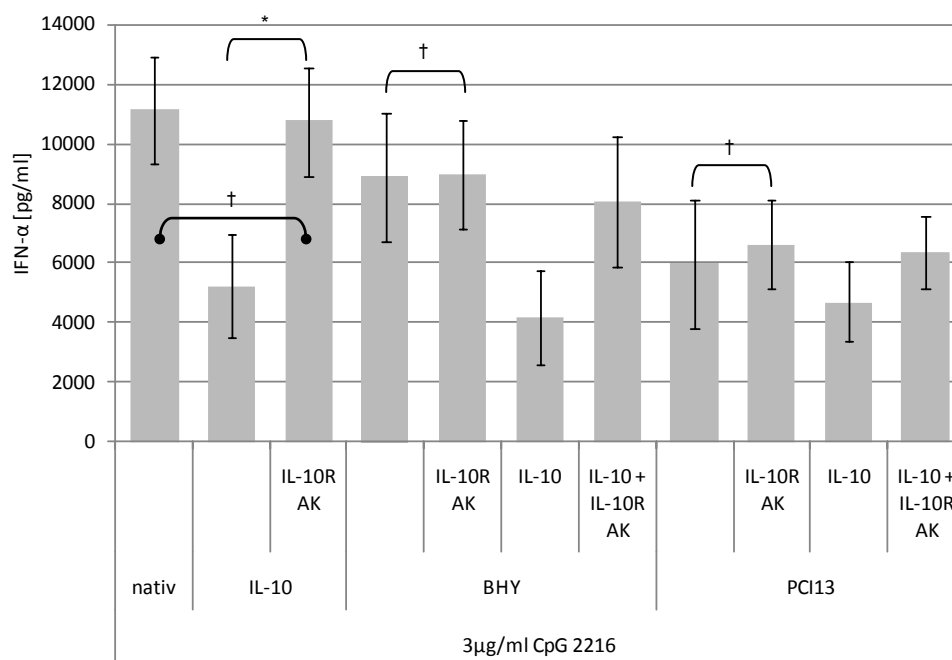
Die auf diese Weise untersuchten pDC Zellkulturen zeigten eine Zunahme der Apoptose pro Zeit, aber es ließ sich hierbei kein Zusammenhang zwischen Inkubationszusatz, seien es Tumorzellen, Tumorüberstand, IL-6, IL-8, IL-10 oder die unterschiedlichen CpG ODN einzeln oder in Kombination, und der Zunahme der Annexin V Fluoreszenz erkennen. Eine exemplarische Darstellung der Daten zeigt die Inkubation von pDCs mit BHY Tumorüberstand (Abbildung 15).

Das gleiche zeigte sich in den FACS Messungen mit dem PI Antikörper. Unter jeder Inkubationsbedingung nahm der Anteil PI Fluoreszierender Zellen pro Zeit zu, ohne sichtbaren Unterschied zwischen den einzelnen untersuchten Zellkulturzusätzen. Lediglich die schon beschriebene *in vitro* Lebenszeitverlängerung von pDCs unter Inkubation mit CpG ODN 2006 konnte reproduziert werden und zeigte sich in einer geringeren PI Fluoreszenz zum Zeitpunkt 48h im Vergleich etwa zu CpG ODN 2216 [1]. Eine Toxizität seitens IL-10 wie sie in der Literatur beschrieben wird, konnte in den hier untersuchten Konzentrationen nicht beobachtet werden [148].

### 3.2.6 Der Einfluss des Interleukin-10-Rezeptor Antikörpers auf die CpG ODN 2216 induzierte IFN- $\alpha$ Sekretion von pDCs unter dem Einfluss von HNSCC und IL-10

Die Überlegung liegt nahe, dass wenn IL-10 die CpG induzierte IFN- $\alpha$  Sekretion vermindert (Abbildung 12), der Effekt mit einem IL-10-Rezeptor (IL-10R)-Antikörper antagonisierbar sein müsste. IL-10 ist im HNSCC Zellkulturüberstand nur in geringen Mengen messbar. Trotzdem ist eine Verminderung der IFN- $\alpha$  Sekretion unter dem Einfluss von HNSCC Kulturüberstand zu beobachten (Abbildung 8). Es konnte ein synergistischer Effekt von IL-6 und IL-10 gezeigt werden (Abbildung 14). IL-6 ist in größeren Konzentrationen im Tumormilieu vertreten, IL-10 nur in geringen Mengen [135].

Zur Untersuchung der Hypothese wurden  $5 \times 10^4$  pDCs mit Tumorüberstand und/oder IL-10 inkubiert. Zusätzlich wurde dem Zellkulturmedium gegebenenfalls der IL-10R Antikörper zugesetzt. Die Zellen wurden dann für 24h inkubiert. Ein Mediumwechsel oder eine erneute Zugabe des ODN, des Interleukins bzw. des Antikörpers fand nicht statt. Nach Ablauf der zu untersuchenden Zeit wurde die IFN- $\alpha$  Konzentration mittels ELISA Verfahren bestimmt. Als Negativkontrolle wurden Zellen nur mit Medium und IL-10 inkubiert (Daten nicht gezeigt). Als Positivkontrolle zu Vergleichszwecken wurden pDCs ohne HNSCC und IL-10 mit CpG ODN 2216 inkubiert.



**Abbildung 16: Wirkung des IL-10R AK auf die CpG induzierte IFN- $\alpha$  Sekretion unter HNSCC Einfluss**

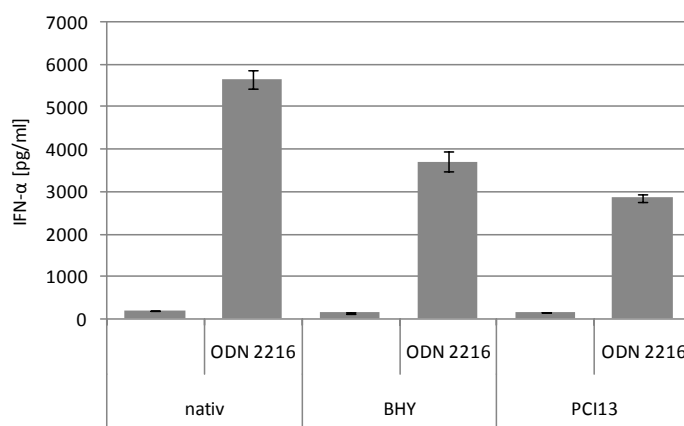
Zur Untersuchung der Wirkung des IL-10R AK auf die durch HNSCC verminderten CpG ODN induzierte IFN- $\alpha$  Sekretion wurden pDCs mit Tumorüberstand und/oder IL-10 sowie 3 $\mu$ g/ml ODN 2216 für 24h inkubiert. Der IL-10R Antikörper wurde in einer Konzentration von 2,5 $\mu$ g/ml zeitgleich zugegeben. Bei Zugabe des IL-10R AK kann der hemmende Effekt des IL-10 auf die IFN- $\alpha$  Sekretion von pDCs vollkommen blockiert werden ( $p=0,012$ ). Es zeigt sich kein Unterschied mehr zur Stimulation der pDCs ohne IL-10 ( $p=0,78$ ). Gibt man den IL-10R AK zu den pDCs inkubiert mit HNSCC Zellkulturüberstand, kann jedoch keine Erholung der IFN- $\alpha$  Sekretion erreicht werden. Wird dem HNSCC Medium zusätzlich IL-10 zugesetzt, so ist eine weitere Verminderung der IFN- $\alpha$  Sekretion die Folge. Auch in dem Fall erreicht eine IL-10R AK Zugabe keine vollständige Aufhebung der blockierten Sekretion, sondern die Konzentration erreicht in etwa den Wert der Vergleichsbedingung HNSCC und HNSCC + IL-10R AK ( $p=0,95$  bzw.  $p=0,74$ ). Gezeigt sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen  $\pm$  SEM aus  $n=4$ . \* signifikant † nicht signifikant

Wie in Abbildung 16 zu sehen, kann durch eine Zugabe des IL-10R AK keine vollständige Aufhebung des die IFN- $\alpha$  Sekretion von pDCs blockierenden Effektes von HNSCC erreicht werden. pDCs inkubiert mit IL-10 erlangen jedoch nach Zugabe des Rezeptorblockers ihr vollständiges Sekretionsvermögen wieder. Wird dem HNSCC Medium zusätzlich IL-10 zugesetzt, so wird die hemmende Wirkung noch verstärkt. Gibt man in dem Fall wieder IL-10R AK dazu, wird nur der Effekt des IL-10 auf die IFN- $\alpha$  Sekretion aufgehoben und keine vollständige Funktionalität erreicht. Der Effekt der zusätzlichen IL-10 Zugabe zum HNSCC Medium und der Blockade durch den IL-10R AK ist stärker bei BHY ausgeprägt als bei PCI13.

Daraus kann geschlossen werden, dass im HNSCC Milieu weitere lösliche Faktoren vorhanden sein müssen, die die Funktionalität der pDCs seitens der IFN- $\alpha$  Sekretion zu hemmen vermögen.

### 3.3 IFN- $\alpha$ Sekretion von pDCs in Kultur mit PBMCs

Plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) gehören zu der großen Gruppe der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs), wie auch Lymphozyten und Monozyten. In der Einleitung wurde bereits beschrieben, wie eng verbunden die Zellen in ihrer Funktion untereinander sind. pDCs können u.a. auf die Funktion von T-Zelle und B-Zellen Einfluss nehmen und umgekehrt können andere Zellen Einfluss auf die Funktionen der pDCs nehmen. Im folgenden Experiment sollte nun die IFN- $\alpha$  Sekretion der pDCs in Kultur mit PBMCs untersucht werden. Hierzu wurden  $1 \times 10^6$  PBMCs mit  $5 \times 10^4$  pDCs angereichert und unter Zugabe von  $3 \mu\text{g/ml}$  CpG ODN 2216 und ODN 2216 + HNSCC für 48 Stunden inkubiert. Der Zellkulturüberstand wurde dann mittels ELISA Verfahren auf IFN- $\alpha$  untersucht.



**Abbildung 17: IFN- $\alpha$  Sekretion von pDCs in Kultur mit PBMCs**

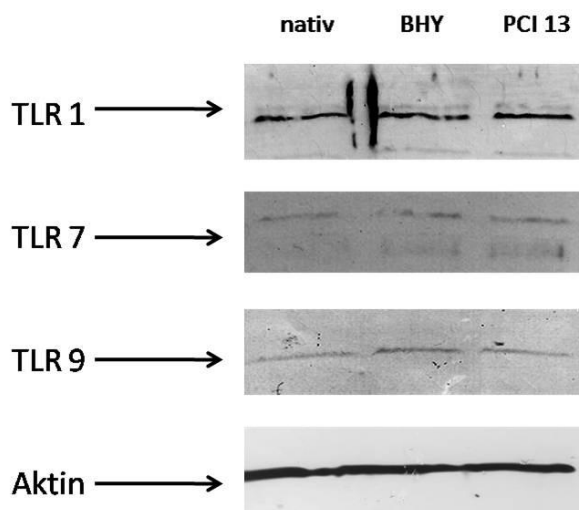
Mit  $5 \times 10^4$  pDCs angereicherte PBMCs ( $1 \times 10^6$  Zellen) wurden für 48h mit  $3 \mu\text{g/ml}$  ODN 2216 + HNSCC inkubiert. Als Negativkontrolle wurden PBMCs nur mit Medium, als Positivkontrolle mit CpG ODN 2216 inkubiert. Wie in der pDC Reinkultur wird die IFN- $\alpha$  Sekretion der pDCs in Kultur mit PBMCs durch HNSCC gemindert, stärker durch PCI13 als durch BHY. Gezeigt sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen  $\pm$  SEM aus  $n=6$ .

pDCs in Kultur mit PBMCs verhalten sich mit Blick auf ihre IFN- $\alpha$  Sekretion wie die pDCs in Reinkultur. Auch hier wird sie durch den Einfluss von HNSCC gemindert - auch hier stärker von PCI13 als von BHY. Die Gesamtkonzentration an IFN- $\alpha$  liegt unter diesen Bedingungen etwa dreimal höher als in der reinen pDC Kultur bei etwa gleicher Anzahl pDCs ( $5 \times 10^4$  Zellen) (850pg/well  $\leftrightarrow$  2800pg/well). Allerdings gehören zu der Gruppe der PBMCs auch andere Zellen die IFN- $\alpha$  produzieren können [47].

### 3.4 Expression der *Toll-like* Rezeptoren TLR1, TLR7 und TLR9 unter dem Einfluss von HNSCC und CpG ODN

pDCs exprimieren außer dem für die CpG ODN Erkennung essentiellen TLR9 noch weitere sogenannte *Toll-like* Rezeptoren, vor allem TLR1 und TLR7 [1]. TLR9 ist der für die CpG ODN Erkennung essentielle Rezeptor. TLR7 kann ebenfalls unter anderem die IFN- $\alpha$  Sekretion in Zellen induzieren. Bisher bekannte synthetische Liganden für TLR7 sind Imidazoquinoline, BCR, R837 und Loxoribine [163-164]. Für *Toll-like* Rezeptor 9 existiert ein Rückkopplungsmechanismus auf genetischer Ebene [165].

Humane B-Zellen und plasmazytoide dendritische Zellen sind die einzigen bekannten Zellen die TLR7 und TLR9 zusammen exprimieren. Plasmazytoide dendritische Zellen sind die primären IFN- $\alpha$  produzierenden Zellen als Antwort auf die Ligation von TLR7 und TLR9 Agonisten [166].



**Abbildung 18: Expression von TLR1, TLR7 und TLR9 nach Inkubation mit HNSCC Kulturüberstand im Westernblot**

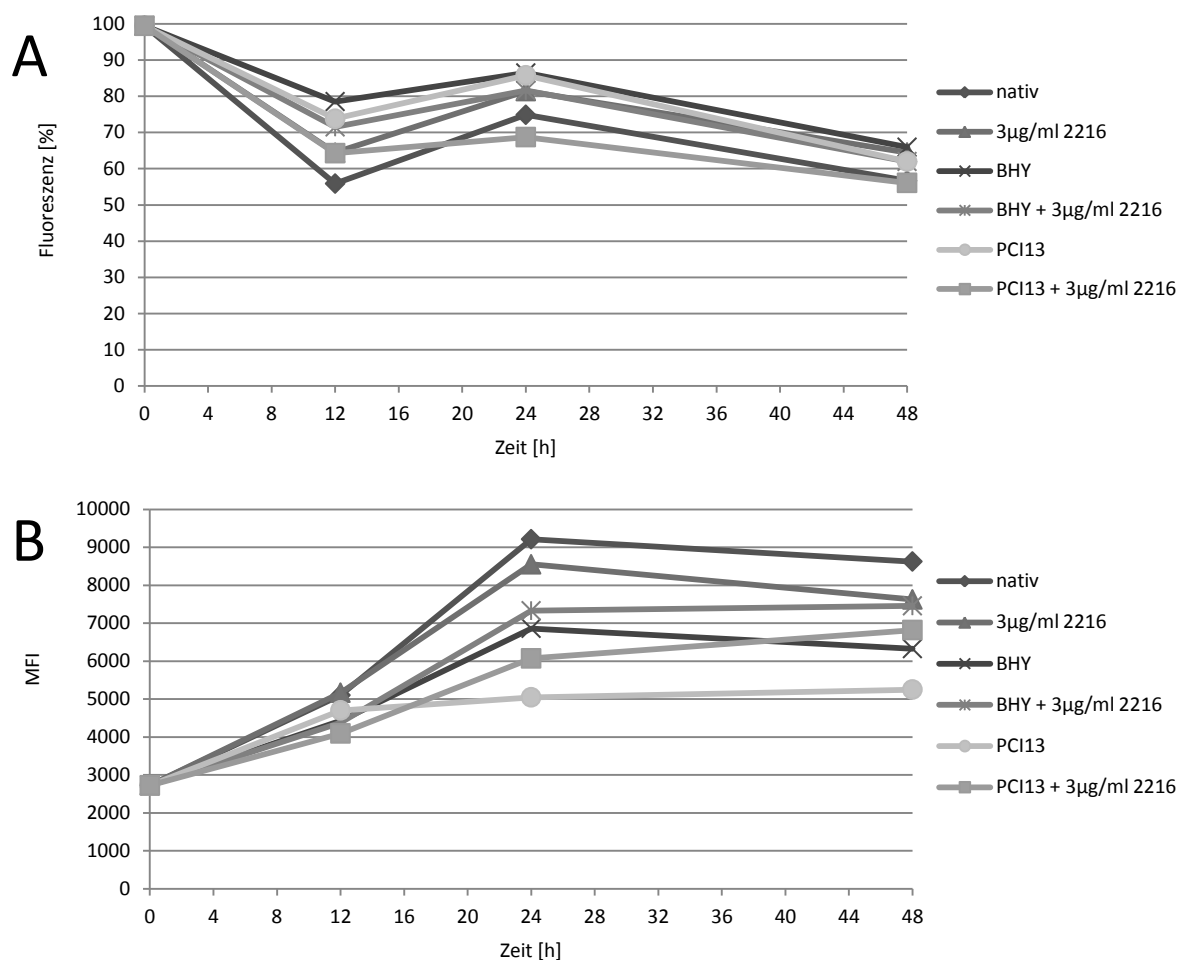
Proteine von pDCs, isoliert aus Lymphophoresepräparaten, wurden nach 12 stündiger Inkubation mit HNSCC Tumorüberstand extrahiert. Die Rezeptorproteine wurden dann nach dem Verfahren der Westernhybridisierung dargestellt. Es konnte keine Veränderung in der Expression der *Toll-like* Rezeptoren 1, 7 und 9 festgestellt werden.

Um die benötigte Mindestproteinmenge für eine Westernhybridisierung zu erreichen wurden die pDCs in diesem Fall nicht aus Vollblut, sondern aus Lymphophoresepräparaten per magnetischer Zellsortierung gewonnen. Die pDCs wurden dann mit Tumorüberstand für 24h inkubiert und die Proteine extrahiert. Mit diesem Verfahren konnte keine Veränderung in der Expression der *Toll-like* Rezeptoren 1, 7 und 9 festgestellt werden. Da aber eine Veränderung vor allem des TLR9 unter HNSCC Einfluss diskutiert wird, wurde zur genaueren Untersuchung der Rezeptorexpression im Weiteren mit der Durchflusszytometrie gearbeitet.

Zur Auswertung und Beurteilung der antikörpermarkierten Zellen in der Durchflusszytometrie wurden zwei Angaben der BD FACSDiva™ Software herangezogen. Die Expressionslevel können über die Angabe des prozentualen Anteils positiver Zellen für ein bestimmtes Antigen an der Gesamtpopulation oder über die geometrische mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) gezeigt werden. Die Auswertung der MFI ist ein Maß für die Anzahl der gebundenen, fluorchrommarkierten monoklonalen Antikörper, die proportional zu der Anzahl der erkannten Oberflächenmoleküle ist. Diese erlaubt, im Vergleich zu den Werten der Kontrolle, Aussagen über die Expressionsstärke der untersuchten Oberflächen-

moleküle pro Zelle. Die verschiedenen Auswertungsstrategien können hilfreich sein, wenn ein Rezeptor, wie z.B. der TLR9, konsekutiv von allen pDCs exprimiert wird und in dem Fall dann die Expressionszunahme pro Zelle analysiert wird.

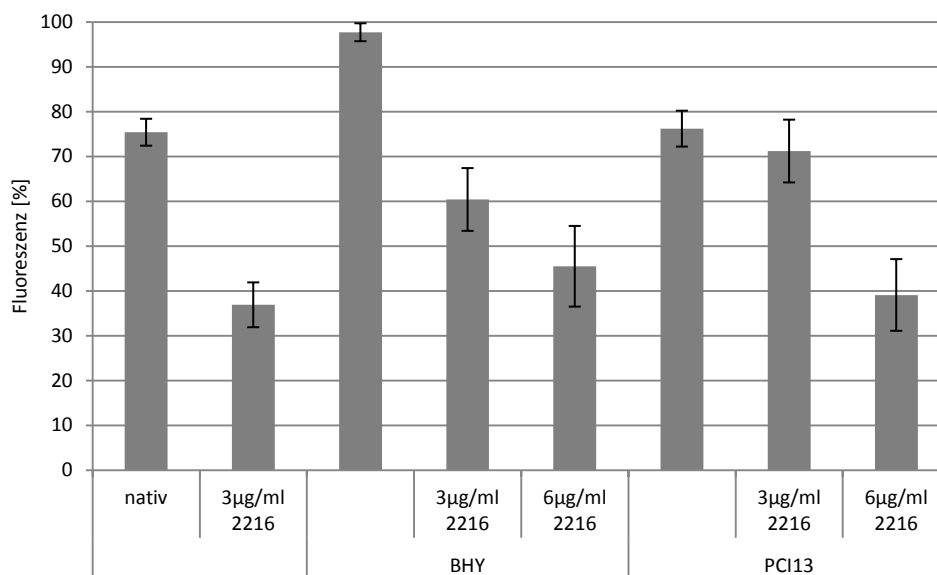
Betrachtet man die MFI der fluoreszenzmarkierten TLR9 Rezeptoren auf pDCs (Abbildung 19B) so ist die Rezeptorexpression insgesamt unter allen Inkubationsbedingungen niedriger als in der Nativkontrolle. Zwar steigen die MFI Werte unter allen Bedingungen innerhalb von 24h an, jedoch bewegen sie sich unterhalb der MFI der Negativkontrolle (nur Medium). Die Untersuchung zeigte somit interessanterweise eine geringere Dichte auch unter Zugabe des stimulierenden Liganden ODN 2216. Diese reaktive Herabregulierung konnte ebenfalls auf mRNA Ebene gezeigt werden <sup>[41]</sup>. Die MFI der Inkubationen mit ODN 2216 liegt nach 24h 8%, die der Inkubation mit HNSCC 26% (BHY) ( $p=0,012$ ) bzw. 45% (PCI13) ( $p=0,025$ ) unterhalb der MFI der Negativkontrolle. Der Zusatz von ODN 2216 zu den pDCs mit HNSCC bewirkt eine Zunahme des TLR9 Rezeptors. Der Anteil der fluoreszenzpositiven pDCs an der gemessenen Gesamtpopulation (Abbildung 19A) nimmt im Trend unter allen Inkubationsbedingungen insgesamt über 48h stetig ab. Am gemessenen Endpunkt 48h beträgt der Anteil unter allen Bedingungen zwischen 56% und 65%.



**Abbildung 19: TLR9 Expression unter dem Einfluss von HNSCC und CpG ODN 2216**

TLR9 ist der Rezeptor zur Erkennung von CpG Motiven. Zur Untersuchung seiner Expression und eventueller Alterationen durch HNSCC wurden die pDCs mit Tumorüberstand und Tumorüberstand plus CpG 2216 für 12h/24h/48h inkubiert, mit einem FITC konjugierten Anti-TLR 9 Antikörper markiert und anschließend im Durchflusszytometer gemessen. **A** zeigt den prozentualen Anteil an rezeptorpositiven, fluoreszierenden Zellen, **B** die Veränderung der MFI. Insgesamt lässt sich eher ein einheitlicher Trend in der Änderung des Anteils rezeptorpositiver Zellen erkennen, als ein durch die Inkubation bedingter. Die MFI zeigt eine grundsätzlich erhöhte Rezeptordichte auf pDCs der Negativkontrolle (nur Medium) im Vergleich zu den Zellen mit ODN 2216 und HNSCC. Interessant ist hierbei, dass die Zugabe von ODN 2216 zu einer Abnahme der Rezeptordichte führt ( $p=0,017$ ). Gezeigt sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen aus  $n=5$ .

Auch die Anzahl der pDCs positiv für *Toll-like* Rezeptor 7 nimmt unter Einfluss von CpG ODN 2216 ab, um etwa 50% ( $p=0,035$ ). Dies geschieht auch unter zusätzlichem Einfluss von HNSCC, wenn auch in geringerem Ausmaß. Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig. Unter Einfluss von BHY wird die Expression von TLR7 hochreguliert ( $p=0,021$ ), unter PCI13 bleibt sie in etwa gleich der Negativkontrolle (Abbildung 20).



**Abbildung 20: TLR7 Expression unter dem Einfluss von HNSCC und CpG ODN 2216**

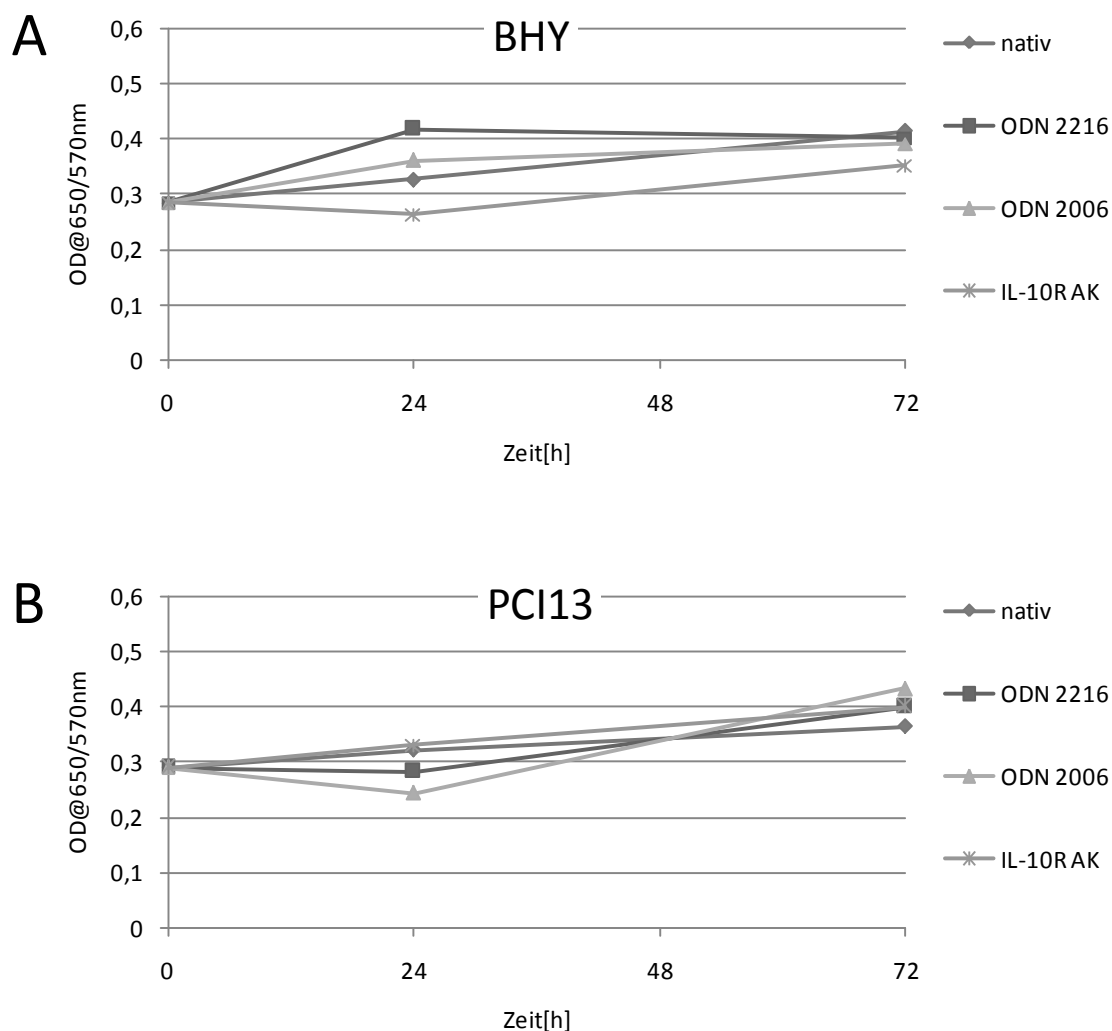
pDCs wurden mit CpG ODN 2216 und HNSCC für 48h inkubiert. Die Zellen wurden dann mit einem primären TLR7 Antikörper und sekundär mit einem FITC-konjugierten Anti-*rabbit* Antikörper markiert und die Expression mittels Durchflusszytometrie gemessen. Unter Einfluss von CpG ODN 2216 kommt es zu einer Runterregulierung der TLR7 Expression im Vergleich zu der Negativkontrolle (nur Medium). Unter Inkubation mit BHY steigt die Anzahl der für TLR7 positiv gemessenen Zellen, unter PCI13 ist sie etwa gleich der Negativkontrolle. Unter Zusatz von ODN 2216 kommt es auch hier zu einer Abnahme der positiven Zellen. Dieser Effekt ist größer bei höherer ODN Konzentration. Gezeigt sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen  $\pm$  SEM aus  $n=5$ .

### 3.5 Der Einfluss von CpG ODN Motiven und dem IL-10-Rezeptor Antikörper auf die Proliferation von HNSCC

Natürlich ist es von enormer Wichtigkeit in Hinsicht auf die Untersuchung der Wirkung bestimmter Substanzen auf Immunzellen, in diesem Fall pDCs, im Zusammenspiel mit Tumorzellen auch die Wirkung dieser Substanzen auf die Tumorzellen, in diesem Fall HNSCC, zu untersuchen. Um auszuschließen, dass CPG ODN und der IL-10-Rezeptor Antikörper auf HNSCC Zellen wachstumsstimulierend wirken, wurde dieses genauer untersucht.

BHY und PCI13 Zellen wurden zu 2500 Zellen/Well bzw. 5000 Zellen/Well in 96-well *flat-bottom* Platten inkubiert. Dem Medium wurde ggf. 3µg/ml CpG 2216, CpG 2006, oder 2,5µg/ml IL-10R AK zugesetzt und die HNSCC Zellen damit inkubiert. Nach 24h, 48h und 72h wurde das Wachstumsverhalten mittels MTT quantifiziert. Zellen inkubiert in Medium ohne Zusätze - nativ - galten als Negativkontrolle.

Es konnte festgestellt werden, dass das Klasse A CpG ODN 2216 und das Klasse B CpG ODN 2006 keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von den HNSCC Zelllinien PCI13 und BHY haben. Es wird weder eine Proliferation noch eine Wachstumshemmung induziert.



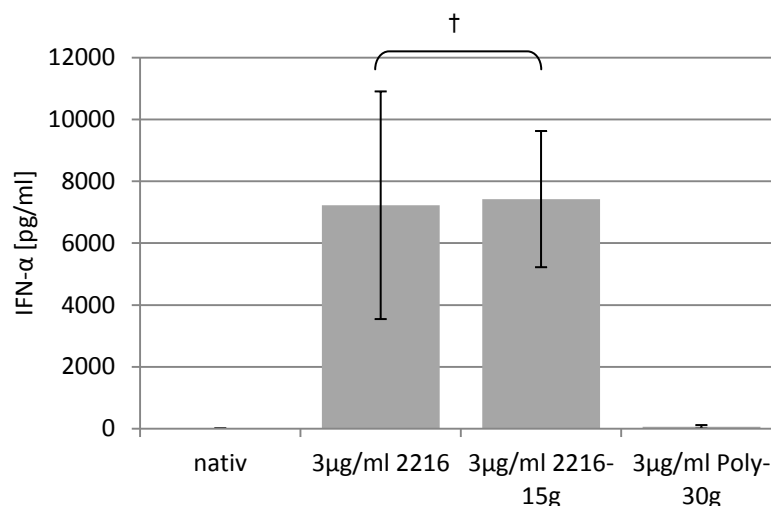
**Abbildung 21: Wachstumsverhalten von HNSCC Zelllinien unter Einfluss des IL-10R Antikörpers und den CpG ODN 2216 und 2006**

HNSCC wurden jeweils in 96 *well flat bottom* Mikrotiterplatten mit 2,5µg/ml IL-10R AK oder 6µg/ml der CpG ODN 2216 und 2006 für 24h bzw. 72h inkubiert. **A** zeigt die HNSCC Zelllinie BHY, **B** PCI13. Es kann kein Einfluss seitens der CpG ODN und des IL-10R AK auf die Zellproliferation beobachtet werden ( $p > 0,05$ ). Gezeigt sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen aus  $n=4$ .

### 3.6 Der Einfluss von Phosphothioat-Modifizierungen und Poly-Guanosin Verlängerung am 3'Ende von CpG ODN auf die IFN- $\alpha$ Sekretion und Differenzierung der pDCs

#### 3.6.1 Funktionsanalyse der IFN- $\alpha$ Induktion nach Modifikation der CpG ODN Sequenz

Als Positivkontrolle für den Effekt der IFN- $\alpha$  Induktion wurden das CpG ODN 2216 eingesetzt. Als Negativkontrollen wurde das ODN tetraCH2 und native, unstimulierte plasmazytoide Zellen verwendet. Die Oligodesoxynukleotide kamen sowohl als unmodifizierte, als auch als PTO- und Poly-G-modifizierte Sequenzen zum Einsatz.

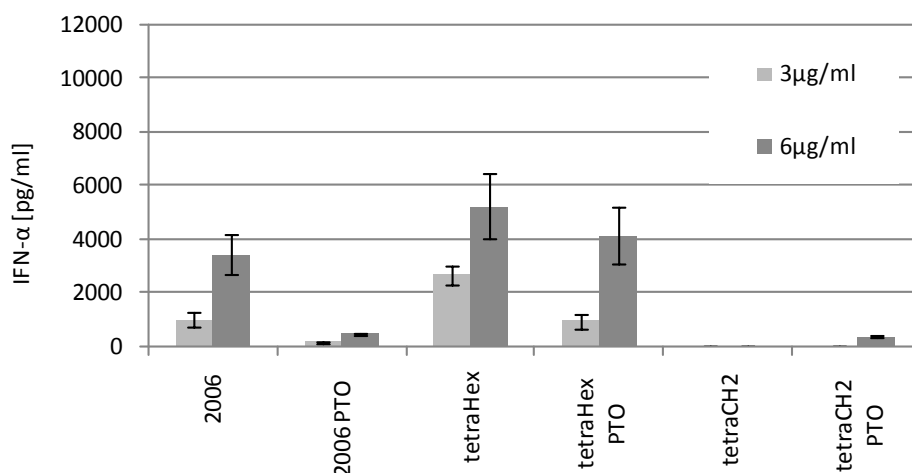


**Abbildung 22: Auswirkungen der Poly-G-Modifizierung auf die IFN- $\alpha$  Sekretion von pDCs**

pDCs der gleichen Spender wurden mit 3µg/ml des ODN 2216, sowie der Poly-G-modifizierten Sequenzen für 24h inkubiert. Die Modifikation am 3' Ende wirkt sich nicht auf die stimulatorische Potenz der CpG Motive aus. So besteht kein signifikanter \* Unterschied zwischen dem bekannten Typ A CpG 2216 und der um 15 G-Positionen verlängerten Variante 2216-15g ( $p=0,937$ ). Die ebenfalls getestete Sequenz Poly-30g bestehend aus 30 Guanodin Positionen ohne CpG Motiv zeigt keine stimulatorische Aktivität. Gezeigt sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen  $\pm$  SEM aus  $n=3$ . † nicht signifikant

Die Verlängerung der typischen Klasse A ODN 2216 Sequenz um 15 Guanodin Positionen am 3'Ende hat keine Auswirkungen auf die stimulatorische Aktivität von dem CpG Motiv und zeigt weder eine Steigerung noch eine Verminderung der induzierten IFN- $\alpha$  Sekretion ( $p=0,937$ ). Die Sequenz Poly-g bestehend nur aus 30

Guanosin Positionen besitzt hinsichtlich der IFN- $\alpha$  Induktion keinerlei Potenzial (Abbildung 22).



**Abbildung 23: Auswirkungen der PTO-Modifikation auf die IFN- $\alpha$  Sekretion von pDCs**

pDCs der gleichen Spender wurden mit 3  $\mu\text{g/ml}$  bzw. 6  $\mu\text{g/ml}$  der unmodifizierten wie auch der PTO-erweiterten ODNs 2006, tetraHex und tetraCH2 für 24h inkubiert. Die Modifikation durch Phosphothioat zeigt bei den eingesetzten ODN keine zusätzliche Steigerung der IFN- $\alpha$  Sekretion, trotz der beschriebenen eigenen intrinsischen Aktivität <sup>[167-168]</sup>. Die induzierte IFN- $\alpha$  Sekretion zeigt sich vielmehr vermindert im Vergleich zu den unmodifizierten „wild-Typ“ ODN. Gezeigt sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen  $\pm$  SEM aus n=4.

Insgesamt wurde durch den Einsatz von unmodifizierten ODN eine höhere Induktion der IFN- $\alpha$  Produktion der Zellen erreicht, als durch Stimulation mit den PTO-modifizierten Sequenzen des CpG 2006 und tetraHex ( $p < 0,05$ ). Dass die PTO Modifizierung jedoch eine eigene stimulatorische Aktivität besitzt, zeigt sich am nonsens ODN tetraCH2. Dieses ODN ohne stimulatorische CpG Sequenz induziert als PTO Variante in einer Konzentration von 6  $\mu\text{g/ml}$  eine geringe IFN- $\alpha$  Sekretion ( $p = 0,002$ ) (Abbildung 23).

### 3.6.2 Expression von *Toll-like* Rezeptoren, Migrations- und Reifemarkern von pDCs nach Stimulation mit modifizierten CPG ODN Motiven

CpG ODN Motive besitzen nicht nur stimulatorische Eigenschaft bezüglich der IFN- $\alpha$  Sekretion, sondern auch mannigfaltige Wirkungen auf andere immunologische

Funktionen, sowie auf die Reifung von pDCs. Die Wirkungen der verschiedenen Klassen der CpG Motive unterscheiden sich <sup>[84, 88]</sup>.

In diesem Teil der Dissertation sollte untersucht werden, ob die in dieser Doktorarbeit verwendeten Modifizierungen der CpG ODN einen veränderten Einfluss auf die Migration, die Reife und die Expression der *Toll-like* Rezeptoren von pDCs besitzen. CXCR3 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3, auch CD183 oder G Protein-gekoppelter Rezeptor 9 (GPR9) genannt) ist ein Rezeptorprotein aus der Familie der Chemokinrezeptoren und der kardinale Chemokinrezeptor auf pDCs. Liganden dieses Rezeptors sind CXCL9 (*monokine induced by Interferon- $\gamma$* ), CXCL10 (*Interferon- $\gamma$  inducible protein of 10kDa*) und CXCL11 (*Interferon inducible T-cell  $\alpha$  chemoattractant*). Die Signaltransduktion verläuft über die Aktivierung einer intrazellulären Kaskade an der die Phosphoinositid 3-Kinase und die MAP-Kinase beteiligt sind. Sie bewirkt die Rekrutierung von pDCs als Antwort auf die Rezeptorstimulierung.

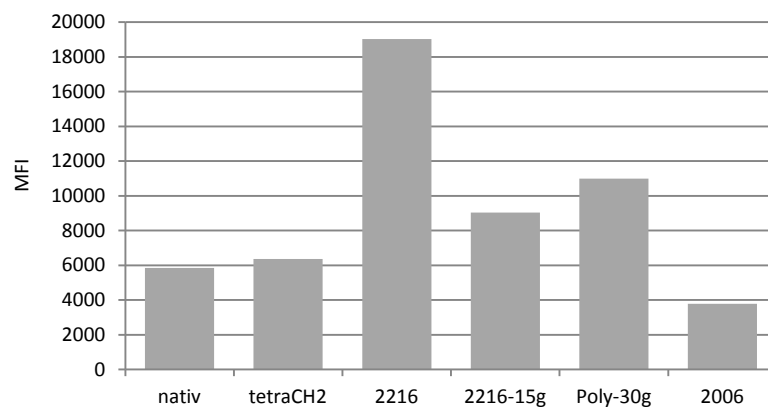
Die Expression von CCR7 ist ein Zeichen der DC-Reifung und die Interaktion von Chemokin (C-C Motiv) Ligand 19 (CCL19/ECL) und CCL21 ein wichtiger Bestandteil der Migration der DC zu regionalen Lymphknoten <sup>[169]</sup>. Die Bindung der Liganden bewirkt die direkte Wanderung der reifen DC zu den afferenten Lymphgefäßen oder in die parakortikale Region der Lymphknoten. Gebildet werden die Liganden in den Lymphgefäßen von spezialisierten säulenförmigen hohen Endothelzellen produziert, die sich in den Venulen der Lymphknoten befinden (*high endothelial venuels*) und von Zellen der T-Zell-Region <sup>[170]</sup>.

CD40 ist ein Mitglied der TNF-Rezeptor Superfamilie und ein kostimulatorisches Protein auf Antigen-präsentierenden Zellen und nötig für deren Aktivierung. CD80 auch bekannt als B7.1. bindet an CD28. CD80 und CD86 binden an CTLA-4, welches dann die T-Zell Antwort runterreguliert. CD86 ist auch bekannt als B7.2.

Die Stimulierung von pDCs löst eine Reihe von phänotypischen, morphologischen und funktionellen Veränderungen aus (siehe hierzu 1.3.1.1, S. 9). Es kommt zu einer erhöhten Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen, MHC-Klasse-II-Molekülen und den zur T-Zell-Aktivierung notwendigen Kostimulations- und Adhäsionsmolekülen (z.B. CD54, CD80, CD86 und CD40) auf der Zelloberfläche. Ausserdem wird die Expression des Homing-Faktors CCR7 induziert und die Expression anderer Chemokinrezeptoren (z.B. CCR6) vermindert. Verschiedene Zytokine werden sezerniert und das Zytoskeletts wird reorganisiert.

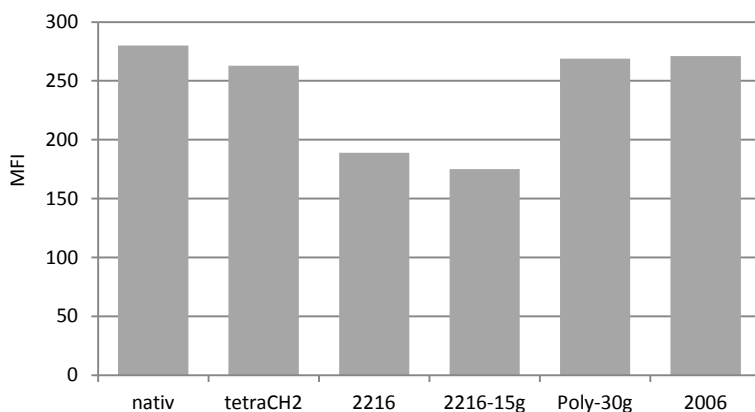
In Zellkultur kann dieser Reifungsprozess durch die Zugabe von TNF- $\alpha$ , CD40L, LPS, monozytenkonditioniertem Medium oder einem Gemisch aus IL-1 $\beta$ /IL-6/TNF- $\alpha$ /Prostaglandin E<sub>2</sub> ausgelöst werden [171-175].

Zur Untersuchung phänotypischer Veränderungen wurden pDCs mit den CpG Varianten inkubiert und die Expression der Rezeptoren im Durchflusszytometer gemessen. Als Positivkontrolle gilt die Inkubation mit ODN 2216, als Negativkontrolle die Inkubation der pDCs nur mit Medium bzw. mit dem nonsens ODN tetraCH2.



**Abbildung 24: Einfluss der CpG ODN Modifikation auf die Expression von CCR7**

pDCs wurden für 48h mit den unterschiedlichen ODN Sequenzen inkubiert und die Expression des CCR7 Rezeptors im Anschluss mit Hilfe eines PE-Cy7-konjugierten Antikörpers in der Durchflusszytometrie ermittelt. Es zeigt sich in Reaktion auf ODN 2216 eine Zunahme des CCR7 Rezeptors. Auch unter Einfluss von ODN 2216-15g und Poly-g nimmt die Dichte der CCR7 Rezeptoren auf pDCs zu, wenn auch in geringerem Maße. Gezeigt sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen aus n=2.



**Abbildung 25: Einfluss der CpG ODN Modifikation auf die Expression von CXCR3**

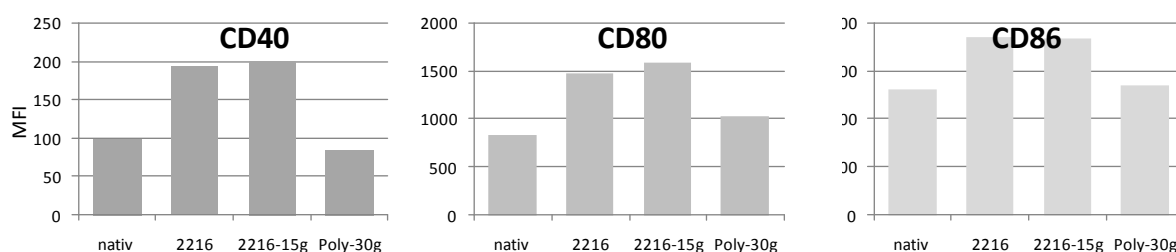
CXCR3 ist der Hauptchemokinrezeptor auf plasmazytoiden dendritischen Zellen. Die Inkubation von pDCs mit CpG ODN 2216 für 48h bewirkt eine Herabregulierung der Rezeptorexpression im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Modifikation der ODN 2216 Sequenz am 3'Ende hat keinen Einfluss auf die Expression von CXCR3. Die Inkubation mit Poly-g bewirkt keine Änderung der Expressionsstärke verglichen mit der Negativkontrolle. Gezeigt sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen aus n=2.

Bekannt ist, dass CXCR3 auf PBMCs unter Einfluss von HNSCC hochreguliert wird, welches jedoch mit einer verminderten Fähigkeit zur Chemotaxis einhergeht <sup>[176]</sup>. Ebenso führt die Inkubation von pDCs mit TLR9 Liganden in vivo zu einer in vitro verminderten Fähigkeit als Reaktion auf IFN-induzierte CXCR3 Liganden zu reagieren. Im Gegensatz dazu wird die Reaktion auf CCR7 Liganden verstärkt <sup>[177]</sup>. Verändert man die CpG ODN 2216 Sequenz indem man am 3'Ende Guanodin Positionen hinzufügt, so nimmt die Expression von CCR7 im Vergleich zur Negativkontrolle zu, aber deutlich geringer als bei Stimulation mit ODN 2216 (Abbildung 24). Die reine Aneinanderreihung von Guanodin-Positionen bewirkt ebenfalls eine Zunahme der CCR7 Expression. Die Expression unter Einfluss von ODN 2006 ist geringer im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 24).

Die Expression des CXCR3 Rezeptors auf pDCs in Stimulation mit ODN 2216 ist vermindert. Die Ergänzung der Sequenz am 3'Ende um 15 Guanodin Positionen hat den gleichen Effekt. Die Modifikation hat hier keinen zusätzlichen Einfluss auf die Rezeptorexpression (Abbildung 25).

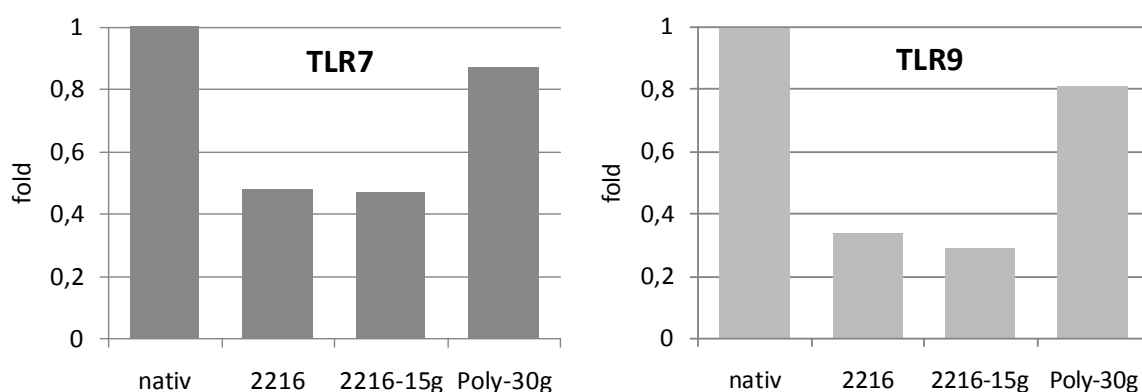
Es konnte ebenfalls kein zusätzlicher Einfluss auf die durch CpG ODN 2216 induzierte Zunahme des CD40, des CD80 und des CD86 Rezeptors aufgrund der zusätzlichen Guanodin Positionen beobachtet werden (Abbildung 26). Gleiches gilt für die unter ODN 2216 zu beobachtende Abnahme des TLR7 und des TLR9. Hier

kommt es jedoch unter Einfluss der reinen Guanosin-Sequenz Poly-30g ebenfalls zu einer Verminderung der Rezeptordichte (Abbildung 27).



**Abbildung 26: Einfluss der CpG ODN Modifikation auf die Expression von CD40, CD80 und CD86**

pDCs wurden mit 3µg/ml ODN für 48h inkubiert und die Expression der Rezeptoren CD40, CD80 und CD86 im Anschluss im Durchflusszytometer gemessen. Angegeben sind die Werte aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Dargestellt ist die Expression als MFI. Es konnte kein zusätzlicher Einfluss der Guanosin-Positionen auf die Veränderung des CD40, des CD80 und des CD86-Rezeptors festgestellt werden. Gezeigt sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen aus n=2.



**Abbildung 27: Einfluss der CpG ODN Modifikation auf die Expression von TLR7 und TLR9**

pDCs wurden mit 3µg/ml ODN für 48h inkubiert und die Expression der *Toll-like* Rezeptoren 7 und 9 im Anschluss im Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt ist die Expression als Vielfaches der Negativkontrolle (nativ). Die Expression beider Rezeptoren nimmt unter Einfluss von ODN 2216 ab. Dabei hat die Modifikation am 3'Ende der Sequenz keinen zusätzlichen Einfluss. Die Stimulierung mit der reinen Aneinanderreihung von Guanosin-Positionen hat eine Abnahme des TLR7 und des TLR9 zur Folge. Gezeigt sind die Mittelwerte der Doppelbestimmungen aus n=3.

## 4 Diskussion

Die Entdeckung und Entwicklung des Pocken-Impfstoffes vor über 200 Jahren war der Beginn der Immunologie als wissenschaftliche Disziplin <sup>[178]</sup>. Schon lange wird versucht auf verschiedenste Weisen das körpereigene Immunsystem in der Therapie von malignen Erkrankungen besser zu nutzen. Es konnte gezeigt werden, dass die Entstehung von anogenitalen Tumoren durch die Impfung mit Peptiden von humanen Papilloma-Viren (HPV), die die Entstehung dieser Tumore fördern, verhindert werden kann <sup>[179]</sup>. Es finden sich auf dem Gebiet der Therapie maligner Erkrankungen die unterschiedlichsten immuntherapeutischen Ansätze und Herangehensweisen (siehe hierzu 4.5, S.91). In der Bekämpfung von bestehenden Tumoren aber konnten bislang jedoch nur geringe Erfolge erzielt werden <sup>[180-181]</sup>.

Die in dieser Doktorarbeit durchgeführten Untersuchungen mit humanen plasmazytoiden dendritischen Zellen zeigen den Einfluss von CpG Oligonukleotiden und HNSCC auf die Sekretion des für diese Zellpopulation typischen und für die Aktivierung des Immunsystems in diesem Zusammenhang essentiellen TH1-Zytokins IFN- $\alpha$ .

### 4.1 Die CpG induzierte IFN- $\alpha$ Sekretion von pDCs ist zeit- und konzentrationsabhängig

CpG Motive bewirken als Ligand des TLR9 Rezeptors die Sekretion von IFN- $\alpha$  durch plasmazytoide dendritische Zellen. Je nach Sequenz/Klasse besitzen sie unterschiedliche Dynamiken. Zum Zeitpunkt der im Rahmen dieser Dissertation angefertigten Experimente war die Wirkung des ODN TetraHex auf pDCs noch nicht untersucht. Da es sich in der Grundsequenz um ein Klasse B ODN handelte, war zu vermuten, dass es auch ähnliche Eigenschaften aufweisen würde (siehe hierzu auch 1.4.1, S.15). Die angefügte, zusätzliche Sequenzmodifikation dient der verbesserten zellulären Aufnahme, hat aber, so scheint es, auch einen Einfluss auf die Funktionalität in Bezug auf die IFN- $\alpha$  Sekretion <sup>[151]</sup>. Die beiden letzteren genannten Sequenzen sind besonders durch ihre B-Zell-Aktivierung gekennzeichnet und weniger durch die Induktion der IFN- $\alpha$  Sekretion, welches auch den - auf die IFN- $\alpha$  Ausschüttung bezogen - funktionellen Unterschied erklären mag.

Vergleicht man das Klasse A ODN 2216 mit den untersuchten Klasse B ODN 2006 und tetraHex, so zeigt sich eine flachere und zeitlich verlängerte Kinetik des Sekretionsanstiegs, sowie insgesamt eine geringere Menge an ausgeschüttetem IFN- $\alpha$  (Abbildung 5, S.50). Das Klasse A CpG ODN 2216 erreicht seinen größten Sekretionsanstieg innerhalb der ersten 12 Stunden. Das Klasse B CpG ODN 2006 erst innerhalb von 24 Stunden. Gleiches gilt für das mit einer Sequenz zur besseren zellulären Aufnahme ergänzte ODN TetraHex.

Die Menge des CpG induzierten IFN- $\alpha$  ist abhängig von der Inkubationszeit und der zugegebenen Konzentration des ODN. Dies gilt für alle Klassen gleichermaßen. Im Vergleich der Literatur wird jedoch deutlich, dass die Angaben der Menge an sekretiertem IFN- $\alpha$  pro einzelner plasmazytoider dendritischer Zelle deutlich schwanken. In den eigenen Versuchen konnte eine Menge von maximal 0,22pg nach 48h in Stimulation mit einem CpG Klasse A erreicht werden. Guidicci et al. sprechen von ~0,4pg pro pDC und Hartmann et al. von ganzen 5pg/pDC <sup>[38, 91]</sup>. Verschiedene einflussnehmende Faktoren kommen als Erklärungsansatz für diese Variabilität in Frage.

#### 4.1.1 Faktoren die auf die CpG ODN induzierte IFN- $\alpha$ Sekretion von pDCs Einfluss nehmen

In allen Studien wurde stets Blut gesunder Spender verwendet, jedoch können trotzdem einige Einflussfaktoren nicht ausgeschlossen werden. Die Fähigkeit von pDCs IFN- $\alpha$  auszuschütten, ist während einer akuten Phase einer viralen Infektion erhöht und sinkt dann bei Genesung wieder ab <sup>[182]</sup>. Welchen Einfluss zum Beispiel die latente Infektion mit dem Zytomegalievirus hat, ist unklar. Erhöhte IFN- $\alpha$  Werte werden auch bei Patienten mit Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis und Vaskulitiden festgestellt <sup>[183]</sup>. Bei Diabetikern hingegen sind sie vermindert, ebenso bei Allergikern. Hier konnte zwar kein Unterschied in der TLR9 Expression im Allgemeinen gezeigt werden, allerdings produzierten pDCs allergischer Individuen sechsmal weniger IFN- $\alpha$  nach CpG Stimulation als die gesunder <sup>[184]</sup>. Hingegen konnte schon mehrfach gezeigt werden, auch in den eigenen Untersuchungen (Abbildung 19, S.73), dass die TLR9 Expression nach Zugabe von ODN 2216 trotz vermehrter IFN- $\alpha$  Sekretion herabreguliert wird <sup>[41]</sup>.

pDCs Neugeborener zeigen bei CpG Stimulation eine verminderte Hochregulation von CD80, CD83, CD86 und CD40 im Vergleich zu pDCs Erwachsener. Die Regulation des HLA-DR und CD54 Rezeptors hingegen unterscheidet sich nicht signifikant. Die CpG induzierte IFN- $\alpha$  Sekretion ist in Nabelschnurblut deutlich vermindert. Diese Auffälligkeit der pDCs Neugeborener konnte auf Protein- und mRNA-Niveau nachvollzogen werden und bestand bis zu vier Tagen nach Geburt. Weitere Experimente mit angereicherten pDCs bestätigten, dass diese Zellen einen intrinsische Minderansprechbarkeit bezüglich ihrer CpG induzierten IFN- $\alpha$  Sekretion bei Geburt aufweisen <sup>[185]</sup>.

Die Stimulierung von pDCs löst eine Reihe von phänotypischen, morphologischen und funktionellen Veränderungen aus. Es kommt zu einer erhöhten Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen, MHC-Klasse-II-Molekülen und den zur T-Zell-Aktivierung notwendigen Kostimulations- und Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche. Der Homing-Faktors CCR7 wird exprimiert und die Expression anderer Chemokinrezeptoren (z.B. CCR6) im Rahmen der Reifung vermindert. Verschiedene Zytokine werden daraufhin sezerniert und das gesamte Zytoskelett wird reorganisiert. In Zellkulturversuchen kann dieser Reifungsprozess durch die Zugabe von TNF- $\alpha$ , CD40L, LPS, monozyten-konditioniertem Medium oder einem Gemisch aus IL-1 $\beta$ /IL-6/TNF- $\alpha$ /Prostaglandin E2 ausgelöst werden <sup>[171-175]</sup>. So schütten pDCs initial IFN- $\alpha$  als Antwort auf die CpG Stimulation aus, diese Fähigkeit lässt aber zugunsten der IL-12 Sekretion mit zunehmender Reife nach <sup>[148]</sup>. Entsprechend dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des Progesteron Depotkontrazeptivums Medroxyprogesteron Azetat (DMPA) die TLR9- und Virus-induzierte IFN- $\alpha$  Produktion von humanen und Maus-pDCs reduziert, was mit einem in einer Studie publizierten erhöhten Risiko der Frauen, die diese Verhütungsmethode verwenden, für sexuell übertragbare Erkrankungen wie HIV oder HSV-2 korreliert <sup>[186]</sup>.

IL-4, IL-15 und IL-17 alleine oder in Kombination mit IL-3 vor der Zugabe verstärken die IFN- $\alpha$  Sekretion. TNF- $\alpha$  und IL-4 + IL-10 blockieren die IFN- $\alpha$  Sekretion der pDCs <sup>[187]</sup>.

Die Bindung eines BDCA2 Liganden blockiert signifikant die Hochregulation von CD40, CD86 und CCR7, sowie die Sekretion von IFN- $\alpha$ , - $\beta$  und IL-6 von pDCs stimuliert mit CpG ODN. Insgesamt verhindert die Ligation des BDCA2 Rezeptors die durch CpG ODN-aktivierte pDCs vermittelte TH1 Antwort, inklusive der T-Zell

Proliferation, IFN- $\gamma$  Sekretion und CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> TH1 Entwicklung. BDCA2 ist somit ein negativer Regulator der TLR9 abhängigen Aktivierung humaner pDCs <sup>[188]</sup>.

Auch das Alter spielt eine Rolle bei der Betrachtung der Funktionalität der pDCs. So konnte für murine pDCs eine verringerte Hochregulation des IFN-regulatorischen Faktors 7 im Vergleich zu jüngeren festgestellt werden. Gealterte pDCs hatten größeren oxidativen Stress. Wenn man diesen blockierte konnte die Funktionalität teilweise wieder hergestellt werden <sup>[189]</sup>.

Schwermetalle, die unter anderem auch in Zigarettenrauch enthalten sind, induzieren die Maturation von DCs. Für Nickel und Kobalt ist nachgewiesen, dass diese wie auch LPS, die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale induzieren und dadurch NF- $\kappa$ B stimulieren, welches wiederum zur Reifung der DC beiträgt <sup>[190]</sup>. CD40 gilt zusammen mit IL-12 als Aktivierungsmarker der DC. Durch die Bindung an CD40 wird eine intrazelluläre Kaskade ausgelöst und folglich IL-12 und IL-6, wichtige Zytokine für die T-Zellinteraktion, sezerniert. Nickel führt zu einer starken Erhöhung der beiden <sup>[191]</sup>. Nickel und Dinitrochlorobenzene führen ausserdem zu einer signifikant gesteigerten Expression von CD54, CD80, CD86, CD86 und HLA-DR. In dem gleichen Zusammenhang kommt es zu einer gesteigerten Produktion der Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ . DC, die mit Nickel in Kontakt gekommen sind, exprimieren außerdem eine erhöhte Anzahl an CCR7 auch bei humanen CD34<sup>+</sup>-DC <sup>[192]</sup>.

Zu der Gruppe der PBMCs gehören auch andere Zellen die IFN- $\alpha$  produzieren können, dies sollte bei absoluten Messungen der IFN- $\alpha$  Sekretion je nach Versuchsaufbau immer bedacht werden <sup>[47]</sup>.

#### 4.2 Einfluss von HNSCC auf die Funktionalität der pDCs

In den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen konnte der Einfluss von HNSCC auf die IFN- $\alpha$  von pDCs weiter charakterisiert werden. So zeigte sich, dass es sich hierbei um einen löslichen Faktor im Tumormilieu handeln muss (siehe 3.2.1, S.55).

#### 4.2.1 Der Rückgang der TLR9 Expression als Erklärung der verminderten IFN- $\alpha$ Sekretion unter HNSCC Einfluss?

Bereits Hartmann, Wollenberg et al. 2003 vermuteten als Ursache der durch Tumor verminderten CpG-induzierten IFN- $\alpha$  Sekretion eine Abnahme der TLR9 Expression [36]. Allerdings scheint dieser Erklärungsansatz nicht zu genügen, denn trotz vermehrter Sekretion unter Stimulation mit CpG sinkt die TLR9 Expression ab, welches sich phänotypisch (Abbildung 19, S.73) und auch auf mRNA Ebene zeigt [41]. Ergo besteht keine Korrelation zwischen der Menge an sekretiertem IFN- $\alpha$  und der TLR9 Rezeptorexpression. Allerdings konnte auch beobachtet werden, dass unter der supprimierenden Wirkung von HNSCC plus der Zugabe des TLR9 Agonisten CpG die MFI höher ist, als unter Einfluss von HNSCC alleine (Abbildung 19, S.73). Bekannt ist, dass die gleichzeitige Stimulation des TLR7 und TLR9 Rezeptors die CpG ODN Klasse A induzierte IFN- $\alpha$  Sekretion reduziert [193]. Diese inhibierende Wirkung zeigt sich nur in Bezug auf spezielle Funktionen der immunstimulatorischen Sequenzen mit CpG Motiv wie die IFN- $\alpha$  Induktion und BDCA-2 Herabregulierung. Andere Funktionen der CpG ODN wie die Expression von CD80/CD86, Sekretion von IL-6, und B-Zell Proliferation werden durch die Anwesenheit von TLR7 Liganden nicht beeinflusst [194]. Es besteht zudem ein eigener negativer Rückkopplungsmechanismus via dem Interferon Rezeptor [195].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Herabregulierung des TLR9 Rezeptors keine Erklärung für die verminderte CpG-induzierte IFN- $\alpha$  Sekretion im HNSCC Milieu ist. Der Mechanismus ist also in einem anderen Ansatz zu suchen. Eine Möglichkeit wäre, dass nicht die CpG Aufnahme durch das Tumormilieu gehemmt wird, sondern die IFN- $\alpha$  Ausschüttung der pDCs. Ein in der Durchflusszytometrie verwendetes Agens, das Brefelidin, blockiert z.B. den intrazellulären Proteintransport. Es blockiert den vesikulären Proteintransport vom rauhen endoplasmatischen Retikulum zum Golgiapparat und führt so zu einer Akkumulation von Zytokinen innerhalb der Zelle. Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch in diesem Zusammenhang denkbar.

#### 4.2.2 Die Wirkung von IL-10 auf pDCs

In den Untersuchungen konnte Interleukin 10 als einer der im Tumormilieu vorhandenen Faktoren, die die IFN- $\alpha$  Sekretion inhibieren, identifiziert werden. Schon Waibler et al. konnten zeigen, dass IL-10 als negativer Regulator bezüglich der ODN induzierten IFN- $\alpha$  Sekretion fungiert <sup>[196]</sup>.

Erste Vermutungen, dass es sich hierbei um den Schlüssel zur Aufklärung des Mechanismus handeln könnte, bestätigten sich nicht. pDCs inkubiert mit IL-10 erlangen zwar nach Zugabe des Rezeptorblockers ihr vollständiges Sekretionsvermögen wieder, jedoch, wie in Abbildung 16 (S.68) zu sehen, kann durch eine Zugabe des IL-10R AK keine vollständige Aufhebung des die IFN- $\alpha$  Sekretion von pDCs blockierenden Effektes von HNSCC erreicht werden.

Wird dem in Kultur gewonnenen HNSCC Medium zusätzlich noch IL-10 zugesetzt, so wird die hemmende Wirkung verstärkt. Gibt man in dem Fall ebenfalls wieder IL-10R AK dazu, wird nur ein Teil der IFN- $\alpha$  Sekretion wieder zurückgewonnen aber keine vollständige Funktionalität. Daraus kann geschlossen werden, dass im HNSCC Milieu weitere lösliche Faktoren vorhanden sein müssen, die die Funktionalität der pDCs seitens der IFN- $\alpha$  Sekretion zu hemmen vermögen.

Eine Toxizität seitens IL-10 wie sie in der Literatur beschrieben wird, konnte in den hier untersuchten Konzentrationen nicht beobachtet werden (Abbildung 15, S.66) <sup>[148]</sup>.

In weiteren Untersuchungen zeigte sich ein Synergismus von IL-6 und IL-10 (Abbildung 14, S.65). IL-6 alleine zeigt keinen Einfluss auf die IFN- $\alpha$  Sekretion, erst im Zusammenspiel mit IL-10 zeigt sich ein supprimierender Effekt. Dieser Effekt lässt Vermutungen zu, dass auch noch weitere Faktoren an diesem Mechanismus beteiligt sind und die IFN- $\alpha$  Reduktion das Ergebnis des Zusammenspiels dieser ist.

Weitere Faktoren deren Wirken im HNSCC Tumormilieu bereits beschrieben ist, sind u.a. die Gruppe der VEGF als multifunktionelle Faktoren in der Angiogenese, Tumor Progression, Immunsuppression und Immuntoleranz in der Pathogenese von HNSCC <sup>[120]</sup>. Ein Synergismus von IL-6, IL-1 und GM-CSF wurde bereits in Bezug auf eine Herunterregulierung von CD80 auf Tumorzellen beschrieben. Dieser Mechanismus ist wiederumkehrbar durch Zugabe von IFN- $\gamma$  <sup>[138]</sup>. Dass IL-6 eine wichtige Rolle auch in Bezug auf die Erholung und das Überleben von HNSCC Patienten spielt, konnten Duffy et al., sowie Riedel et al. in ihren klinischen Studien zeigen <sup>[149-150]</sup>. Dort wird von den Autoren sogar vorgeschlagen IL-6 im Sinne eines

Biomarkers in Erwägung zu ziehen. Auch experimentell konnte die Rolle von IL-6 und des dadurch vermittelten Stat3 Signalweges in der Bedeutung der Tumorproliferation nachgewiesen werden. Fehlt Stat3 in dieser Kaskade, so kommt es zu einem verminderten Tumorwachstum <sup>[197]</sup>.

Der IL-8 Expression wird eine Rolle hinsichtlich des Proliferationsverhaltens und Zellüberlebens von HNSCC zugeschrieben. Ein Einfluss auf die IFN- $\alpha$  Sekretion von pDCs konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden (siehe 3.2.4, S.60).

Dass Zytokine einen großen Einfluss auf die Pathogenese ausüben, konnte in mehreren Studien gezeigt werden. So haben Patienten mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium ein gen TH2 verschobenes Profil ihres Immunsystems, verglichen mit dem von Patienten in niedrigeren Stadien <sup>[198]</sup>. Welche weiteren löslichen Faktoren im Tumormilieu Anteil an der Verminderung der IFN- $\alpha$  Sekretion von pDCs haben, bleibt weiter zu untersuchen.

#### 4.3 Die Wirkung der Strukturunterschiede/-modifikationen der CpG ODN

CpG ODN mit ihren verschiedenen Rückgratmodifikationen und verschiedenen Sequenzmotiven werden in drei verschiedene Klassen unterteilt, die jeweils zu einer unterschiedlichen Immunantwort führen. Gemeinsam für alle Klassen ist jedoch die Signaltransduktion über den TLR9 Rezeptor. Alle drei Klassen haben unterschiedliche Schwerpunkte in ihrer immunstimulatorischen Wirkung. Das typische Klasse A CpG ODN 2216 mit dem Schwerpunkt IFN- $\alpha$  Stimulation, das typische Klasse B CpG ODN 2006 mit einer Verlagerung seiner Wirkung auf die B-Zell Proliferation, sowie die Klasse C CpG ODN die beide Eigenschaften miteinander verbindet (siehe hierzu auch 1.4.1, S.15).

Phosphorothioat-Modifikationen (ein nicht an der Bindung beteiligtes Sauerstoff-Atom wird durch ein Schwefelatom ersetzt) sind in pharmakodynamischer Hinsicht eine optimierende Ergänzung zum „nativen“ CpG Gerüst, da diese veränderten Motive effizienter von den Targetzellen aufgenommen werden und sich gegenüber der enzymatischen Degradierung als stabiler erweisen <sup>[199-200]</sup>. Allerdings führen Veränderungen dieser Art in vitro unter anderem zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *Sp1*, zur Inhibierung der Zellproliferation und Zellmigration, sowie zur Störung der Ligandenbindung des EGFR und des VEGF Rezeptors <sup>[201-203]</sup>. In klinischen Studien mit Phosphorothioat-modifizierten CpG Motiven traten vermehrt

unerwünschte Wirkungen in Form von Müdigkeit, Fieber, Hautausschlägen, Thrombozytopenie, Leukopenie und der Aktivierung des Komplementsystems auf [204]. Zudem ist für die Phosphothioat-Modifikationen, mit Fokus auf die immunstimulatorische Funktion der CpG ODN Motive, eine eigene intrinsische Aktivität beschrieben. Diese gilt als unabhängig von der Anwesenheit des CpG Motives und zeigt Wirkung auf die B-Zell-Proliferation und die spezifischen Immunreaktionen von PBMCs [167-168]. Trotzdem ist diese Art von Modifikation für therapeutische Applikationen aufgrund ihrer höheren Stabilität sehr von Interesse [205].

Als weitere Modifikation finden sich CpG ODN mit einem sogenannten Poly-Guanosin (Poly-G) -Schwanz. Auch diese Veränderung am CpG ODN Gerüst führt zu einer besseren Aufnahme in die Zielzelle, zeigt unter in vivo Bedingungen aber wesentlich weniger unerwünschte Wirkungen, wie Lymphadenopathie und eine prolongierte Zytokin Erhöhung wie die PTO modifizierten CpGs [206-207]. In vitro Untersuchungen zeigten ausserdem eine vermehrte Induktion naiver T-Zellen über CD8<sup>+</sup>-T-Zell mit reduzierter Suppressionsfunktion über TLR8 durch eine Poly-G Sequenz [206, 208]

In den durchgeführten Untersuchungen hat die Verlängerung der typischen Klasse A ODN 2216 Sequenz um 15 Guanosin Positionen am 3'Ende keine Auswirkungen auf die stimulatorische Aktivität und zeigt weder eine Steigerung noch eine Verminderung der induzierten IFN- $\alpha$  Sekretion. Die Sequenz Poly-g besteht nur aus 30 Guanosin Positionen und besitzt hinsichtlich der IFN- $\alpha$  Induktion kein Potenzial (Abbildung 22, S.76).

Insgesamt wurde durch den Einsatz von unmodifizierten ODN eine höhere Induktion der IFN- $\alpha$  Produktion der Zellen erreicht als durch Stimulation mit den PTO-modifizierten Sequenzen des CpG 2006 und tetraHex. Dass die PTO Modifizierung eigene stimulatorische Aktivität besitzt, wenn auch gering, zeigt sich am nonsens ODN tetraCH2. Dieses ODN ohne stimulatorische CpG Sequenz induziert als PTO Variante in einer Konzentration von 6 $\mu$ g/ml eine geringe IFN- $\alpha$  Sekretion (Abbildung 23, S.77).

HNSCC hemmt die CpG induzierte IFN- $\alpha$  Ausschüttung nicht bei allen CpG ODN Klassen gleichermaßen. Kann mit CpG ODN 2216 und tetraHex noch eine IFN- $\alpha$  Sekretion unter Tumoreinfluss induziert werden, so unterbleibt diese bei der Stimulation mit CpG ODN 2006 vollkommen. Mit dem ODN tetraHex ist unter dem

Einfluss von BHY noch eine IFN- $\alpha$  Sekretion induzierbar. Ähnlich wie beim CpG 2216 ist aber auch diese in ihrer Quantität reduziert. Bei der Inkubation mit PCI13 wird die Sekretion hingegen völlig unterbunden (Abbildung 9, S.58).

Nicht nur die unterschiedlichen HNSCC Kulturen zeigen bezüglich ihrer Potenz unterschiedliche Stärken die IFN- $\alpha$  Induktion zu hemmen, sondern auch die unterschiedlichen CpG ODN Klassen bezüglich ihrer Induzierbarkeit unter Tumoreinfluss klassenunterschiedliche Reaktionen. Welchen Vor-/Nachteil in dieser Hinsicht die unterschiedlichen o.g. Modifikationen haben, bleibt zu untersuchen. Eine Wirkverstärkung bzw. eine Verminderung des HNSCC Einflusses z.B. durch die bessere Internalisierung der PTO Sequenzen ist zumindest denkbar.

#### 4.4 pDC, das Bindeglied zwischen Immunstimulation und Toleranzinduktion

T<sub>reg</sub> können eine wirkungsvolle antitumorale T-Zell Antwort unterbinden. Dabei stellt sich deren Aktivierung/Umgehung als äußerst komplexes Wechselspiel dar. Einerseits zeigen per TLR9-aktivierte DCs in vitro eine gewisse Resistenz, was die immunsuppressive Wirkung der regulatorischen T-Zellen angeht, in Kontrast dazu können TLR9 Liganden die Proliferation von regulatorischen T-Zellen induzieren und die Antwort naiver T-Zellen unterbinden <sup>[208-210]</sup>. Als weitere Variable in der biologischen Interaktion zwischen TLR9 und regulatorischen T-Zellen funktioniert die Zugabe eines Klasse B ODN zu Maus DCs, naiven und regulatorischen T-Zellen in Kultur, welches zu einem Anstieg von Zytokinen im Zellkulturüberstand führt, die wiederum je nach klinischer Situation eine pro- bzw. antitumorale Wirkung zeigen <sup>[211]</sup>. Betrachtet man die in vivo Interaktionen der TLR9 Aktivierung und der regulatorischen T-Zellen, so scheint diese noch komplexer und vielschichtiger. So zeigte unter anderem die Art der Verabreichung des TLR9 Agonisten einen Unterschied in der Wirkung auf das Immunsystem bei Mäusen. Die intravenöse Applikation eines Klasse B ODN induzierte die Expression des mit der Generierung von regulatorischen T-Zellen verknüpften Proteins, der Indolamin 2,3-Desoxygenase und resultierte in einer Suppression der T-Zell Expansion, wohingegen die subkutane Administration des selben ODN immunstimulierende Effekte zeigte <sup>[212-213]</sup>. Trotz dieses Effektes bei Mäusen zeigte eine intravenöse Therapie bei vorbehandelten Non-Hodgkin Lymphom Patienten mit dem Klasse B ODN PF-3512676 (CpG 7909 / 2006) späte klinische Erfolge bei 2 von 23 Patienten <sup>[214]</sup>.

Der Effekt, dass CpG die Generierung regulatorischer T-Zellen stimuliert, kann natürlich auch als ein Therapieansatz gesehen werden. Es konnte gezeigt werden, dass CpG ODN effektiv pDCs dazu bringt naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen in CD4-CD25-regulatorische T-Zellen zu differenzieren. Diese pDCs exprimieren Transkriptionsfaktor 3 und produzieren IL-10, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  und IL-6, und in nur geringem Maße IL-2 und IL-4. Diese T<sub>reg</sub>-Zellen sprechen außerdem vermindert auf weitere Antigenstimulation an und inhibieren die Proliferation von autologen naiven CD4- T-Zellen. Zur Induktion der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen durch CpG ODN-aktivierte pDCs ist ein direkter Zell-Zell-Kontakt nötig. Interessanterweise konnten die zur Erhaltung und Induktion der supprimierenden regulatorischen T-Zell Funktion sonst bekannten Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  im Zellkulturüberstand nicht nachgewiesen werden <sup>[215]</sup>. Diese Ergebnisse bestärken die Erkenntnis, dass pDCs in gleicher Weise wie sie das Immunsystem zur Tumorabwehr stimulieren können, ebenso in der Lage sind, eine Toleranz zu induzieren. Diesen Mechanismus kann man sich z.B. in der Therapie der *graft versus host disease* (GVHD) zu Nutze machen <sup>[208]</sup>.

#### 4.5 Bisherige Therapiemöglichkeiten und Therapieansätze

Die Therapiemöglichkeiten von HNSCC Tumoren sind vielgestaltig. Die Therapie richtet sich nach Lokalisation und Ausdehnung des Befundes, der Operabilität und dem Allgemeinzustand des Patienten.

Die grundlegenden Therapiemöglichkeiten bestehen in der Operation, Bestrahlung und Chemotherapie, kombiniert, alleine, sowie als adjuvante oder neoadjuvante Therapie.

Als wichtigster prognostischen Faktor als Teil der chirurgischen Therapie des Plattenepithelkarzinoms des Kopf-Hals-Bereiches gilt die komplette chirurgische Entfernbarkeit des Tumors <sup>[216]</sup>. Die Wahrscheinlichkeit auf Heilung sinkt mit steigender Größe des Primärtumors und bei Metastasierung in die regionalen Lymphknoten. Während HNSCC im Stadium I die 5-Jahres-Überlebensrate 90% zum Teil übersteigt, liegt die Überlebensrate im Stadium III-IV bei ca. 30% und geringer, vor allem da 50-60% der Patienten ein loko-regionales Rezidiv und 15-25% Fernmetastasen, sowie Zweitkarzinome entwickeln.

Sowohl bei Lokalrezidiven als auch bei Fernmetastasen zeigen nur ca. 35% der Patienten ein Ansprechen auf die Therapie, welches mit 6 bis 9 Monaten nur von kurzer Dauer ist <sup>[217]</sup>.

Gerade in den höheren Stadien ist die Resektabilität des Tumors ein begrenzender Faktor. Die Operationen können sich hierbei von Teilresektionen anatomischer Strukturen bis hin zu Totalresektionen erstrecken. Nach ausgedehnter Tumorsektion können Defekte entstehen, welche die Funktion des Sprechens und des Schluckaktes stark beeinträchtigen. Das Ausräumen der regionären Lymphabflussgebiete, die sogenannte *Neck dissection* schließt sich beim Vorliegen zervikaler Lymphknotenmetastasen an die eigentliche Resektion des Primärtumors an. Je nach Ausdehnung zusätzlich mit der Resektion von Muskulatur, Haut oder der Gefäße und Nerven .

Zusätzlich zu den kosmetischen und funktionellen Folgen der operativen Therapie, verursachen die Radio- und Chemotherapien unerwünschte Nebenwirkungen wie Übelkeit, Müdigkeit, Hautnekrosen, Atrophien von Knochen und Geweben, sowie eine quälende Xerostomie.

Die photodynamische Therapie ist eine relativ neue Therapieoption für verschiedene Krebsentitäten einschließlich Kopf-Hals-Tumoren. Ihr Nachteil liegt allerdings physikalisch begründet in der geringen Eindringtiefe des Lichts von nur einigen Millimetern, so dass in der Regel nur kleine oder flächig wachsende Tumore auf diese Weise erfolgreich therapiert werden können. Im Bereich der HNSCC beschränkt sich das Einsatzgebiet somit auf Mundhöhlen- und Kehlkopfkarzinome. Durch den Einsatz von Lasern in Kombination mit Lichtleitfasern lassen sich auch tiefere Tumore erreichen. Das Verfahren ist aber umständlich und auf wenige Zentren beschränkt und wird daher nur selten angewandt <sup>[218]</sup>.

Immunbiologische Therapieverfahren haben die letzten Jahre in der Krebstherapie immer mehr an Bedeutung gewonnen. Sie können als komplementäre Strategie zur Verbesserung der konventionellen Behandlung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches beitragen. Es können hierbei in Abhängigkeit von der jeweiligen Zielsetzung vier Prinzipien unterschieden werden: aktiv versus passiv und spezifisch versus unspezifisch.

**Tabelle 5: Eine Auswahl von bisher erprobten immunologischen Behandlungsansätzen bei HNSCC**

Aktiv-unspezifische Immuntherapie	
Bacille Calmette Guérin	Donaldson et al. 1973 <sup>[219]</sup> , Taylor et al. 1983 <sup>[220]</sup>
Corynebacterium parvum	Cheng et al. 1982 <sup>[221]</sup>
Levamisole (synthetisches Imidazothiazol Derivat, Ergamisol®)	Wanebo et al. 1978 <sup>[222]</sup> , Knox et al. 2005 <sup>[223]</sup>
Picibanil (OK 432) (lyophilisierte Mixtur aus niedrig virulenten Gruppe A Streptokokken)	Kitahara et al. 1996 <sup>[224]</sup>
DNA-hsp65 (mykobakterielles Hitze-Schock-Protein)	Michaluart et al. 2008 <sup>[225]</sup>
Aktiv-spezifische Immuntherapie	
Impfstoff aus dendritischen Zellen und apoptotischen Tumorzellen	Whiteside 2001 <sup>[226]</sup>
Tumor DNA-basierte Impfstoffe	Whiteside 2001 <sup>[226]</sup>
Impfstoff aus autologen Tumorzellen und IL12-transfizierten Fibroblasten	Tahara et al. 1995 <sup>[227]</sup>
über p53-Epitop aktivierte autologe DCs generierte zytotoxische T Lymphozyten	Hoffman et al. 2005 <sup>[228]</sup>
Passiv-unspezifische Immuntherapie	
IL-2 (lokal)	Cortesina et. al.1991 <sup>[229]</sup> , Vlock et al. 1994 <sup>[230]</sup> , Wollenberg et al. 1999 <sup>[231]</sup>
IFN $\gamma$ (systemisch)	Ikic et al. 1981 <sup>[232]</sup> , Vlock et al. 1991 <sup>[233]</sup>
IFN $\alpha$ (systemisch)	Richtsmeier et al. 1990 <sup>[234]</sup>
IRX2 (lokal) (Zytokinmischung)	Barrera et al. 2000 <sup>[235]</sup>
Tumorzell-getriggerte und Lymphokin aktivierte Killerzellen plus IL-2	Ishikawa et al. 1989 <sup>[236]</sup>
Passiv-spezifische Immuntherapie	
Anti-EGFR	Soulieres et al. 2004 <sup>[237]</sup>
tumorassoziierte Antigen – spezifische T-Zellen	To et al. 2000 <sup>[238]</sup>
Anti-CD44v6 + Mitosehemmer	Riechelmann et al. 2008 <sup>[239]</sup>
IL-2 + virusmodifizierte autologe Tumorzellen	Herold-Mende et al. 2005 <sup>[240]</sup>
Radioimmuntherapie	Borjesson et al. 2003 <sup>[241]</sup> , Calnot et al. 2001 <sup>[242]</sup>

Nicht alle der in Tabelle 5 aufgeführten Konzepte brachten die durch *in vitro* Ergebnisse oder aufgrund der etablierten Wirkung bei anderen Tumorentitäten erhofften Wirkungen in den Phase I /Phase II Studien mit HNSCC Patienten.

Die alleinige systemische Behandlung mit IFN- $\alpha$  erbrachte nur in einigen wenigen vorbehandelten Patienten eine objektive Tumorremission bzw. Stabilisierung <sup>[243]</sup>. Für eine palliative Kombinationschemotherapie mit 5-Fluorouacil und Cisplatin konnte keine Verbesserung der Remissions- oder Überlebensrate erreicht werden <sup>[244]</sup>. Die Kombination von IFN- $\alpha$ , 13Cis-Retinolsäure und  $\alpha$ -Tocopherol bewies in der Phase II Studie gute Ergebnisse bei fortgeschrittenem HNSCC <sup>[245]</sup>.

Die Studien die bisher mit der Reinfusion von *ex vivo* konditionierten Lymphokin-aktivierten Killerzellen an HNSCC Patienten durchgeführt wurden, zeigten Wirkung auf das Tumorwachstum und die lymphozytären Tumordinfiltrate, jedoch bestehen noch deutliche praktische Schwierigkeiten bei der ausreichenden *ex-vivo* Generierung solcher Zellen.

Die Impfung mit autologen Tumorzellen, die *ex vivo* mit einem Virus modifiziert wurden, verfolgt den Gedanken, dass der Tumor der Überwachung durch fehlende stimulierende Antigene entgeht und dies mit Hilfe der beigebrachten Virusantigene künstlich erzeugt werden kann <sup>[246]</sup>.

In den letzten Jahren wurden viele Antikörper entdeckt, die gegen Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches gerichtet sind. 2006 wurde der monoklonale Antikörper Cetuximab (Erbix<sup>®</sup>) für die Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren zugelassen. Er ist gegen den Rezeptor des *epidermal growth factor* (EGFR) gerichtet.

Ein weiterer Ansatz ist die Kopplung von bivatuzumab einem monoklonalen Antikörper gegen CD44v6 mit dem Radionuklid Rhenium-186 <sup>[247]</sup>.

An der weiteren Entwicklung von Antikörpern wird viel geforscht, so zum Beispiel an einem Antikörper gegen das Fibroblasten-Aktivierungs-Protein (FAP). Dieses Protein wird von dem „gesunden“ Gewebe welches den Tumor umgibt, dem sogenannten Ammengewebe gebildet. Dieses Protein kann gesundes Gewebe zersetzen. Dieser Prozess ist grundlegend am infiltrierenden und metastasierenden Wachstum bösartiger Tumoren beteiligt. Durch genetische Kopplung mit dem Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) wurde der Antikörper zu einem Immunkonjugat weiterentwickelt. TNF ist bereits seit mehreren Jahrzehnten als zentraler Botenstoff des menschlichen Immunsystems und Vermittler vielfältiger Anti-Tumor-Wirkungen bekannt. Es ist in

der Lage, Tumorzellen direkt zu zerstören oder indirekt durch das Anlocken und Aktivieren von Killerzellen oder der Verödung der versorgenden Blutgefäße. Allerdings sind Versuche, TNF in der Tumorthapie einzusetzen, an den ausgeprägten Nebenwirkungen gescheitert. Im Rahmen von Tierversuchen konnte diese Problematik durch die Kopplung an den Antikörper und zum anderen durch Beschränkung auf nur einen bestimmten Anteil des TNF-Proteins mittels genetischen Fusion verringert werden <sup>[248]</sup>.

Das große Bestreben in der Erforschung der immunologischen Therapieoptionen liegt in der Verbesserung der Prognose von HNSCC Erkrankungen, was in den letzten Jahren durch die Optimierung der Standardtherapien leider nur geringfügig geglückt ist. Des Weiteren gilt es die Lebensqualität der Patienten zu verbessern, da die heutigen Optionen durch die Veränderung des Körpers an exponierten Stellen (Kopf und Hals) und die folgenden funktionellen Einschränkungen psychosozialen Stress mit sich bringen.

Oft haben in vitro Experimente nicht die erhofften Ergebnisse in vivo gezeigt. Die Komplexität des Immunsystems und des Zusammenspiels von Tumor und Immunzellen erschwert die Übertragung von Forschung auf das „Leben“.

Einen kleinen Schritt zum besseren Verständnis dieses Systems soll die vorliegende Dissertation beitragen.

#### 4.5.1 Therapeutische Möglichkeiten mit CpG ODN bei Tumorerkrankungen

Die bisher bekannten therapeutischen Strategien mit CpG ODN leiten sich aus ihrer genuinen Wirkungsweise auf das humane Immunsystem ab. Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems und die darauf folgende Verstärkung einer TH1 Immunantwort - alle diese Eigenschaften lassen sich in der Anwendung von CpG ODN als Adjuvanz bei Impfungen, sowie in der Immuntherapie von Infektionen, Tumoren und Allergien nutzen.

Konventionelle Impfstrategien beinhalten meist pure Antigenpräparationen, ohne dabei die Voraussetzungen einer Kostimulation zu erfüllen um eine effektive Immunisierung erlangen zu können. Es resultiert eine Antikörperantwort, aber die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen bleibt aus. Das humane Standardadjuvans Alum (Aluminiumhydroxid) bedingt in Mäusen eine TH2 gerichtete humorale Antwort,

ebenfalls ohne Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen. Das *complete Freud's adjuvant* (CFA) bahnt, wie auch CpG, eine TH1 gerichtete Antwort und die Entwicklung spezifischer zytotoxischer T-Zellen, allerdings mit erheblichen Nebeneffekten und daher ist dessen Anwendung auch im Tierversuch umstritten [249]. Die bessere Verträglichkeit von CpG lässt sich darauf zurückführen, dass Zellen der myeloiden Reihe vergleichsweise unbeeinflusst bleiben. Deren dauerhafte Aktivierung, wie etwa durch das CFA, bewirkt eine Ausschüttung großer Mengen an inflammatorischen Mediatoren, die gewebstoxische Nebenwirkungen verursachen [250]. Die CpG induzierte TH1 gerichtete Immunantwort verbessert insbesondere die Effektivität der Impfung gegen Viren und intrazelluläre Bakterien und dieses schneller und effektiver als herkömmliche Impfungen, so dass im Tiermodell auch eine wirkungsvolle Impfung von Neugeborenen erreicht werden konnte [251-252]. In einer Impfstudie mit Engerix-B™ einem Hepatitis B Impfstoff konnte gezeigt werden, dass es zusammen mit dem CpG 7909 eine schnellere und effektivere Immunantwort in gesunden Probanden hervorruft, mit nur geringen Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen, lokale Reaktionen an der Einstichstelle und Grippe-ähnliche Symptomen [253]. Der gleiche Effekt konnte bei antiviral behandelten HIV Patienten beobachtet werden, deren Immunsystem als hyporeaktiv gilt und zum Teil gar nicht auf Impfungen reagiert [253].

Bei der Immuntherapie von Tumoren wird neben der Verbesserung der Wirkung bestehender Therapien, wie der konventionellen Chemotherapie bzw. der Therapie mit Antikörpern, auch eine therapeutische Vakzinierung angestrebt. So unterstützt CpG ODN die Immunisierung gegen tumorspezifische Antigene durch ein TH1-gerichtetes Milieu, welches die Cross-Präsentation der Antigene fördert und somit eine starke Antwort IFN- $\gamma$ -produzierender zytotoxischer T-Zellen erreicht [254]. In vitro Studien zeigen, dass CPG ODNs die Wirksamkeit von therapeutischen Antikörpern durch die Verstärkung der *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC) erhöhen (beim B-Zell Lymphom zusammen mit Retuximab™; beim Brustkrebs zusammen mit Herceptin™) [255-257]. Die Wirkung beim B-Zell Lymphom wird durch eine Expressionssteigerung von CD20 erreicht, dem Zielantigen von Retuximab™ [258]. Experimentell zeigte sich im C26 Mausmodell eines Kolonkarzinoms zudem eine bessere Wirkung von 5-Fluorouracil und Irinotecan in Kombination mit CpG ODN und DC-basierter Immunotherapie, sowie eine Reduktion

der Toxizität <sup>[259]</sup>. Eine gleiche Wirkungsverstärkung konnte bei Tumoren mit relativer Chemotherapieresistenz gezeigt werden <sup>[260]</sup>.

Auch in der Monotherapie von Tumoren erweist sich CpG als wirksam. Das Prinzip hierbei ist eine durch CpG ODN geförderte Aktivierung des unspezifischen Immunsystems und der endogenen Mechanismen der Immunüberwachung. Dass eine protektive Immunüberwachung, vermittelt besonders durch IFN- $\gamma$  und aktivierte Lymphozyten, das Wachstum eines malignen Tumors verhindern kann, konnte bereits im Mausmodell gezeigt werden <sup>[261]</sup>. CpG ODN erweist sich wirksam in der Therapie verschiedener Stadien eines Tumors und in einigen Mausmodellen konnte sogar gezeigt werden, dass erneuter Tumorbefall nach erfolgreicher Eradikation durch Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses verhindert werden konnte <sup>[260, 262-263]</sup>.

Es konnte jedoch ein Unterschied in der Antitumoralenwirkung je nach Applikationsart im Mausmodell gezeigt werden. Die peritumorale Injektion von CpG ODN hatte auf das Wachstum des aggressiven Fibrosarkoms AG104A, des IE7 Fibrosarkoms, des B16 Melanoms, sowie des 3LL Lungenkarzinoms eine gute bis sehr gute Wirkung. Dahingegen zeigte eine systemische Applikation geringere Effekte auf den Progress <sup>[264]</sup>.

In dem Case-Report eines Patienten mit metastasiertem malignem Melanom konnte ebenfalls die Wirksamkeit der CpG ODN Monotherapie gezeigt werden <sup>[265]</sup>. Derzeit laufen mehrere Phase I/II-Studien, die die Therapie mit CpG ODN alleine, in Kombination mit Antikörpern und in der Tumorstabilisierung am Menschen weiter untersuchen.

Auch bei allergischen Erkrankungen bietet CpG ODN einen neuen Therapieansatz. Bei der Pathogenese allergischer Reaktionen spielt eine fehlinduzierte TH2-gewichtete Überreaktion des Immunsystems mit verstärkter Bildung von IgE Antikörpern, IL-4, IL-5 und IL-10 eine Rolle. CpG ODN induzieren in vitro einen TH1-shift und haben in dem Sinne eine TH2-antagonisierende Wirkung <sup>[266]</sup>. Im Tiermodell zeigt es sich bei allergischem Asthma wirksam <sup>[267-268]</sup>. Als Adjuvans bei der Desensibilisierungstherapie kann CpG eine TH1 Antwort bahnen und somit die Ausprägung der allergischen Reaktion abschwächen <sup>[269-270]</sup>. Interessant ist hierbei zu bemerken, dass ein Ansteigen der Häufigkeit von Allergien mit der Verwendung von Alum Adjuvans, das eine TH2-gewichtete Immunantwort induziert, bei der

Impfung von Kindern in Verbindung gebracht wird <sup>[271-272]</sup>. Diese Beobachtung bestärkt die Erforschung von CpG ODN als Adjuvans bei Impfungen.

Durch sein multimodales Eingreifen in das Immunsystem ist auch der Einsatz von CpG ODN bei Infektionen vielversprechend. In Mausmodellen erzielte CpG ODN durch Verstärkung einer TH1-gewichteten mehrstufigen Aktivierung des Immunsystems präventiven Schutz und zum Teil therapeutische Erfolge gegen intrazelluläre Erreger wie Leishmanien, Listerien und Malaria <sup>[273-275]</sup>. In einer Ib-Phase Studie mit Hepatitis C Patienten konnte durch die Monotherapie mit CpG ODN 10101 eine dosisabhängige Reduktion des Plasma-Virus-RNA Spiegels erreicht werden. Eine darauf folgende Phase Ib Studie mit Patienten die an einer chronischen Hepatitis C Infektion litten verglich die Wirkung Standardtherapie (pegyliertes IFN und Ribavirin<sup>TM</sup>), CpG ODN alleine, in Kombination mit dem pegylierten IFN bzw. Ribavirin und in Dreierkombination. Auch hier konnte eine synergistische Wirkung beobachtet werden <sup>[276]</sup>.

Zur Behandlung der Zytomegalievirus-Retinitis bei AIDS Patienten ist ein Medikament in Deutschland zugelassen, welches CpG Motive enthält (Formiviren, Vitravene<sup>®</sup>). Der Wirkstoff besteht aus Antisense ODN, die durch komplementäre Bindung an die RNA die Bildung des Proteins hemmt. Neben dieser Antisense Nukleotidsequenz enthält der Wirkstoff zusätzlich immunstimulatorische CpG ODN.

Aber natürlich müssen auch unerwünschte Wirkungen der CpG ODNs diskutiert werden. Die Befürchtungen die sich aus der Wirkungsweise ergeben, bestehen darin, dass durch die Gabe von CpG ODN die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen und Überreaktionen des Immunsystems auf Pathogene welches zu einem septischen Schock führt, fördern können. Im Mausmodell ließ sich durch CpG ODN keine systemische autorreaktive Reaktion provozieren. Auch Nebenwirkung toxischer Natur konnten unter normaler Dosierung nicht beobachtet werden. Nur organspezifische Autoimmunreaktionen konnten provoziert werden. Keine dieser Nebenwirkungen konnte bisher in den klinischen Studien am Menschen beobachtet werden <sup>[277]</sup>.

#### 4.6 In vitro versus in vivo

Die Grundlagenforschung und *in vitro* Untersuchungen sind der erste Schritt in Richtung der Aufklärung der physiologischen Vorgänge *in vivo*. Dabei ist die Übertragung der Erkenntnisse und Ergebnisse meistens nicht eins zu eins möglich.

Ein Unterschied, betrachtet man die in dieser Dissertation beschriebenen Versuchskonstrukte, zeigt sich im Zytokinprofil der HNSCC Zelllinien. Die Expression dieser ist in den immortalisierten Zelllinien variabler als in den untersuchten Proben aus Patienten <sup>[278]</sup>. Unsere Untersuchungen zeigten ebenfalls, dass sich das Zytokinprofil und auch die Wirkung auf die CpG induzierte IFN- $\alpha$  Sekretion der untersuchten einzelnen Zelllinien unterscheidet. PCI13 zeigte hierbei ein größeres Hemmpotential als BHY (siehe Abbildung 8, S.56).

In Betracht gezogen werden muss in Hinsicht auf die Fragestellung der IFN- $\alpha$  Ausschüttung von pDCs über einen längeren Zeitraum die kurze Halbwertszeit der mRNA von 30min, sowie in Hinblick auf die Untersuchung als Teil eines Systems die kurze biologische Halbwertszeit von nur 2-4 Stunden <sup>[279-280]</sup>.

Dieses zeigt bereits, dass *in vitro* gewonnene Ergebnisse nur beschränkt auf die Situation *in vivo* übertragen werden können. Halbwertszeiten, individuelle Kinetiken sowie die Art des Stimulus müssen hinsichtlich der Aussagekraft von *in vitro* Ergebnissen in Betracht gezogen werden. Ein weiterer Punkt ist, dass die hier vorliegenden Versuche mit Vollblut von gesunden Probanden durchgeführt wurden. Es ist davon auszugehen, dass unter länger bestehenden pathologischen Bedingungen, in denen sich pro- und antiinflammatorische Reize überlagern, es zu Veränderungen der Kinetiken kommt, die so in *in vitro* Versuchen nicht zu imitieren sind. Wilhelm et al. zeigten zum Beispiel, dass 20 Minuten nach Operationen mit Herz-Lungen-Maschine und in den ersten acht Tagen einer Sepsis die Antwort von Vollblut auf einen LPS-Stimulus, der ebenfalls über einen *Toll-like* Rezeptor funktioniert, signifikant inhibiert ist <sup>[281]</sup>. Gleiches ist für die Stimulation mit CpG denkbar.

Grundman et al. zeigten durch ihre Untersuchungen, dass die benötigte IL-10 Konzentration, um den gleichen antiinflammatorischen Effekt zu erreichen *in vitro* höher ist als *in vivo* <sup>[282]</sup>.

#### 4.6.1 pDCs in Reinkultur versus PBMCs

Die plasmazytoide dendritische Zelle stellt im humanen Immunsystem rein quantitativ eine verschwindend kleine Zellpopulation des peripheren Blutes dar. Ihr Anteil an den kernhaltigen Zellen des peripheren Blutes wird mit 0,1-0,7% beziffert, also eine auf 1000 *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC).

pDCs sind in der Lage durch die Ausschüttung bestimmter Mediatoren eine Vielzahl von anderen immunkompetenten Zellen, wie T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zu aktivieren <sup>[49-50]</sup>.

Zudem besitzen CpG ODN nicht nur eine strikte Wirkung auf pDCs (siehe hierzu auch 1.4.1, S.15). Typ A ODN induzieren sehr hohe Mengen an Typ I IFN, zeigen kaum eine Wirkung auf isolierte B-Zellen. Das Typ B CpG bewirkt in erster Linie eine Aktivierung von B-Zellen im Sinne einer Steigerung der Synthese, außerdem wird die Sekretion von IL-6 und IL-10 angeregt <sup>[80]</sup>. Im Gegensatz zu Typ A CpG induziert es nur eine sehr schwache IFN- $\alpha$  Produktion <sup>[85]</sup>. Die dritte CpG Klasse, das Typ C CpG ODN vereint die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Typ A und B CpG ODNs.

In den Hauptteilen der Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden pDCs nach magnetischer Separation in „Reinkultur“ untersucht. Aufgrund der beschriebenen Interaktionen ist ein Unterschied in der Mischkultur mit PBMCs denkbar. In den Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation konnte jedoch gezeigt werden, dass die Tendenz – ob pDCs in Reinkultur oder in PBMCs – die gleiche ist (siehe hierzu 3.3, S.69). Auch in der PBMC Kultur wird die CpG induzierte IFN- $\alpha$  Sekretion durch HNSCC gemindert und auch hier stärker durch PCI13 als durch BHY. Die Gesamtkonzentration an IFN- $\alpha$  liegt unter diesen Bedingungen etwa dreimal höher als in der reinen pDC Kultur bei etwa gleicher Anzahl pDCs ( $5 \times 10^4$  Zellen). Allerdings gehören zu der Gruppe der PBMCs auch andere Zellen, die IFN- $\alpha$  produzieren können, worin die Erklärung der höheren Gesamtkonzentration liegen mag <sup>[47]</sup>.

## 5 Zusammenfassung

Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals Bereiches (HNSCC) zeigen eine deutliche Verminderung der zellvermittelten Immunantwort. Untersuchungen hierzu zeigten, dass plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) als Teil des angeborenen Immunsystems zwar HNSCC infiltrieren, jedoch anstelle einer adäquaten gegen den Tumor gerichteten TH1-Antwort eine TH2-Antwort und somit eine Toleranzentwicklung unterstützen.

pDC sind durch die schnelle Bildung von großen Mengen an IFN- $\alpha$  als Antwort auf sogenannte CpG-DNA Motive, die als Ligand über den TLR9 Rezeptor der pDCs wahrgenommen werden, gekennzeichnet. Im Tumormilieu führt eine Alteration dieser zentralen pDC Immunfunktion zu einer deutlichen Verminderung der IFN- $\alpha$  Sekretion. Die stimulatorische Wirkung der CpG ODN Motive auf die IFN- $\alpha$  Sekretion von pDCs ist zeit- und konzentrationsabhängig. Die verschiedenen Klassen zeigen diesbezüglich unterschiedliche Eigenschaften. Zusätzlich zu den zwei etablierten Motiven ODN 2216 (Klasse A) und ODN 2006 (Klasse B) wurden die Eigenschaften des neu generierten und um eine Hexanukleotidsequenz erweiterten CpG ODN TM6<sub>4</sub> (TetraHex) untersucht. Die Hexanukleotidsequenz *TCGTGT* in *cis* im CpG ODN TM6<sub>4</sub> führt zu einer stärkeren Internalisierung. Dieses Motiv enthält ein CpG Nukleotid innerhalb einer Sequenz, die eine starke CpG-spezifische Stimulation auf B-Zellen ausübt, also Eigenschaften eines Klasse B CpG Motivs aufweist. Dieses zeigt in Bezug auf die IFN- $\alpha$  Induktion eine ähnliche zeitliche Kinetik wie das CpG ODN 2006, führt jedoch zu einer quantitativ höheren IFN- $\alpha$  Sekretion.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass lösliche Faktoren des Tumormilieus die Immunmodulation und letztendlich die Minderung der IFN- $\alpha$  Sekretion bewirken.

Für das Interleukin-10 (IL-10) konnte diese Eigenschaft nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich, dass es sich nicht nur um einen einzelnen Faktor handelt. Diese inhibitorische Wirkung ist teilweise durch einen IL-10 Rezeptorblocker antagonisierbar. Für mindestens einen weiteren Faktor, dem Interleukin-6, konnte eine IL-10-abhängige synergistische, hemmende Wirkung nachgewiesen werden. Auch dieser Pathomechanismus korreliert ebenfalls mit der Zeit und Konzentration und ist durch die unterschiedlichen Charakteristika verschiedener Zelllinien und Tumoren unterschiedlich ausgeprägt. Ein Einfluss auf die Expression des TLR9 Rezeptors zeigt sich hierbei nicht ursächlich. Über welchen spezifischen molekularen

Mechanismus die inhibitorische Wirkung des Tumormilieus auf die pDCs wirkt, bedarf weiterführender Untersuchungen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Krug, A., et al., *Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12*. Eur J Immunol, 2001. **31**(10): p. 3026-37.
2. Abbas, A.K. and A.H. Lichtman, *Cellular and molecular immunology*. 5th ed. 2005, Philadelphia, PA: Saunders. 564 p.
3. Hoffmann, J.A., et al., *Phylogenetic perspectives in innate immunity*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1313-8.
4. Lemaître, B., et al., *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. Cell, 1996. **86**(6): p. 973-83.
5. Triantafyllou, M., et al., *Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting*. J Biol Chem, 2006. **281**(41): p. 31002-11.
6. Akira, S. and S. Sato, *Toll-like receptors and their signaling mechanisms*. Scand J Infect Dis, 2003. **35**(9): p. 555-62.
7. Horng, T., et al., *The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors*. Nature, 2002. **420**(6913): p. 329-33.
8. Sharma, S., et al., *Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway*. Science, 2003. **300**(5622): p. 1148-51.
9. Chaplin, D.D., 1. *Overview of the immune response*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(2 Suppl): p. S442-59.
10. Lenschow, D.J., T.L. Walunas, and J.A. Bluestone, *CD28/B7 system of T cell costimulation*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 233-58.
11. Van Kooten, C. and J. Banchereau, *CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair*. Adv Immunol, 1996. **61**: p. 1-77.
12. Mescher, M.F., *Molecular interactions in the activation of effector and precursor cytotoxic T lymphocytes*. Immunol Rev, 1995. **146**: p. 177-210.
13. Pene, J., et al., *IgE production by normal human B cells induced by alloreactive T cell clones is mediated by IL-4 and suppressed by IFN-gamma*. J Immunol, 1988. **141**(4): p. 1218-24.
14. Romagnani, S., *Th1 and Th2 in human diseases*. Clin Immunol Immunopathol, 1996. **80**(3 Pt 1): p. 225-35.
15. Kidd, P., *Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease*. Altern Med Rev, 2003. **8**(3): p. 223-46.
16. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. J Exp Med, 1973. **137**(5): p. 1142-62.
17. Dhodapkar, M.V., et al., *Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells*. J Exp Med, 2001. **193**(2): p. 233-8.
18. Mellman, I. and R.M. Steinman, *Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines*. Cell, 2001. **106**(3): p. 255-8.
19. Facchetti, F., et al., *Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin*. Am J Pathol, 1988. **133**(1): p. 15-21.

- 
20. O'Doherty, U., et al., *Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature*. Immunology, 1994. **82**(3): p. 487-93.
  21. Grouard, G., et al., *The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand*. J Exp Med, 1997. **185**(6): p. 1101-11.
  22. Peter, H.H., et al., *Human peripheral null lymphocytes. II. Producers of type-1 interferon upon stimulation with tumor cells, Herpes simplex virus and Corynebacterium parvum*. Eur J Immunol, 1980. **10**(7): p. 547-55.
  23. Abb, J., H. Abb, and F. Deinhardt, *Phenotype of human alpha-interferon producing leucocytes identified by monoclonal antibodies*. Clin Exp Immunol, 1983. **52**(1): p. 179-84.
  24. Siegal, F.P., et al., *The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood*. Science, 1999. **284**(5421): p. 1835-7.
  25. Cella, M., et al., *Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon*. Nat Med, 1999. **5**(8): p. 919-23.
  26. Olweus, J., et al., *Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(23): p. 12551-6.
  27. Blom, B., et al., *Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells*. J Exp Med, 2000. **192**(12): p. 1785-96.
  28. Bendriss-Vermare, N., et al., *Human thymus contains IFN-alpha-producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells*. J Clin Invest, 2001. **107**(7): p. 835-44.
  29. Takeuchi, S. and M. Furue, *Dendritic cells: ontogeny*. Allergol Int, 2007. **56**(3): p. 215-23.
  30. Dzionek, A., et al., *BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6037-46.
  31. Summers, K.L., et al., *Phenotypic characterization of five dendritic cell subsets in human tonsils*. Am J Pathol, 2001. **159**(1): p. 285-95.
  32. Pashenkov, M., et al., *Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid*. Brain, 2001. **124**(Pt 3): p. 480-92.
  33. Farkas, L., et al., *Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions*. Am J Pathol, 2001. **159**(1): p. 237-43.
  34. Zou, W., et al., *Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells*. Nat Med, 2001. **7**(12): p. 1339-46.
  35. Jahnsen, F.L., et al., *Experimentally induced recruitment of plasmacytoid (CD123high) dendritic cells in human nasal allergy*. J Immunol, 2000. **165**(7): p. 4062-8.
  36. Hartmann, E., et al., *Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer*. Cancer Res, 2003. **63**(19): p. 6478-87.
  37. Wollenberg, A., et al., *Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases*. J Invest Dermatol, 2002. **119**(5): p. 1096-102.

- 
38. Krug, A., et al., *Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells*. Eur J Immunol, 2001. **31**(7): p. 2154-63.
  39. Hemmi, H., et al., *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*. Nature, 2000. **408**(6813): p. 740-5.
  40. Bauer, S., et al., *Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(16): p. 9237-42.
  41. Hornung, V., et al., *Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides*. J Immunol, 2002. **168**(9): p. 4531-7.
  42. Kadowaki, N., et al., *Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens*. J Exp Med, 2001. **194**(6): p. 863-9.
  43. Ito, T., et al., *Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets*. J Exp Med, 2002. **195**(11): p. 1507-12.
  44. Zhang, Y.L., et al., *Hepatitis C virus single-stranded RNA induces innate immunity via Toll-like receptor 7*. J Hepatol, 2009. **51**(1): p. 29-38.
  45. Di Domizio, J., et al., *TLR7 stimulation in human plasmacytoid dendritic cells leads to the induction of early IFN-inducible genes in the absence of type I IFN*. Blood, 2009. **114**(9): p. 1794-802.
  46. Melchjorsen, J., et al., *Activation of innate defense against a paramyxovirus is mediated by RIG-I and TLR7 and TLR8 in a cell-type-specific manner*. J Virol, 2005. **79**(20): p. 12944-51.
  47. Asselin-Paturel, C. and G. Trinchieri, *Production of type I interferons: plasmacytoid dendritic cells and beyond*. J Exp Med, 2005. **202**(4): p. 461-5.
  48. Jarrossay, D., et al., *Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells*. Eur J Immunol, 2001. **31**(11): p. 3388-93.
  49. Gilliet, M. and Y.J. Liu, *Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells*. J Exp Med, 2002. **195**(6): p. 695-704.
  50. Kadowaki, N. and Y.J. Liu, *Natural type I interferon-producing cells as a link between innate and adaptive immunity*. Hum Immunol, 2002. **63**(12): p. 1126-32.
  51. Cella, M., et al., *Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization*. Nat Immunol, 2000. **1**(4): p. 305-10.
  52. Rissoan, M.C., et al., *Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation*. Science, 1999. **283**(5405): p. 1183-6.
  53. Soumelis, V. and Y.J. Liu, *From plasmacytoid to dendritic cell: morphological and functional switches during plasmacytoid pre-dendritic cell differentiation*. Eur J Immunol, 2006. **36**(9): p. 2286-92.
  54. Dzionek, A., et al., *BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction*. J Exp Med, 2001. **194**(12): p. 1823-34.
  55. Fonteneau, J.F., et al., *Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity*. Blood, 2003. **101**(9): p. 3520-6.

- 
56. Krug, A., et al., *Interferon-producing cells fail to induce proliferation of naive T cells but can promote expansion and T helper 1 differentiation of antigen-experienced unpolarized T cells*. J Exp Med, 2003. **197**(7): p. 899-906.
  57. *Virus interference: I. The interferon*. By Alick Isaacs and Jean Lindenmann, 1957. CA Cancer J Clin, 1988. **38**(5): p. 280-90.
  58. Kotenko, S.V., et al., *IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex*. Nat Immunol, 2003. **4**(1): p. 69-77.
  59. Osawa, Y., et al., *Collaborative action of NF-kappaB and p38 MAPK is involved in CpG DNA-induced IFN-alpha and chemokine production in human plasmacytoid dendritic cells*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4841-52.
  60. Marie, I., J.E. Durbin, and D.E. Levy, *Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7*. Embo J, 1998. **17**(22): p. 6660-9.
  61. Taniguchi, T. and A. Takaoka, *The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(1): p. 111-6.
  62. Hengel, H., U.H. Koszinowski, and K.K. Conzelmann, *Viruses know it all: new insights into IFN networks*. Trends Immunol, 2005. **26**(7): p. 396-401.
  63. Diebold, S.S., et al., *Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers*. Nature, 2003. **424**(6946): p. 324-8.
  64. Katze, M.G., Y. He, and M. Gale, Jr., *Viruses and interferon: a fight for supremacy*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(9): p. 675-87.
  65. Biron, C.A., *Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look*. Immunity, 2001. **14**(6): p. 661-4.
  66. Cousens, L.P., et al., *Interferon-alpha/beta inhibition of interleukin 12 and interferon-gamma production in vitro and endogenously during viral infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(2): p. 634-9.
  67. Le Bon, A., et al., *Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo*. Immunity, 2001. **14**(4): p. 461-70.
  68. Marrack, P., J. Kappler, and T. Mitchell, *Type I interferons keep activated T cells alive*. J Exp Med, 1999. **189**(3): p. 521-30.
  69. Ito, T., et al., *Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs*. J Immunol, 2001. **166**(5): p. 2961-9.
  70. Patterson, S., et al., *Plasmacytoid dendritic cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus type 1 infection and release infectious virus*. J Virol, 2001. **75**(14): p. 6710-3.
  71. Soumelis, V., et al., *Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients*. Blood, 2001. **98**(4): p. 906-12.
  72. Donaghy, H., et al., *Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load*. Blood, 2001. **98**(8): p. 2574-6.
  73. Ytterberg, S.R. and T.J. Schnitzer, *Serum interferon levels in patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1982. **25**(4): p. 401-6.
  74. Vallin, H., et al., *Anti-double-stranded DNA antibodies and immunostimulatory plasmid DNA in combination mimic the endogenous IFN-alpha inducer in systemic lupus erythematosus*. J Immunol, 1999. **163**(11): p. 6306-13.
  75. Coley, W.B., *The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases*. 1893. Clin Orthop Relat Res, 1991(262): p. 3-11.

- 
76. Morales, A., D. Eidinger, and A.W. Bruce, *Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors*. 1976. *J Urol*, 2002. **167**(2 Pt 2): p. 891-3; discussion 893-5.
  77. Tokunaga, T., et al., *Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity*. *J Natl Cancer Inst*, 1984. **72**(4): p. 955-62.
  78. Yamamoto, S., et al., *DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth*. *Microbiol Immunol*, 1992. **36**(9): p. 983-97.
  79. Yamamoto, T., et al., *Synthetic oligonucleotides with certain palindromes stimulate interferon production of human peripheral blood lymphocytes in vitro*. *Jpn J Cancer Res*, 1994. **85**(8): p. 775-9.
  80. Krieg, A.M., et al., *CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation*. *Nature*, 1995. **374**(6522): p. 546-9.
  81. Hartmann, G., et al., *Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo*. *J Immunol*, 2000. **164**(3): p. 1617-24.
  82. Hartmann, G. and A.M. Krieg, *Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells*. *J Immunol*, 2000. **164**(2): p. 944-53.
  83. Hacker, H., et al., *Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6*. *J Exp Med*, 2000. **192**(4): p. 595-600.
  84. Vollmer, J., et al., *Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities*. *Eur J Immunol*, 2004. **34**(1): p. 251-62.
  85. Rothenfusser, S., et al., *Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG*. *Hum Immunol*, 2002. **63**(12): p. 1111-9.
  86. Bauer, M., et al., *Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells*. *J Immunol*, 2001. **166**(8): p. 5000-7.
  87. Penna, G., S. Sozzani, and L. Adorini, *Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells*. *J Immunol*, 2001. **167**(4): p. 1862-6.
  88. Hartmann, G., et al., *Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells*. *Eur J Immunol*, 2003. **33**(6): p. 1633-41.
  89. Yi, A.K., et al., *CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species*. *J Immunol*, 1998. **160**(10): p. 4755-61.
  90. Hacker, H., *Signal transduction pathways activated by CpG-DNA*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2000. **247**: p. 77-92.
  91. Guiducci, C., et al., *Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation*. *J Exp Med*, 2006. **203**(8): p. 1999-2008.
  92. Krieg, A.M., *CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects*. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 709-60.
  93. Palucka, K. and J. Banchereau, *Linking innate and adaptive immunity*. *Nat Med*, 1999. **5**(8): p. 868-70.
  94. Krieg, A.M., *CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts?* *Nat Med*, 2003. **9**(7): p. 831-5.

- 
95. Kastenbauer, E., *Oto-Rhino-Laryngologie in Klinik und Praxis Band II: Nase, Nasennebenhöhle, Gesicht, Mundhöhle, Pharynx und Kopfspeicheldrüsen*. 1992: Georg Thieme-Verlag. S. 648-668.
  96. Berrino, F., et al., *Survival of cancer patients in europe. The eurocare study*. 1995, Lyon: IARC Scientific Publications.
  97. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(2): p. 74-108.
  98. Bertz, J.G., et al., *Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends*. 2006, Gesellschaft für epidemiologische Krebsregister in Deutschland e.V. GEKID.: Saarbrücken.
  99. Gellrich, N.-C., et al., *Empfehlungen zur standardisierten Diagnostik, Therapie und Nachsorge - Empfehlungen zu Kopf-Hals-Tumoren*. 2004, Tumorzentrum Freiburg am Universitätsklinikum: Freiburg.
  100. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2006*. CA Cancer J Clin, 2006. **56**(2): p. 106-30.
  101. Böcker/Denk/Heitz, *Pathologie*. 3. Auflage ed. 2004, München: Urban & Fischer Verlag.
  102. Sankaranarayanan, R., et al., *Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis*. Anticancer Res, 1998. **18**(6B): p. 4779-86.
  103. Mackenzie, J., et al., *Increasing incidence of oral cancer amongst young persons: what is the aetiology?* Oral Oncol, 2000. **36**(4): p. 387-9.
  104. Koch, W.M., et al., *Squamous cell carcinoma of the head and neck in the elderly*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1995. **121**(3): p. 262-5.
  105. Gillison, M.L., et al., *Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(9): p. 709-20.
  106. Shah, S.I., et al., *Two distinct regions of loss on chromosome arm 4q in primary head and neck squamous cell carcinoma*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2000. **126**(9): p. 1073-6.
  107. Titcomb, C.P., Jr., *High incidence of nasopharyngeal carcinoma in Asia*. J Insur Med, 2001. **33**(3): p. 235-8.
  108. Macfarlane, G.J., M. McCredie, and M. Coates, *Patterns of oral and pharyngeal cancer incidence in New South Wales, Australia*. J Oral Pathol Med, 1994. **23**(6): p. 241-5.
  109. Lang, S., et al., *[Clinical and epidemiological data of patients with malignomas of the head and neck]*. Laryngorhinootologie, 2002. **81**(7): p. 499-508.
  110. Inagi, K., et al., *Treatment effects in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity*. Acta Otolaryngol Suppl, 2002(547): p. 25-9.
  111. Abbas, A.K. and A.H. Lichtman, *Cellular and Molecular Immunology*. 5 ed. 2005: Elsevier Saunders. 391-410.
  112. Hadden, J.W., *The immunopharmacology of head and neck cancer: an update*. Int J Immunopharmacol, 1997. **19**(11-12): p. 629-44.
  113. Lang, S., et al., *Impairment of T-cell activation in head and neck cancer in situ and in vitro: strategies for an immune restoration*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1999. **125**(1): p. 82-8.
  114. Marincola, F.M., et al., *Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance*. Adv Immunol, 2000. **74**: p. 181-273.
  115. Wang, M.B., A. Lichtenstein, and R.A. Mickel, *Hierarchical immunosuppression of regional lymph nodes in patients with head and neck*

- 
- squamous cell carcinoma*. Otolaryngol Head Neck Surg, 1991. **105**(4): p. 517-27.
116. Molling, J.W., et al., *Low levels of circulating invariant natural killer T cells predict poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma*. J Clin Oncol, 2007. **25**(7): p. 862-8.
  117. Pak, A.S., et al., *Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34(+) cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. Clin Cancer Res, 1995. **1**(1): p. 95-103.
  118. Pandit, R., et al., *CD34+ immune suppressive cells in the peripheral blood of patients with head and neck cancer*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2000. **109**(8 Pt 1): p. 749-54.
  119. Young, M.R., et al., *Human squamous cell carcinomas of the head and neck chemoattract immune suppressive CD34(+) progenitor cells*. Hum Immunol, 2001. **62**(4): p. 332-41.
  120. Strauss, L., et al., *Dual role of VEGF family members in the pathogenesis of head and neck cancer (HNSCC): possible link between angiogenesis and immune tolerance*. Med Sci Monit, 2005. **11**(8): p. BR280-92.
  121. Young, M.R., et al., *Tumor-derived cytokines induce bone marrow suppressor cells that mediate immunosuppression through transforming growth factor beta*. Cancer Immunol Immunother, 1992. **35**(1): p. 14-8.
  122. Moore, S.C., M.A. Shaw, and L.S. Soderberg, *Transforming growth factor-beta is the major mediator of natural suppressor cells derived from normal bone marrow*. J Leukoc Biol, 1992. **52**(6): p. 596-601.
  123. Bergmann, C., et al., *Expansion of human T regulatory type 1 cells in the microenvironment of cyclooxygenase 2 overexpressing head and neck squamous cell carcinoma*. Cancer Res, 2007. **67**(18): p. 8865-73.
  124. Ito, T., et al., *Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand*. J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 105-15.
  125. Almand, B., et al., *Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(5): p. 1755-66.
  126. Tas, M.P., et al., *Depressed monocyte polarization and clustering of dendritic cells in patients with head and neck cancer: in vitro restoration of this immunosuppression by thymic hormones*. Cancer Immunol Immunother, 1993. **36**(2): p. 108-14.
  127. Cao, W., et al., *CD40 function in squamous cell cancer of the head and neck*. Oral Oncol, 2005. **41**(5): p. 462-9.
  128. Mann, E.A., et al., *Cytokine expression by head and neck squamous cell carcinomas*. Am J Surg, 1992. **164**(6): p. 567-73.
  129. Chen, Z., et al., *Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(6): p. 1369-79.
  130. Gabilovich, D.I., et al., *Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells*. Nat Med, 1996. **2**(10): p. 1096-103.
  131. Ellis, L.M. and I.J. Fidler, *Angiogenesis and metastasis*. Eur J Cancer, 1996. **32A**(14): p. 2451-60.
  132. Riedel, F., et al., *Expression of basic fibroblast growth factor protein and its down-regulation by interferons in head and neck cancer*. Head Neck, 2000. **22**(2): p. 183-9.

- 
133. Allavena, P., et al., *IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages*. Eur J Immunol, 1998. **28**(1): p. 359-69.
  134. Mocellin, S., et al., *The dual role of IL-10*. Trends Immunol, 2003. **24**(1): p. 36-43.
  135. Pries, R., et al., *Secretion of tumor-promoting and immune suppressive cytokines by cell lines of head and neck squamous cell carcinoma*. In Vivo, 2006. **20**(1): p. 45-8.
  136. Seder, R.A. and W.E. Paul, *Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 635-73.
  137. Hong, S.H., et al., *Cyclooxygenase regulates human oropharyngeal carcinomas via the proinflammatory cytokine IL-6: a general role for inflammation?* Faseb J, 2000. **14**(11): p. 1499-507.
  138. Thomas, G.R., et al., *Cytokines IL-1 alpha, IL-6, and GM-CSF constitutively secreted by oral squamous carcinoma induce down-regulation of CD80 costimulatory molecule expression: restoration by interferon gamma*. Cancer Immunol Immunother, 2004. **53**(1): p. 33-40.
  139. Oka, M., et al., *Relationship between serum levels of interleukin 6, various disease parameters and malnutrition in patients with esophageal squamous cell carcinoma*. Cancer Res, 1996. **56**(12): p. 2776-80.
  140. Hodge, D.R., E.M. Hurt, and W.L. Farrar, *The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer*. Eur J Cancer, 2005. **41**(16): p. 2502-12.
  141. Smith, C.W., et al., *The host environment promotes the development of primary and metastatic squamous cell carcinomas that constitutively express proinflammatory cytokines IL-1alpha, IL-6, GM-CSF, and KC*. Clin Exp Metastasis, 1998. **16**(7): p. 655-64.
  142. Schrey, M.P. and K.V. Patel, *Prostaglandin E2 production and metabolism in human breast cancer cells and breast fibroblasts. Regulation by inflammatory mediators*. Br J Cancer, 1995. **72**(6): p. 1412-9.
  143. Wolf, J.S., et al., *IL (interleukin)-1alpha promotes nuclear factor-kappaB and AP-1-induced IL-8 expression, cell survival, and proliferation in head and neck squamous cell carcinomas*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(6): p. 1812-20.
  144. Chen, Z., et al., *Effects of interleukin-1alpha, interleukin-1 receptor antagonist, and neutralizing antibody on proinflammatory cytokine expression by human squamous cell carcinoma lines*. Cancer Res, 1998. **58**(16): p. 3668-76.
  145. Mann, E.A., et al., *Phospholipid metabolite expression by head and neck squamous cell carcinoma*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1994. **120**(7): p. 763-9.
  146. Tan, I.B., et al., *Immunosuppressive retroviral P15E-related factors in head and neck carcinomas*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1986. **112**(9): p. 942-5.
  147. Tas, M.P., et al., *Retroviral p15E-related serum factors and recurrence of head and neck cancer*. Clin Otolaryngol Allied Sci, 1993. **18**(4): p. 324-8.
  148. Duramad, O., et al., *IL-10 regulates plasmacytoid dendritic cell response to CpG-containing immunostimulatory sequences*. Blood, 2003. **102**(13): p. 4487-92.
  149. Duffy, S.A., et al., *Interleukin-6 predicts recurrence and survival among head and neck cancer patients*. Cancer, 2008. **113**(4): p. 750-7.
  150. Riedel, F., et al., *Serum levels of interleukin-6 in patients with primary head and neck squamous cell carcinoma*. Anticancer Res, 2005. **25**(4): p. 2761-5.

- 
151. Mende, M., et al., *A hexanucleotide selected for increased cellular uptake in cis contains a highly active CpG-motif in human B cells and primary peripheral blood mononuclear cells.* Immunology, 2007. **120**(2): p. 261-72.
  152. Staehelin, T., et al., *A rapid quantitative assay of high sensitivity for human leukocyte interferon with monoclonal antibodies.* Methods Enzymol, 1981. **79**(Pt B): p. 589-95.
  153. Brocks, C.P., et al., *Functional alteration of myeloid dendritic cells through head and neck cancer.* Anticancer Res, 2007. **27**(2): p. 817-24.
  154. Bergmann, C., et al., *Expansion and characteristics of human T regulatory type 1 cells in co-cultures simulating tumor microenvironment.* Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(9): p. 1429-42.
  155. Pries, R., S. Nitsch, and B. Wollenberg, *Role of cytokines in head and neck squamous cell carcinoma.* Expert Rev Anticancer Ther, 2006. **6**(9): p. 1195-203.
  156. Ding, L., et al., *IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression.* J Immunol, 1993. **151**(3): p. 1224-34.
  157. de Waal Malefyt, R., et al., *Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression.* J Exp Med, 1991. **174**(4): p. 915-24.
  158. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells.* Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
  159. Moore, K.W., et al., *Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1.* Science, 1990. **248**(4960): p. 1230-4.
  160. Kotenko, S.V., et al., *Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10).* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(4): p. 1695-700.
  161. Liu, Y., et al., *The EBV IL-10 homologue is a selective agonist with impaired binding to the IL-10 receptor.* J Immunol, 1997. **158**(2): p. 604-13.
  162. Beckebaum, S., et al., *Increased levels of interleukin-10 in serum from patients with hepatocellular carcinoma correlate with profound numerical deficiencies and immature phenotype of circulating dendritic cell subsets.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(21): p. 7260-9.
  163. Tsukamoto, Y., et al., *Toll-like receptor 7 cooperates with IL-4 in activated B cells through antigen receptor or CD38 and induces class switch recombination and IgG1 production.* Mol Immunol, 2009.
  164. Hemmi, H., et al., *Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway.* Nat Immunol, 2002. **3**(2): p. 196-200.
  165. Klaschik, S., I. Gursel, and D.M. Klinman, *CpG-mediated changes in gene expression in murine spleen cells identified by microarray analysis.* Mol Immunol, 2007. **44**(6): p. 1095-104.
  166. Hanten, J.A., et al., *Comparison of human B cell activation by TLR7 and TLR9 agonists.* BMC Immunol, 2008. **9**: p. 39.
  167. Hartmann, G., et al., *Oligodeoxynucleotides enhance lipopolysaccharide-stimulated synthesis of tumor necrosis factor: dependence on phosphorothioate modification and reversal by heparin.* Mol Med, 1996. **2**(4): p. 429-38.
  168. Liang, H., et al., *Activation of human B cells by phosphorothioate oligodeoxynucleotides.* J Clin Invest, 1996. **98**(5): p. 1119-29.

- 
169. Ritter, U., et al., *Analysis of the CCR7 expression on murine bone marrow-derived and spleen dendritic cells*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(2): p. 472-6.
  170. Caux, C., et al., *Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines*. Springer Semin Immunopathol, 2000. **22**(4): p. 345-69.
  171. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1109-18.
  172. Wurtzen, P.A., M.H. Nissen, and M.H. Claesson, *Maturation of dendritic cells by recombinant human CD40L-trimer leads to a homogeneous cell population with enhanced surface marker expression and increased cytokine production*. Scand J Immunol, 2001. **53**(6): p. 579-87.
  173. Sallusto, F., et al., *Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products*. J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 389-400.
  174. Bender, A., et al., *Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood*. J Immunol Methods, 1996. **196**(2): p. 121-35.
  175. Jonuleit, H., et al., *Efficient transduction of mature CD83+ dendritic cells using recombinant adenovirus suppressed T cell stimulatory capacity*. Gene Ther, 2000. **7**(3): p. 249-54.
  176. Chakraborty, K., et al., *Interferon-alpha2b restores the impaired chemotactic activity of peripheral blood mononuclear cells from head and neck squamous cell carcinoma patients by modulating CXC receptor ligand interaction*. J Interferon Cytokine Res, 2008. **28**(8): p. 487-99.
  177. Asselin-Paturel, C., et al., *Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration*. J Exp Med, 2005. **201**(7): p. 1157-67.
  178. Plett, P.C., *[Peter Plett and other discoverers of cowpox vaccination before Edward Jenner]*. Sudhoffs Arch, 2006. **90**(2): p. 219-32.
  179. Koutsky, L.A., et al., *A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine*. N Engl J Med, 2002. **347**(21): p. 1645-51.
  180. Nencioni, A., et al., *Anticancer vaccination strategies*. Ann Oncol, 2004. **15 Suppl 4**: p. iv153-60.
  181. Kochenderfer, J.N. and R.E. Gress, *A comparison and critical analysis of preclinical anticancer vaccination strategies*. Exp Biol Med (Maywood), 2007. **232**(9): p. 1130-41.
  182. Bernier, J., et al., *Radioimmunoassay of leukocyte (alpha) interferon and its application to some clinical conditions*. J Nucl Med, 1984. **25**(7): p. 765-72.
  183. Grau, G.E., et al., *Serum cytokine changes in systemic vasculitis*. Immunology, 1989. **68**(2): p. 196-8.
  184. Tversky, J.R., et al., *Human blood dendritic cells from allergic subjects have impaired capacity to produce interferon-alpha via Toll-like receptor 9*. Clin Exp Allergy, 2008. **38**(5): p. 781-8.
  185. De Wit, D., et al., *Blood plasmacytoid dendritic cell responses to CpG oligodeoxynucleotides are impaired in human newborns*. Blood, 2004. **103**(3): p. 1030-2.
  186. Hughes, G.C., et al., *Cutting edge: progesterone regulates IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells*. J Immunol, 2008. **180**(4): p. 2029-33.

- 
187. Gary-Gouy, H., P. Lebon, and A.H. Dalloul, *Type I interferon production by plasmacytoid dendritic cells and monocytes is triggered by viruses, but the level of production is controlled by distinct cytokines*. J Interferon Cytokine Res, 2002. **22**(6): p. 653-9.
  188. Wu, P., et al., *TLR9/TLR7-triggered downregulation of BDCA2 expression on human plasmacytoid dendritic cells from healthy individuals and lupus patients*. Clin Immunol, 2008. **129**(1): p. 40-8.
  189. Stout-Delgado, H.W., et al., *Aging impairs IFN regulatory factor 7 up-regulation in plasmacytoid dendritic cells during TLR9 activation*. J Immunol, 2008. **181**(10): p. 6747-56.
  190. Manome, H., S. Aiba, and H. Tagami, *Simple chemicals can induce maturation and apoptosis of dendritic cells*. Immunology, 1999. **98**(4): p. 481-90.
  191. Vital, A.L., et al., *The sensitizers nickel sulfate and 2,4-dinitrofluorobenzene increase CD40 and IL-12 receptor expression in a fetal skin dendritic cell line*. Biosci Rep, 2004. **24**(3): p. 191-202.
  192. Boisleve, F., et al., *Nickel and DNCB induce CCR7 expression on human dendritic cells through different signalling pathways: role of TNF-alpha and MAPK*. J Invest Dermatol, 2004. **123**(3): p. 494-502.
  193. Berghofer, B., et al., *Natural and synthetic TLR7 ligands inhibit CpG-A- and CpG-C-oligodeoxynucleotide-induced IFN-alpha production*. J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4072-9.
  194. Marshall, J.D., et al., *Negative regulation of TLR9-mediated IFN-alpha induction by a small-molecule, synthetic TLR7 ligand*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(3): p. 497-508.
  195. Kerkmann, M., et al., *Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells*. J Immunol, 2003. **170**(9): p. 4465-74.
  196. Waibler, Z., et al., *Excessive CpG 1668 stimulation triggers IL-10 production by cDC that inhibits IFN-alpha responses by pDC*. Eur J Immunol, 2008. **38**(11): p. 3127-37.
  197. Bollrath, J., et al., *gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis*. Cancer Cell, 2009. **15**(2): p. 91-102.
  198. Sparano, A., et al., *Modulation of Th1 and Th2 cytokine profiles and their association with advanced head and neck squamous cell carcinoma*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2004. **131**(5): p. 573-6.
  199. Zhao, Q., et al., *Comparison of cellular binding and uptake of antisense phosphodiester, phosphorothioate, and mixed phosphorothioate and methylphosphonate oligonucleotides*. Antisense Res Dev, 1993. **3**(1): p. 53-66.
  200. Temsamani, J., et al., *Cellular uptake of oligodeoxynucleotide phosphorothioates and their analogs*. Antisense Res Dev, 1994. **4**(1): p. 35-42.
  201. Perez, J.R., et al., *Sequence-independent induction of Sp1 transcription factor activity by phosphorothioate oligodeoxynucleotides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(13): p. 5957-61.
  202. Wang, W., et al., *Sequence-independent inhibition of in vitro vascular smooth muscle cell proliferation, migration, and in vivo neointimal formation by phosphorothioate oligodeoxynucleotides*. J Clin Invest, 1996. **98**(2): p. 443-50.

- 
203. Rockwell, P., et al., *Cell-surface perturbations of the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor receptors by phosphorothioate oligodeoxynucleotides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(12): p. 6523-8.
  204. Yuen, A.R. and B.I. Sikic, *Clinical studies of antisense therapy in cancer*. Front Biosci, 2000. **5**: p. D588-93.
  205. Krieg, A.M., *Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(6): p. 471-84.
  206. Dalpke, A.H., et al., *Phosphodiester CpG oligonucleotides as adjuvants: polyguanosine runs enhance cellular uptake and improve immunostimulative activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in vitro and in vivo*. Immunology, 2002. **106**(1): p. 102-12.
  207. Haas, T., et al., *Sequence independent interferon-alpha induction by multimerized phosphodiester DNA depends on spatial regulation of Toll-like receptor-9 activation in plasmacytoid dendritic cells*. Immunology, 2009. **126**(2): p. 290-8.
  208. Moseman, E.A., et al., *Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells*. J Immunol, 2004. **173**(7): p. 4433-42.
  209. Pasare, C. and R. Medzhitov, *Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1033-6.
  210. Kubo, T., et al., *Regulatory T cell suppression and anergy are differentially regulated by proinflammatory cytokines produced by TLR-activated dendritic cells*. J Immunol, 2004. **173**(12): p. 7249-58.
  211. Veldhoen, M., et al., *TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells*. Immunity, 2006. **24**(2): p. 179-89.
  212. Wingender, G., et al., *Systemic application of CpG-rich DNA suppresses adaptive T cell immunity via induction of IDO*. Eur J Immunol, 2006. **36**(1): p. 12-20.
  213. Mellor, A.L., et al., *Cutting edge: CpG oligonucleotides induce splenic CD19+ dendritic cells to acquire potent indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent T cell regulatory functions via IFN Type 1 signaling*. J Immunol, 2005. **175**(9): p. 5601-5.
  214. Link, B.K., et al., *Oligodeoxynucleotide CpG 7909 delivered as intravenous infusion demonstrates immunologic modulation in patients with previously treated non-Hodgkin lymphoma*. J Immunother, 2006. **29**(5): p. 558-68.
  215. Chen, Z.M., et al., *IL-10 and TGF-beta induce alloreactive CD4+CD25- T cells to acquire regulatory cell function*. Blood, 2003. **101**(12): p. 5076-83.
  216. Wennerberg, J., *Predicting response to therapy of squamous cell carcinoma of the head and neck (review)*. Anticancer Res, 1996. **16**(4C): p. 2389-96.
  217. Forastiere, A.A., *Overview of platinum chemotherapy in head and neck cancer*. Semin Oncol, 1994. **21**(5 Suppl 12): p. 20-7.
  218. Wenig, B.L., et al., *Photodynamic therapy in the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1990. **116**(11): p. 1267-70.
  219. Donaldson, R.C., *Chemoimmunotherapy for cancer of the head and neck*. Am J Surg, 1973. **126**(4): p. 507-12.
  220. Taylor, S.G.t., et al., *A randomized trial of adjuvant BCG immunotherapy in head and neck cancer*. Arch Otolaryngol, 1983. **109**(8): p. 544-9.

- 
221. Cheng, V.S., et al., *Clinical trial of Corynebacterium parvum (intra-lymph-node and intravenous) and radiation therapy in the treatment of head and neck carcinoma*. *Cancer*, 1982. **49**(2): p. 239-44.
  222. Wanebo, H.J., et al., *Randomized trial of levamisole in patients with squamous cancer of the head and neck: a preliminary report*. *Cancer Treat Rep*, 1978. **62**(11): p. 1663-9.
  223. Knox, J.J., et al., *A Phase I trial of prolonged administration of lovastatin in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck or of the cervix*. *Eur J Cancer*, 2005. **41**(4): p. 523-30.
  224. Kitahara, S., et al., *Inhibition of head and neck metastatic and/or recurrent cancer by local administration of multi-cytokine inducer OK-432*. *J Laryngol Otol*, 1996. **110**(5): p. 449-53.
  225. Michaluart, P., et al., *Phase I trial of DNA-hsp65 immunotherapy for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Cancer Gene Ther*, 2008. **15**(10): p. 676-84.
  226. Whiteside, T.L., *Immunobiology and immunotherapy of head and neck cancer*. *Curr Oncol Rep*, 2001. **3**(1): p. 46-55.
  227. Tahara, H., et al., *IL-12 gene therapy using direct injection of tumors with genetically engineered autologous fibroblasts*. *Hum Gene Ther*, 1995. **6**(12): p. 1607-24.
  228. Hoffmann, T.K., et al., *p53 as an immunotherapeutic target in head and neck cancer*. *Adv Otorhinolaryngol*, 2005. **62**: p. 151-60.
  229. Cortesina, G., et al., *The effect of preoperative local interleukin-2 (IL-2) injections in patients with head and neck squamous cell carcinoma. An immunological study*. *Acta Otolaryngol*, 1991. **111**(2): p. 428-33.
  230. Vlock, D.R., et al., *Phase Ib trial of the effect of peritumoral and intranodal injections of interleukin-2 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: an Eastern Cooperative Oncology Group trial*. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol*, 1994. **15**(2): p. 134-9.
  231. Wollenberg, B., et al., *Gene therapy--phase I trial for primary untreated head and neck squamous cell cancer (HNSCC) UICC stage II-IV with a single intratumoral injection of hIL-2 plasmids formulated in DOTMA/Chol*. *Hum Gene Ther*, 1999. **10**(1): p. 141-7.
  232. Ilic, D., et al., *Application of human leucocyte interferon in patients with tumours of the head and neck*. *Lancet*, 1981. **1**(8228): p. 1025-7.
  233. Vlock, D.R., et al., *Preliminary trial of nonrecombinant interferon alpha in recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Head Neck*, 1991. **13**(1): p. 15-21.
  234. Richtsmeier, W.J., et al., *Phase I-II study of advanced head and neck squamous cell carcinoma patients treated with recombinant human interferon gamma*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1990. **116**(11): p. 1271-7.
  235. Barrera, J.L., et al., *Combination immunotherapy of squamous cell carcinoma of the head and neck: a phase 2 trial*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2000. **126**(3): p. 345-51.
  236. Ishikawa, T., et al., *Adoptive immunotherapy for head and neck cancer with killer cells induced by stimulation with autologous or allogeneic tumour cells and recombinant interleukin-2*. *Acta Otolaryngol*, 1989. **107**(5-6): p. 346-51.
  237. Soulieres, D., et al., *Multicenter phase II study of erlotinib, an oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent or metastatic squamous cell cancer of the head and neck*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(1): p. 77-85.

- 
238. To, W.C., et al., *Systemic adoptive T-cell immunotherapy in recurrent and metastatic carcinoma of the head and neck: a phase 1 study*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2000. **126**(10): p. 1225-31.
239. Riechelmann, H., et al., *Phase I trial with the CD44v6-targeting immunoconjugate bivatuzumab mertansine in head and neck squamous cell carcinoma*. Oral Oncol, 2008. **44**(9): p. 823-9.
240. Herold-Mende, C., et al., *Antitumor immunization of head and neck squamous cell carcinoma patients with a virus-modified autologous tumor cell vaccine*. Adv Otorhinolaryngol, 2005. **62**: p. 173-83.
241. Borjesson, P.K., et al., *Phase I therapy study with (186)Re-labeled humanized monoclonal antibody BIWA 4 (bivatuzumab) in patients with head and neck squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(10 Pt 2): p. 3961S-72S.
242. Colnot, D.R., et al., *Radioimmunotherapy in patients with head and neck squamous cell carcinoma: initial experience*. Head Neck, 2001. **23**(7): p. 559-65.
243. Vlock, D.R., et al., *Phase II trial of interferon-alpha in locally recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: immunological and clinical correlates*. J Immunother Emphasis Tumor Immunol, 1996. **19**(6): p. 433-42.
244. Schrijvers, D., et al., *Phase III trial of modulation of cisplatin/fluorouracil chemotherapy by interferon alfa-2b in patients with recurrent or metastatic head and neck cancer*. Head and Neck Interferon Cooperative Study Group. J Clin Oncol, 1998. **16**(3): p. 1054-9.
245. Shin, D.M., et al., *Combined interferon-alfa, 13-cis-retinoic acid, and alpha-tocopherol in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma: novel bioadjuvant phase II trial*. J Clin Oncol, 2001. **19**(12): p. 3010-7.
246. Karcher, J., et al., *Antitumor vaccination in patients with head and neck squamous cell carcinomas with autologous virus-modified tumor cells*. Cancer Res, 2004. **64**(21): p. 8057-61.
247. Postema, E.J., et al., *Dosimetric analysis of radioimmunotherapy with 186Re-labeled bivatuzumab in patients with head and neck cancer*. J Nucl Med, 2003. **44**(10): p. 1690-9.
248. Bauer, S., et al., *Structure-activity profiles of Ab-derived TNF fusion proteins*. J Immunol, 2006. **177**(4): p. 2423-30.
249. Davis, H.L., et al., *CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen*. J Immunol, 1998. **160**(2): p. 870-6.
250. Hamilton, J.A., *Nondisposable materials, chronic inflammation, and adjuvant action*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(6): p. 702-12.
251. Brazolot Millan, C.L., et al., *CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15553-8.
252. Kovarik, J. and C.A. Siegrist, *The search for novel adjuvants for early life vaccinations: can "danger" motifs show us the way?* Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2001. **49**(3): p. 209-15.
253. Cooper, C.L., et al., *CPG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B HBV vaccine in healthy adults: a double-blind phase I/II study*. J Clin Immunol, 2004. **24**(6): p. 693-701.
254. Weiner, G.J., et al., *Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10833-7.

- 
255. van Ojik, H.H., et al., *CpG-A and B oligodeoxynucleotides enhance the efficacy of antibody therapy by activating different effector cell populations*. *Cancer Res*, 2003. **63**(17): p. 5595-600.
256. Moga, E., et al., *NK cells stimulated with IL-15 or CpG ODN enhance rituximab-dependent cellular cytotoxicity against B-cell lymphoma*. *Exp Hematol*, 2008. **36**(1): p. 69-77.
257. Wang, H., et al., *Immunomodulatory oligonucleotides as novel therapy for breast cancer: pharmacokinetics, in vitro and in vivo anticancer activity, and potentiation of antibody therapy*. *Mol Cancer Ther*, 2006. **5**(8): p. 2106-14.
258. Jahrsdorfer, B., et al., *CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens*. *J Leukoc Biol*, 2001. **69**(1): p. 81-8.
259. Bourquin, C., et al., *Immunotherapy with dendritic cells and CpG oligonucleotides can be combined with chemotherapy without loss of efficacy in a mouse model of colon cancer*. *Int J Cancer*, 2006. **118**(11): p. 2790-5.
260. Heckelsmiller, K., et al., *Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy*. *Eur J Immunol*, 2002. **32**(11): p. 3235-45.
261. Shankaran, V., et al., *IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. *Nature*, 2001. **410**(6832): p. 1107-11.
262. Carpentier, A.F., et al., *Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice*. *Cancer Res*, 1999. **59**(21): p. 5429-32.
263. Carpentier, A.F., et al., *Successful treatment of intracranial gliomas in rat by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(6): p. 2469-73.
264. Kawarada, Y., et al., *NK- and CD8(+) T cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides*. *J Immunol*, 2001. **167**(9): p. 5247-53.
265. Stoeter, D., et al., *Extensive necrosis of visceral melanoma metastases after immunotherapy*. *World J Surg Oncol*, 2008. **6**: p. 30.
266. Parronchi, P., et al., *Phosphorothioate oligodeoxynucleotides promote the in vitro development of human allergen-specific CD4+ T cells into Th1 effectors*. *J Immunol*, 1999. **163**(11): p. 5946-53.
267. Kline, J.N., et al., *Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma*. *J Immunol*, 1998. **160**(6): p. 2555-9.
268. Sur, S., et al., *Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides*. *J Immunol*, 1999. **162**(10): p. 6284-93.
269. Van Uden, J. and E. Raz, *Immunostimulatory DNA and applications to allergic disease*. *J Allergy Clin Immunol*, 1999. **104**(5): p. 902-10.
270. Simons, F.E., et al., *Selective immune redirection in humans with ragweed allergy by injecting Amb a 1 linked to immunostimulatory DNA*. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. **113**(6): p. 1144-51.
271. Cookson, W.O. and M.F. Moffatt, *Asthma: an epidemic in the absence of infection?* *Science*, 1997. **275**(5296): p. 41-2.
272. Weeratna, R.D., et al., *CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants*. *Vaccine*, 2000. **18**(17): p. 1755-62.

- 
273. Zimmermann, S., et al., *CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis*. J Immunol, 1998. **160**(8): p. 3627-30.
274. Krieg, A.M., et al., *CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to Listeria monocytogenes challenge*. J Immunol, 1998. **161**(5): p. 2428-34.
275. Gramzinski, R.A., et al., *Interleukin-12- and gamma interferon-dependent protection against malaria conferred by CpG oligodeoxynucleotide in mice*. Infect Immun, 2001. **69**(3): p. 1643-9.
276. Krieg, A.M., *Antiinfective applications of toll-like receptor 9 agonists*. Proc Am Thorac Soc, 2007. **4**(3): p. 289-94.
277. Klinman, D.M., *Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(4): p. 249-58.
278. Woods, K.V., et al., *Variable expression of cytokines in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines and consistent expression in surgical specimens*. Cancer Res, 1998. **58**(14): p. 3132-41.
279. Zeuzem, S., C. Welsch, and E. Herrmann, *Pharmacokinetics of peginterferons*. Semin Liver Dis, 2003. **23 Suppl 1**: p. 23-8.
280. Weidle, U. and C. Weissmann, *The 5'-flanking region of a human IFN-alpha gene mediates viral induction of transcription*. Nature, 1983. **303**(5916): p. 442-6.
281. Wilhelm, W., et al., *Monocyte deactivation in severe human sepsis or following cardiopulmonary bypass*. Shock, 2002. **17**(5): p. 354-60.
282. Grundmann, U., et al., *Endotoxin desensitization of human mononuclear cells after cardiopulmonary bypass: role of humoral factors*. Anesthesiology, 2000. **93**(2): p. 359-69.

## 7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Frau Prof. Dr. med. Barbara Wollenberg bedanke ich mich für das Überlassen des Themas, sowie für die Unterstützung und Möglichkeit, in einer engagierten sowie freundschaftlichen Atmosphäre zu forschen und die Ergebnisse auf Kongressen und in wissenschaftlichen Zeitschriften zu präsentieren.

Für die kontinuierliche Betreuung, Motivation und die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten möchte ich meinem Betreuer Dr. rer. nat. Ralph Pries danken.

Christine Riebe, Sandra Wulff, Anne Schott, Christian Meyer und Annette Thiel – danke ich für den vielen Spaß im Labor, ihre Hilfsbereitschaft und Zusammenarbeit bei wissenschaftlichen und sonstigen Problemen. Ohne Euch hätte ich den „gelben Umschlag“ niemals gefunden. Besonderer Dank gilt auch Frau Brigitte Wollmann und Frau Ewelina Szymanski, die mir bei der methodischen Arbeit immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Einen besonderen Dank möchte ich auch an alle Blutspender der Blutspendezentrale der Transfusionsmedizin des UKSH Campus Lübeck und deren Mitarbeiter richten. Ohne diese Blutspenden und die gute Zusammenarbeit wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Für das Korrekturlesen bedanke ich mich bei allen, die sich dafür mehr oder minder freiwillig bereit erklärt haben und bei Kathrin und Martin für die Hilfe im manchmal finsternen Excel-Wald.

Meinen Freunden und meiner Familie danke ich sehr für die Unterstützung, die Geduld während der Anfertigung und vor allem der Niederschrift dieser Dissertation.

Allen ganz herzlichen Dank!

## 8 Veröffentlichungen

### Originalarbeiten:

Thiel, A., Pries, R., **Jeske S.**, Trenkle T., Wollenberg B., *Effect of head and neck cancer supernatant and CpG-oligonucleotides on migration and IFN-alpha production of plasmacytoid dendritic cells.* Anticancer Res, 2009. **29**(8): p. 3019-25.

**Jeske, S.**, Pries, R., Wollenberg B., *CpG induced IFN- $\alpha$  production of plasmacytoid dendritic cells - time and dose dependence and the effect of structural modifications.* submitted

**Jeske, S.**, Pries, R., Wollenberg B., *The influence of IL-10 in Human Squamous Head and Neck Cancer microenvironment on the secretion of IFN- $\alpha$  by plasmacytoid dendritic cells.* submitted

### Präsentationen:

Thiel A., **Jeske S.**, Pries R., Wollenberg B., *HNSCC entkoppelt verschiedene Immunfunktionen bei plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC);* 77.Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie e.V., Mannheim 2006; Posterpräsentation

**Jeske S.**, Pries R., Wollenberg B., *Immunstimulation plasmazytoider dendritischer Zellen in Kopf-Hals Tumoren durch CpG-ODN;* 78.Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie e.V., München 2007; Posterpräsentation

**Jeske S.**, Pries R., Wollenberg B., *Kopf-Hals-Karzinome beeinträchtigen die Immunfunktionen von dendritischen Zellen;* 1. Doktorandentag der Universität zu Lübeck, Lübeck 2007; Posterpräsentation

**Jeske S.**, Pries R., Wollenberg B., *Modulation der IFN- $\alpha$  Produktion plasmazytoider dendritischer Zellen durch maligne Kopf-Hals Tumore*; 80.Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie e.V., Rostock 2009; Posterpräsentation

**Jeske S.**, Pries R., Wollenberg B., *Charakterisierung der IFN- $\alpha$  Sekretion von pDCs im HNSCC Milieu und Immunmodulation durch CpG ODN Motive*; 81.Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie e.V., Ulm 2010; Vortrag

**Jeske S.**, Pries R., Wollenberg B., *Immunmodulation plasmazytoider dendritischer Zellen durch lösliche Faktoren im Mikromilieu von Kopf-Hals-Tumoren*; 82.Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie e.V., Freiburg 2011; Posterpräsentation

**Jeske S.**, Pries R., Wollenberg B., *Induktion einer Immuntoleranz durch lösliche Faktoren im HNSCC Tumormilieu*; 2. Symposium zur experimentellen und klinischen Forschung in der Kopf-Hals-Onkologie, Lübeck 2012; Posterpräsentation

## 9 Anhang

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die drei definierten Klassen der CpG ODN Motive.....	17
Abbildung 2 <sup>[94]</sup> : Wirkung von CpG auf das Immunsystem. ....	19
Abbildung 3: IFN- $\alpha$ ELISA Standardkurve mit polynomischer Regression .....	41
Abbildung 4: Zusammenhang zwischen der zugegebenen Menge an CpG ODN 2216 und dem Anstieg der IFN- $\alpha$ Sekretion .....	48
Abbildung 5: IFN- $\alpha$ Ausschüttung als Reaktion auf verschiedenen Klassen CpG ODN in pg/ml .....	50
Abbildung 6: Verlauf der IFN- $\alpha$ Ausschüttung nach Inkubationsbeginn mit CpG 2216 .....	52
Abbildung 7: Verlauf der IFN- $\alpha$ Konzentration [pg/ml] im pDC Zellkulturüberstand in Relation zur Inkubationszeit mit.....	53
Abbildung 8: Auswirkung von HNSCC auf die CpG induzierte IFN- $\alpha$ Sekretion.....	56
Abbildung 9: Unterschiede des HNSCC Einflusses auf die verschiedenen Klassen CpG ODN.....	58
Abbildung 10: Auswirkungen einer vorausgehenden Vorhemmung mit HNSCC Kulturüberstand auf die CpG induzierte IFN- $\alpha$ Ausschüttung.....	60
Abbildung 11: Wirkung von Interleukin-6 auf die CpG ODN 2216 induzierte IFN- $\alpha$ Sekretion .....	62
Abbildung 12: Einfluss der IL-10 Konzentration auf die CpG ODN 2216 induzierte IFN- $\alpha$ Sekretion .....	63
Abbildung 13: Wirkung von IL-10 auf die CpG ODN 2216 induzierte IFN- $\alpha$ Sekretion gesunder Spender-pDCs.....	64
Abbildung 14: Synergistischer Effekt von IL-10 und IL-6 bezüglich der Verminderung der CpG ODN 2216 induzierten IFN- $\alpha$ Sekretion .....	65
Abbildung 15: Exemplarische Darstellung der Apoptose- und Zelltoduntersuchung von pDCs unter verschiedenen Inkubationsbedingungen anhand der Versuchsreihe mit BHY Tumorüberstand im Durchflusszytometer.....	66
Abbildung 16: Wirkung des IL-10R AK auf die CpG induzierte IFN- $\alpha$ Sekretion unter HNSCC Einfluss .....	68
Abbildung 17: IFN- $\alpha$ Sekretion von pDCs in Kultur mit PBMCs.....	69

---

Abbildung 18: Expression von TLR1, TLR7 und TLR9 nach Inkubation mit HNSCC Kulturüberstand im Westernblot .....	71
Abbildung 19: TLR9 Expression unter dem Einfluss von HNSCC und CpG ODN 2216 .....	73
Abbildung 20: TLR7 Expression unter dem Einfluss von HNSCC und CpG ODN 2216 .....	74
Abbildung 21: Wachstumsverhalten von HNSCC Zelllinien unter Einfluss des IL-10R Antikörpers und den CpG ODN 2216 und 2006 .....	75
Abbildung 22: Auswirkungen der Poly-G-Modifizierung auf die IFN- $\alpha$ Sekretion von pDCs .....	76
Abbildung 23: Auswirkungen der PTO-Modifikation auf die IFN- $\alpha$ Sekretion von pDCs .....	77
Abbildung 24: Einfluss der CpG ODN Modifikation auf die Expression von CCR7....	79
Abbildung 25: Einfluss der CpG ODN Modifikation auf die Expression von CXCR3 .	80
Abbildung 26: Einfluss der CpG ODN Modifikation auf die Expression von CD40, CD80 und CD86 .....	81
Abbildung 27: Einfluss der CpG ODN Modifikation auf die Expression von TLR7 und TLR9 .....	81

## 9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Daten der in dieser Arbeit verwendeten FACS Antikörper .....	30
Tabelle 2: Daten der in dieser Arbeit verwendeten Westernblot Antikörper .....	31
Tabelle 3: Daten der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper zur Funktionsanalyse	31
Tabelle 4: Daten der in dieser Arbeit verwendeten CpG ODN .....	32
Tabelle 5: Eine Auswahl von bisher erprobten immunologischen Behandlungsansätzen bei HNSCC .....	93

### 9.3 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt wurde.

Weiterhin versichere ich, dass ich nicht vorher oder anderenorts einen Zulassungsantrag gestellt oder diese Dissertation vorgelegt habe und dass ich mich bisher keinem anderen Promotionsverfahren unterzogen habe.

Lübeck, den 02.02.2012

---

Sabrina Jeske

## 9.4 Lebenslauf

Name: Sabrina Jeske

