

Aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
der Universität zu Lübeck

Direktorin: Prof. Dr. med. B. Wollenberg

Immunmodulation myeloider dendritischer Zellen durch

Kopf-Hals-Karzinome

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät –

vorgelegt von

Bettina Hoffmann

aus Hamburg

Lübeck 2011

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

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Jan Gliemroth

Tag der mündlichen Prüfung: 21.02.2011

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 21.02.2011

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Plattenepithelkarzinome im Hals-Nasen-Ohren-Bereich.....	1
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	1
1.1.2 Karzinogenese und Tumor-Klassifikation	2
1.1.3 Diagnose, Therapie und Prognose.....	3
1.1.4 Tumor-Biologie: Angiogenese, Metastasierung und Tumor-assoziierte Antigene	4
1.2 Immunsuppression und Immunmodulation in HNSCC.....	5
1.3 Myeloide dendritische Zellen	7
1.3.1 Funktion	7
1.3.2 Differenzierung.....	9
1.3.3 Die Rolle von dendritischen Zellen bei gesunden und malignen Zellen	10
1.4 Toll-like-Rezeptoren.....	11
1.5 Die Funktion der „suppressors of cytokine signaling“-Proteine in den Zytokin- Signalkaskaden	13
1.6 Fragestellung	18
2. Material und Methoden.....	19
2.1 Zellkultur	19
2.2 Herstellung von Proteinextrakten.....	21
2.3 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	23
2.4 Western Hybridisierung.....	24
2.5 Proteinanalyse	25
2.6 Isolierung und Inkubation von MDCs	26
2.7 FACS-Analyse	29
2.8 Verwendete Software.....	31
2.9 Zustimmung der Ethikkommission	32
3. Ergebnisse	33
3.1 Expressionsanalyse von myeloiden dendritischen Zellen.....	33
3.1.1 Mit HNSCC-Überständen inkubierte myeloide dendritische Zellen zeigen eine verstärkte Toll-like-Rezeptor 7-Expression.....	33
3.1.2 Einfluss von HNSCC auf die Expression von SOCS-Protein 1 und 3 in myeloiden dendritischen Zellen.....	35
3.2 “Suppressor of cytokine signaling“-Proteine bei permanenten Tumorzelllinien	37
3.2.1 SOCS1- und SOCS3-Proteine werden auf HNSCC-Zellen exprimiert .	37
3.2.2 Die SOCS1- und SOCS3-Expression von HNSCC-Zelllinien bleibt unter IFN γ -Einwirkung konstant	39
3.2.3 SOCS1-Proteine lassen sich im Gegensatz zu SOCS3-Proteinen in der Western Hybridisierung von Tumorzelllinien nachweisen	42
4. Diskussion.....	44
4.1 HNSCC-Überstände beeinflussen das Expressionsprofil von myeloiden dendritischen Zellen.....	44
4.1.1 TLR-Expression von isolierten myeloiden dendritischen Zellen nach der Inkubation mit Tumorüberständen.....	44
4.1.2 SOCS1- und SOCS3-Expression von isolierten myeloiden dendritischen Zellen nach der Inkubation mit Tumorüberständen	48
4.2 SOCS1- und SOCS3-Expression bei permanenten Tumorzelllinien unter Zytokineinwirkung	50
5. Zusammenfassung.....	53

6. Literaturverzeichnis	55
7. Danksagung	59
8. Lebenslauf	60

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
APC	Antigen presenting cell, Antigen-präsentierende Zellen
BDCA	Human blood dendritic cell antigen
BHY	Humanes Plattenepithelkarzinom, Zunge (wenig differenziert) Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Germany #ACC 446
CD	Cluster of differentiation
DC1 und 2	Dendritische Zellen Typ 1 und 2
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt solution
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCSC	Fetales Kälberserum
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HLA	Human leucocyte antigen system
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma, Plattenepithel- karzinome im Kopf- und Halsbereich
HPV	Humanes Papillomavirus
IFN α , γ	Interferon α , γ
IL	Interleukin
IgA	Immunglobulin A
JAK	Janus-Kinase
MACS	Magnetic cell sorting of human cells
MDC	Myeloid dendritic cells, myeloide dendritische Zellen
MHC I und II	Major histocompatibility complex I und II
NAA	Non-essential amino acids
NF- κ B	Nuklear Factor- κ B
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCI 1	Humanes Plattenepithelkarzinom; Pittsburgh Cancer Institute, Hypopharynx-Karzinom
PCI 13	Humanes Plattenepithelkarzinom; Pittsburgh Cancer Institute, Larynx-Karzinom
PDC	Plasmazytoide Dendritische Zelle
Poly I:C	Polyinosinic : polycytidylic acid
PPR	Pattern of recognition receptor
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese
SOCS 1 und 3	Suppressor of cytokine signaling 1 und 3
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TCR	T-Zell-Rezeptor
TLR 1-10	Toll-like-Rezeptor 1-10
UICC	Unio internationalis contra cancrum bzw. Union Internationale Contre le Cancer
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Alle weiteren verwendeten Abkürzungen werden im Text erläutert.

1. Einleitung

1.1 Plattenepithelkarzinome im Hals-Nasen-Ohren-Bereich

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Plattenepithelkarzinome im Kopf- und Halsbereich (*Head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC) stellen weltweit die sechsthäufigsten Krebserkrankungen dar [1]. Sie machen 95% der Malignome der oberen Luft- und Speisewege aus [2] und treten mit einer jährlichen Prävalenz von 50 auf 100 000 Frauen und einer doppelt so hohen bei Männern auf [3]. Jährlich werden weltweit 900 000 Fälle neu diagnostiziert [4]. Die 5-Jahres-Überlebensrate hat sich während der letzten 40 Jahre nur unwesentlich verändert [5]. Durchschnittlich liegt sie für alle Stadien und Lokalisationen bei 50% [4].

Risikofaktoren für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen sind in erster Linie langjähriger Tabak- und Alkoholabusus. Als Berufskrankheit wird das Larynx-Karzinom als Folge einer Asbestexposition und Plattenepithelkarzinome als Auswirkung von Nickel [6] anerkannt. Ebenso werden Ruß, Teer und Hitzeinwirkungen als karzinogene Noxen diskutiert. Eine schlechte Mundhygiene unterstützt die Karzinogenese in der Mundhöhle. Im Bereich des Lippenrots und der Gesichtshaut wirkt sich starke UV-Strahlung mutagen aus.

Im Nasopharynx lassen sich im betroffenen Plattenepithel häufig das Epstein-Barr-Virus (EBV) und im Serum entsprechende IgA-Antikörper nachweisen [2, 7, 8].

Insbesondere im Plattenepithelkarzinom der Tonsille ist häufig das humane Papillomavirus (HPV) gefunden worden [4], das insbesondere mit Cervixkarzinomen assoziiert ist. Allerdings wurde das HPV auch in gesunden Tonsillenzellen nachgewiesen. Eine HPV-Infektion alleine führt aber nicht zwingend zur Karzinogenese [9].

Auch eine positive Familienanamnese erhöht stark das Risiko zu erkranken [5].

Selten entstehen die Malignome durch mechanische Reize, wie beispielsweise durch Zahnprothesen [7].

1.1.2 Karzinogenese und Tumor-Klassifikation

Bei der Karzinogenese handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen. Durch die unterschiedlichen Noxen kommt es zur Epithelschädigung, aus der eine Hyperplasie bzw. eine Hyperkeratose entstehen kann. Mit diesem Schritt steigt die Wahrscheinlichkeit, dass sich daraus eine Epitheldysplasie entwickelt. Hieraus kann wiederum ein Carcinoma in situ entstehen. Ist Letzteres geschehen, ist eine rückgängige Entwicklung nicht mehr möglich – im Gegensatz zu den vorhergehenden Entwicklungsstufen.

Mit dem Durchbruch der Basalmembran ist aus dem Carcinoma in situ ein invasives Karzinom entstanden, das auch metastasieren kann [2].

Während dieser Entwicklung ist ein zunehmender Verlust von Allelen zu beobachten [5].

Man unterteilt die Karzinome im Bereich des Halses und Kopfes in mehrere Hauptgruppen:

1. das Larynx-Karzinom
2. das Hypopharynx-Karzinom
3. das Nasenhöhlen- und Nasennebenhöhlen-Karzinom
4. das Nasopharynx-Karzinom
5. das orale und Oropharynx-Karzinom
6. und das Speicheldrüsen-Karzinom [10].

Die Klassifikation der HNSCC erfolgt nach der prätherapeutischen, klinischen Einteilung mit Hilfe des TNM-Systems der *Unio internationalis contra cancrum* bzw. *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC). Dieses teilt zunächst, sofern es beurteilbar ist (ansonsten Tx), das Tumorstadium in T0 bis T4 nach der Größe des Tumors bzw. seiner Ausdehnung auf Nachbarorgane ein. Bei T0 gibt es keinen Anhalt für einen Primärtumor, bei T4 liegt bereits eine Tiefeninfiltration bis auf den Muskel oder den Knochen vor.

Bei der Beurteilung der Lymphknoten (N) beschreibt N0 analog zu T0 einen Zustand, bei dem keine Metastasen in regionalen Lymphknoten entdeckt worden sind. Bei Nx sind die regionalen Lymphknoten nicht zu beurteilen. Mit dem Anstieg des Index von N1 bis N3 steigt die Größe und die Anzahl der Lymphknoten, in die

der Primärtumor metastasiert hat. Ab N2c sind bi- oder kontralaterale Halslymphknoten befallen.

Die Beurteilung der Metastasen wird folgendermaßen unterteilt: Mx bedeutet, dass Fernmetastasen nicht zu beurteilen sind. Sind keine Fernmetastasen vorhanden, entspricht dies M0, sind sie vorhanden M1.

Zudem wird mit dem Grading (G1 bis G4) der Differenzierungsgrad des Tumors beschrieben. Ist der Tumor bei G1 noch gut differenziert, so ist er bei G4 undifferenziert. Damit nimmt auch der Malignitätsgrad des Tumors zu. Die Prognose verschlechtert sich, wie auch bei der TNM-Einteilung, mit dem Anstieg der Zahlen. Bei Gx kann der Differenzierungsgrad nicht bestimmt werden [2, 7].

1.1.3 Diagnose, Therapie und Prognose

Ein Grund für die meist sehr schlechte Prognose bei Plattenepithelkarzinomen im Bereich des Kopfes und Halses ist die späte Entdeckung des Primärtumors. Dies liegt daran, dass die Symptome häufig erst im fortgeschrittenen Stadium auftreten. Oft treten als erstes wahrnehmbares Symptom bereits durch eine Metastase angeschwollene ipsi- oder bilaterale Halslymphknoten auf.

Zur Diagnostik gehören neben der klinischen und endoskopischen Untersuchung die Verwendung von bildgebenden Verfahren (Sonographie, CT und ggf. MRT), um die Ausdehnung des Tumors und der Metastasierung bestimmen zu können. Aufgrund der Feldkanzerisierung sollte immer eine Panendoskopie durchgeführt werden. Eine Probeexzision, die zur histologischen Untersuchung entnommen wird, ist dringend erforderlich um die Diagnose zu sichern. Bei Karzinomen im Bereich des Nasopharynx kann eine Bestimmung des EBV-Antikörper-Titers zur Diagnostik dazugehören.

Bei der Entscheidung über die geeignete Therapie für jeden Patienten ist das Ziel der Erhalt der individuell bestmöglichen Lebensqualität und des Funktionserhalts der Organe. Sofern es die Lokalisation und das Ausmaß des Tumors sowie der Allgemeinzustand des Patienten ermöglichen, ist die Therapie der Wahl stets die chirurgische großzügige Exzision mit tumorfreien Rändern, ggf. kombiniert mit einer aufwändigen Rekonstruktion. Abhängig vom TNM-Stadium wird sie mit einer radikalen oder funktionellen, ein- oder beidseitigen Neck dissection verbunden.

Postoperativ sollte sich eine Bestrahlung des Tumorgebietes und der drainierenden Lymphbahnen anschließen.

Sollte ein chirurgischer Eingriff nicht möglich sein, besteht die alternative Behandlung in einer Strahlentherapie, die mit einer Chemotherapie kombiniert werden kann. Im fortgeschrittenen Stadium ist die Strahlentherapie rein palliativ, sie mag jedoch im Bereich des Oropharynx und der Mundhöhle auch dazu führen, dass nach einigen Wochen Bestrahlung, der Tumor auf eine resezierbare Größe geschrumpft ist [2, 7]. Die meisten Rezidive treten binnen von zwei Jahren nach der Therapie des Primärtumors auf [2]. Daher ist eine regelmäßige Nachsorge besonders wichtig. Zu ihr gehören neben der Anamnese, der kompletten Untersuchung des HNO-Traktes und der Sonografie der Halsweichteile eine regelmäßige radiologische Untersuchung des Thorax und im Zweifelsfalle eine Panendoskopie. Wenn möglich, werden auch Rezidive reseziert, ansonsten lediglich bestrahlt.

Wie bereits erwähnt, ist die Prognose der Patienten sehr schlecht. Die beste Prognose haben Patienten mit einem Karzinom im Bereich der Glottis, da dieses durch die auftretende Heiserkeit früh bemerkt wird (5 Jahres-Überlebensrate 50-100%). Besonders schlecht sind die 5-Jahres-Überlebensraten bei Tumoren am Zungengrund (15-25%), im Bereich des Nasopharynx (15%) und im Bereich der Subglottis (1%). Dies liegt an der späten Erstdiagnose auf Grund der Symptomarmut und der schlechten optischen Einsicht [2, 7, 8].

1.1.4 Tumor-Biologie: Angiogenese, Metastasierung und Tumor-assoziierte Antigene

Ohne Blutzufuhr kann ein Tumor nicht über einen Durchmesser von 1-2mm, was ca. 10^6 Zellen entspricht, hinaus wachsen. Das Tumorstadium ist daher abhängig von der Angiogenese [11].

Auch bei der Angiogenese handelt es sich um einen mehrschrittigen Vorgang („Multi-Stepvorgang“), bei dem zunächst die extrazelluläre Matrix abgebaut wird. Es folgen die Proliferation des Endothels, die Migration und der Wiederaufbau der extrazellulären Matrix. Dabei spielen die von den Tumorzellen gebildeten Zytokine,

Vascular endothelial growth factor (VEGF), Interleukin 8 (IL-8) und *Fibroblast growth factors* (FGF 1/2) eine entscheidende Rolle.

Mit dem Ausmaß der Angiogenese ist eine erhöhte Metastasierungsrate verbunden, die wiederum mit einer verschlechterten Prognose verknüpft ist. Hierbei zeigt sich besonders ein erhöhtes Risiko für Lymphknotenmetastasen in Zusammenhang mit dem Auftreten von VEGF-A und -C [5, 12].

Die meisten HNSCC-Metastasen werden lymphogen übertragen [6]. Sie sind letztlich die Haupttodesursache der Patienten [11]. Daher ist die Prognose bei Primärtumoren in lymphatisch besonders gut drainierten Strukturen (z.B. die Subglottis) schlechter als bei schlecht drainierten, wie der Glottis [4, 6]. Am häufigsten treten Lungen- und Lebermetastasen auf. In den Knochen oder das Gehirn metastasieren die HNSCC seltener [4].

Da man davon ausgeht, dass von Beginn der Karzinogenese an Tumorzellen in den Blutkreislauf gelangen, hat man nach Tumormarkern im Serum gesucht, die diagnostische und prognostische Aussagen erlauben. Besonders die Gelatinase-Gruppen Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) und MMP-9 gelten als sensitive prognostische Marker. Sie treten, neben anderen, bei erhöhten Rezidiv- und Metastase-Raten auf. Auch erhöhte Spiegel des Adhäsionsproteins CEA (carcinoembryonales Antigen) und des Antigens SCC (*squamous cell carcinoma antigen*, Plattenepithelkarzinomantigen), einem Zucker-Eiweiß-Molekül wurden als sensitive Marker für die Überlebens- und Rezidivrate bei Ösophagus-Karzinomen gefunden [11, 13].

1.2 Immunsuppression und Immunmodulation in HNSCC

Eines der größten Probleme bei der Entwicklung von Immuntherapien, als Alternative zu den beschriebenen Therapieformen, gegen HNSCC sind die zu überwindenden Immune Escape-Mechanismen der Tumorzellen. Die besonders durch die genetische Instabilität und Heterogenität der Tumoren große Probleme bereiten.

Hierbei probiert der Tumor insbesondere der Immunabwehr durch die T-Lymphozyten zu entkommen.

Dies erreicht er zum einen dadurch, dass er durch eigene Zytokin-Produktion die T_H1 -Zytokine herunterreguliert. Zu ihnen gehören beispielsweise Interferon γ (IFN γ), Interleukin-2 (IL-2) und IL-12. So kommt es stattdessen zu einer verstärkten Aktivierung der T_H2 -Lymphozyten, die die humorale Abwehr aktivieren. Die T_H1 -Zellen würden zur Aktivierung der zellulären Immunantwort führen. Diese kann gegen Tumorzellen sehr viel effektiver genutzt werden als die humorale. Durch die Modulation des Zytokin-Profiles ist die zelluläre Immunantwort aber stark eingeschränkt [12].

Nicht nur eine beeinträchtigte Lymphozytenfunktion auch der Rückgang der absoluten Lymphozytenanzahl konnte beobachtet werden. Durch die Produktion von Prostaglandin E_2 wird die Lymphozytenproliferation inhibiert. Die Produktion weiterer immunsuppressiver Faktoren, wie dem Polypeptid p15E und Zytokinen wie dem *Transforming Growth Factor* β (TGF β), IL-10 und GM-CSF, beeinträchtigen ebenso die Immunabwehr. Eine wichtige Rolle hierbei spielt das in 80% der Fälle mutierte Gen P_{53} , bei dem es sich um ein Tumorsuppressorgen handelt und dessen Unterdrückung sich somit positiv auf die Karzinogenese auswirkt [14].

Zum anderen gibt es mehrere Gründe aus denen T-Zellen Tumorantigene nicht als solche erkennen können: Nicht alle Tumore besitzen Antigene, die deutlich als „fremd“ vom körpereigenen Immunsystem zu erkennen sind, sondern als gesunde zum Organismus gehörende erscheinen [15, 16]. Es können Adhäsions- oder kostimulierende Moleküle fehlen, die zur Aktivierung von naiven T-Zellen, bei der Präsentation von Antigenen, auf jeden Fall benötigt werden, so dass diese Antigene nun von den T-Zellen toleriert werden. Die Tumorzellen können ein oder mehrere MHC Klasse I-Moleküle verloren haben, so dass nur noch natürliche Killerzellen (NK-Zellen), nicht aber die T-Zellen, auf sie ansprechen. Es können Antigene verloren gehen, variieren oder nach, durch den Kontakt mit Antikörpern induzierter Endozytose, abgebaut werden. Außerdem gibt es noch die Beobachtung, dass sich Tumorzellen durch die Produktion von Kollagen eine physikalische Schranke errichten, die sie von der „immune surveillance“ abkapselt. Ist der Tumor so sehr gewachsen, dass er die Kollagenwand durchbricht, ist er bereits zu groß um noch vom Immunsystem aufgehalten zu werden [16].

1.3 Myeloide dendritische Zellen

1.3.1 Funktion

Bei dendritischen Zellen handelt es sich um mononukleäre Leukozyten [14], an denen sie einen Anteil von 0,1 bis 0,5% ausmachen [17]. Sie sind ebenso Antigen-präsentierende Zellen (*antigen presenting cell*, APC) wie B-Lymphozyten, Makrophagen, Epithelzellen, Astrozyten und Schwann'sche Zellen des peripheren Nervensystems [18]. Ihren Namen tragen sie aufgrund der Morphologie ihrer multiplen astförmigen Zellausläufer (*dendros*, griechisch: Baum) [17].

Dendritische Zellen entstehen im Knochenmark. Sie gelangen über die Blutbahn als Vorläuferzellen ins Organparenchym. Nur wenige bleiben als unreife, ruhende Zellen im Blutkreislauf. Im Blut oder Epithel werden sie aktiviert [18, 19].

Bei infektiösen Prozessen steigen die phagozytierende Aktivität und die Major Histocompatibility Complex- (MHC; Synonym: *human leucocyte antigen system*, HLA) Expression der dendritischen Zellen. Damit entwickeln sie sich zu reifen dendritischen Zellen. Intrazelluläre Krankheitserreger werden an MHC I gebunden präsentiert. MHC I besitzt jede kernhaltige Zelle. MHC II besitzen nur Makrophagen, B-Lymphozyten und dendritischen Zellen. Extrazelluläre Fremdstoffe und Krankheitserreger werden an MHC II gebunden, nachdem sie von der Zelle aus dem Extrazellulärraum in ein Endosom aufgenommen und hier proteolytisch gespalten worden sind. Die MHC II werden im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und über Golgi-Vesikel zu den Endosomen mit den fragmentierten Polypeptidketten transportiert, wo sie mit ihnen beladen und schließlich an der Oberfläche der dendritischen Zellen präsentiert werden. Sie sind die stärksten Antigen-präsentierenden Zellen des Organismus. Ihre Phagozytosefähigkeit ist hingegen nur gering [18, 20, 21].

Die Antigen-präsentierenden Zellen lösen sich aus dem Gewebe und wandern über die Lymphbahn in den regionalen Lymphknoten oder die Milz. Hier präsentieren sie die Antigene unreifen T-Lymphozyten im parakortikalen Gewebe der Lymphknoten oder in der weißen Pulpa der Milz. Eine dendritische Zelle kann 100 bis 3000 T-Lymphozyten aktivieren [21].

Die T-Lymphozyten sind entscheidend für die tumorspezifische Immunantwort. Sie werden nur durch die Kombination dreier Signale aktiviert. Zunächst durch die

Bindung des mit dem Antigen beladenen MHC II der dendritischen Zelle und dem T-Zell-Rezeptor (TCR) des T-Lymphozyten. Diese führt schließlich zur vermehrten Expression der dendritischen Zelle von Protein B7 (B7-1 und B7-2, die CD80 und CD86 entsprechen). Protein B7 gehört zur Familie der Immunoglobuline und ist ein kostimulierendes Molekül, ohne das die T-Zell-Aktivierung nicht ablaufen kann. Die T-Zellen werden hierdurch in die G1-Phase des Zellzyklus überführt. Das dritte Signal besteht in der Produktion der APCs von Zytokinen wie dem Wachstumsfaktor IL-2 die zur Proliferation und Differenzierung der T-Zell-Nachkommen beitragen und dem inflammatorischen $\text{INF}\gamma$, das eine MHC II-Konzentrationserhöhung bewirkt [3, 16, 18, 19].

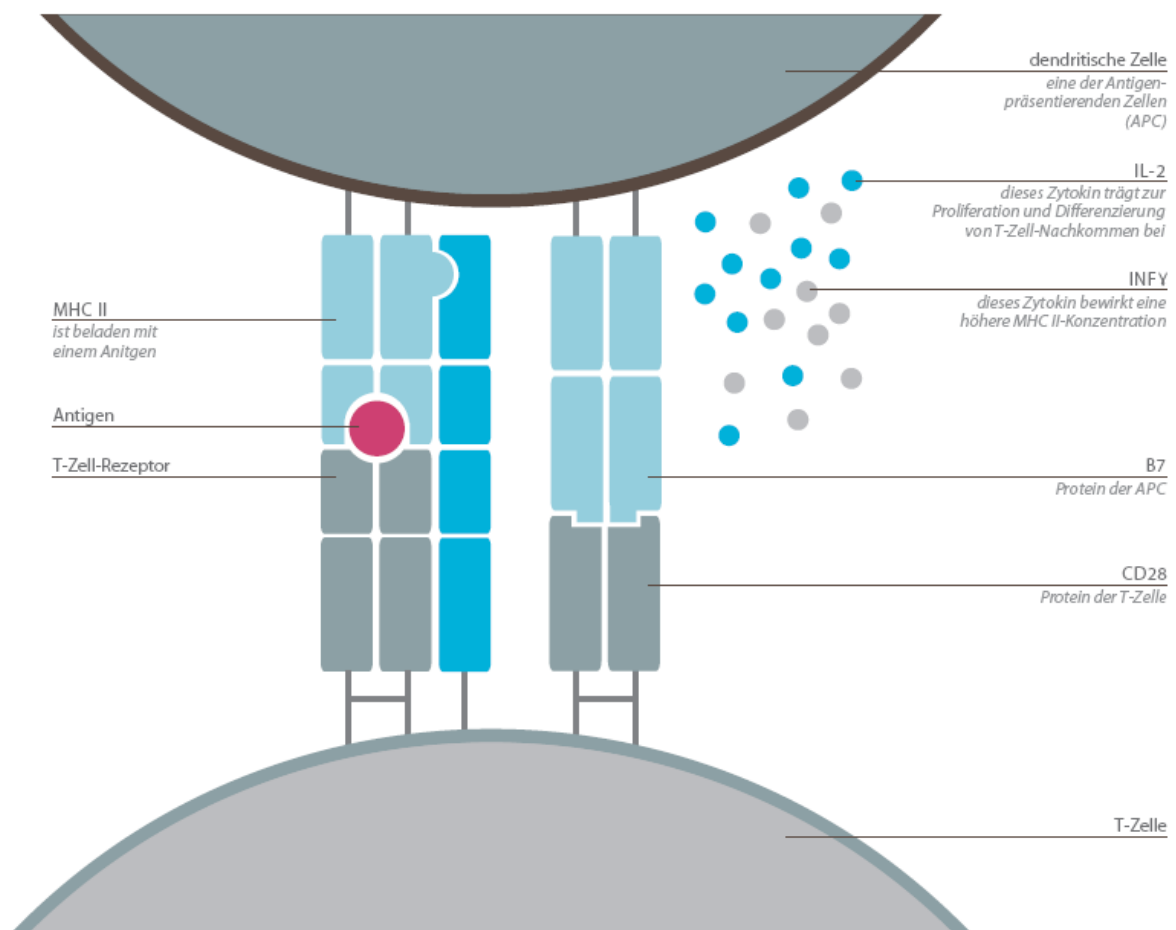


Abbildung 1: Aktivierung von naiven T-Zellen durch aktivierte, reife dendritische Zellen. Die abgekugelte dendritische Zelle präsentiert als Schleierzelle das Antigen im Lymphknoten in Anwesenheit von kostimulierenden Molekülen und Zytokinen den T-Lymphozyten. (In Anlehnungen an Abbildungen aus „Immunology“ von C. A. Janeway [16].)

1.3.2 Differenzierung

Dendritische Zellen wurden erstmals 1973 von Steinmann und Cohn in der Milz von Mäusen beschrieben [22]. Gut 10 Jahre später erkannte man, dass diese Zellen und die von dem deutschen Pathologen Paul Langerhans 1868 entdeckten [23] und nach ihm benannten Zellen der Haut einem Zellsystem angehörten [21].

Beim Menschen sind drei Subtypen der dendritischen Zellen bekannt: Die myeloiden dendritischen Zellen (MDC), die plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDC) und die Langerhans-Zellen. Sie unterscheiden sich durch ihre Funktionen und ihre charakteristischen Merkmale [17].

Myeloide dendritische Zellen haben eine gemeinsame Abstammungslinie mit Monozyten und Makrophagen. Sie haben alle die Oberflächenmarker CD33 (*cluster of differentiation*) und CD13. Abgesehen davon sind myeloide dendritische Zellen CD11c, CD83 und teilweise CD1a positiv. Sie und die Langerhans Zellen entwickeln sich aus der myeloischen Zelllinie [24, 25].

Die Langerhans Zellen, die in der Epidermis vorkommen und im Gegensatz zu den anderen beiden Subtypen der dendritischen Zellen nicht im Blut zirkulieren [26] sind CD9, CD11, CD33 und CD68 positiv, jedoch CD1a negativ.

Die plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDC, *plasmacytoid dendritic cell*) tragen ihren Namen aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit mit den Plasmazellen und da sie Marker tragen, die während der lymphoiden Entwicklung von Zellen auftreten. Ihre wichtigste physiologische Aufgabe besteht in der Produktion von antiviralem Interferon α (INF α) im Rahmen von viralen Infektionen [24, 26]. Daher werden sie auch Interferon-produzierende Zellen (*interferon-producing cells*, IPC) genannt [26]. Sie sind CD4, IL3Ra und BDCA2 positiv, jedoch, im Gegensatz zu den myeloiden dendritischen Zellen CD11c und CD1a negativ [24].

Die plasmazytoiden dendritischen Zellen werden auch Typ 2 dendritische Zellen (DC2) genannt, da sie durch das von ihnen exprimierte Zytokin-Muster (z.B. durch IL-4) bei naiven T-Zellen eine Th2-Entwicklung induzieren, die zur Entstehung von CD4⁺- T-Zellen (T-Helferzellen) führt. Analog hierzu spricht man bei myeloiden dendritischen Zellen auch von Typ1-Zellen (DC1), da ihr exprimiertes Zytokin-Muster CD8⁺ T-Lymphozyten aktiviert [18, 24].

1.3.3 Die Rolle von dendritischen Zellen bei gesunden und malignen Zellen

Die dendritischen Zellen sind die Nahtstelle zwischen der angeborenen Immunität, zu der sie selber gehören und der erworbenen Immunität, die sie induzieren [16]. Nur die aktivierten dendritischen Zellen führen jedoch zur Aktivierung der naiven T-Zellen. Nichtaktivierte dendritische Zellen, die gelegentlich ebenfalls den Gewebeverband verlassen, passieren den Lymphknoten ohne naive T-Zellen zu aktivieren. Sie tragen damit zur Toleranz der präsentierten Antigene bei und unterdrücken damit möglicherweise im gesunden Gewebe das Auftreten von pathologischen Autoimmunprozessen [17].

Indem die dendritischen Zellen naiven T-Zellen Antigene präsentieren, haben sie die einzigartige Möglichkeit eine Tumor-gerichtete, effektive T-Zell-Antwort zu induzieren [27]. Tumorgewebe ist stark von Immunzellen infiltriert. Die INF α -produzierenden plasmazytoiden dendritischen Zellen sind zwar vorhanden, sind aber in ihrer Funktion deutlich eingeschränkt, was möglicherweise auf eine Herunterregulation des Toll like Rezeptors 9 (TLR9) zurückgeführt wird. Dies wäre ein deutlicher Vorteil für den Tumor: INF α ist eines der potentesten Antitumor-Zytokine, welches auch in der Routine-Therapie verwendet wird. Abgesehen davon scheint die Antigen präsentierende Funktion der dendritischen Zellen eingeschränkt zu sein, was dazu führt, dass sie eine Toleranz des Immunsystems gegenüber den Tumorzellen fördern. Es zeigte sich, dass die plasmazytoiden dendritischen Zellen eine Th2-Antwort bewirken, was den Tumor gleichzeitig vor einer effektiven, gegen ihn gerichteten Th1-Zellantwort schützt [26].

Myeloide dendritische Zellen wurden bei Tumor-Patienten in verringerter Zahl gefunden. Immunsuppressive, unreife dendritische Zellen und CD34⁺-Vorläufer-Zellen sind beschrieben worden [14]. Aus den CD34⁺-Vorläufer-Zellen lassen sich in vitro sämtliche Subtypen der dendritischen Zellen generieren [24]. Ferner zeigen sich häufig in HNSCC qualitative und quantitative Veränderungen der Antigen verarbeitenden Moleküle, der MHC und der kostimulatorischen Moleküle [14, 15].

Trotzdem liegt der Fokus bei der Suche nach einer Immuntherapie oder Impfung für HNSCC-Patienten insbesondere auf myeloiden dendritischen Zellen aufgrund ihrer besonderen Antigen präsentierenden Eigenschaften bei Tumor-Antigenen und ihrer Fähigkeit zur CD8⁺-Zell-Induktion, womit sie den plasmazytoiden dendritischen Zellen überlegen sind [27].

Erschwerend kommt die erhöhte Sensibilität der CD8⁺-Zellen zur Apoptose hinzu [15].

1.4 Toll-like-Rezeptoren

Beim Menschen sind 10 Subtypen der Toll-like-Rezeptoren, TLR 1 bis 10, bekannt [28]. Bei anderen Säugetieren, wie beispielsweise der Maus, kennt man insgesamt 13 [29]. Sie tragen ihren Namen aufgrund der Ähnlichkeit zu den, bei der Fruchtfliege *Drosophila* gefundenen, Toll-Proteinen und zu der humanen IL-1-Rezeptor-Familie.

Es handelt sich bei den TLRs um eine Familie der Mustererkennenden-Rezeptoren (*pattern of recognition*, PPRs) [3, 30]. Sie spielen eine entscheidende Rolle, indem sie bestimmte molekulare Motive auf infektiösen Antigenen, Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) erkennen [31]. Zu diesen Motiven gehören Strukturen, die für das Überleben der zugehörigen Mikroorganismen wichtig und spezifisch sind. Daher haben sie sich im Laufe der Evolution kaum verändert [32, 33].

Die TLRs gehören zu den ersten Zellbestandteilen, die im Organismus auftretende Pathogene erkennen [34]. Sie sind bedeutend für die Aktivierung des angeborenen Immunsystems [31, 35, 36] und durch Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen und deren Zytokinproduktion auch für die des erworbenen Immunsystems [32].

Sie werden ubiquitär, auf verschiedensten Zellen exprimiert. Neben u.a. Herz-, Gehirn-, Lungen-, Milz-, Plazenta- und Pankreasgewebe sind sie in den peripheren Blutlymphozyten nachgewiesen. Jedoch unterscheidet sich das Expressionsspektrum der unterschiedlichen Zellen, wie die Tabelle 1 genauer veranschaulicht [3].

TLRs bewirken die Aktivierung und Reifung von dendritischen Zellen, was dazu führt, dass diese aus der Peripherie in die lokalen Lymphknoten wandern und kostimulierende Moleküle (Protein B7-1 und Protein B7-2) exprimieren, ohne die keine T-Zell-Aktivierung stattfindet. Der exprimierte TLR-Typ beeinflusst des Weiteren die durch ihn ausgelöste Zytokin-Sekretion der dendritischen Zellen. Diese wiederum beeinflusst die Differenzierung der zu aktivierenden naiven T-Zellen in Th1- oder Th2-Zellen. Eine erhöhte TLR2- oder TLR5-Expression führt

zu einer Th2-Antwort. Diese ist durch die hervorgerufene IL-4- und IL-13-Produktion an allergischen Reaktionen und der Immunantwort auf Helminthen beteiligt. Die meisten TLRs unterstützen jedoch die Th1-Antwort. Diese bewirkt durch die Sekretion von IFN γ und anderen Stoffen eine antivirale und antibakterielle Immunantwort [3, 32].

Table 1: mRNA-Expression von TLRs in unterschiedlichen Zellen.

++ :starke TLR-mRNA-Expression, - : keine TLR-mRNA-Expression [3, 31, 37, 38].

	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9	TLR10
Myeloide DC	++	++	++	-	+	++	+/-	++	-	+
Plasmazytoide DC	+	-	-	-	-	++	++	-	++	+
Monozyten	++	++	-	++	++	++	+	++	-	+
Makrophagen	+	+	-/+	+	+	+	-/+	++		
B-Zellen	++	+		+		++	++		++	++
T-Zellen	+		+	(+)	+				(+)	
NK-Zellen	++	+	+		+	+			+	

1998 wurde als erster Toll-like-Rezeptor TLR4 als Signal-Überträger für Lipopolysaccharide identifiziert. Zu den weiteren unterschiedlichen PAMPs, die von den TLRs erkannt werden gehören: Tri-Acyl Lipopeptide (wird von TLR1 in Assoziation mit TLR2 erkannt), bakterielle Lipoproteine, Peptidoglykane und Lipoteichonsäure (wird von TLR2 erkannt), Doppelstrang-RNA (durch TLR3), Flagellin (durch TLR5), Di-Acyl-Lipopeptide (durch TLR6 in Assoziation mit TLR2), virale Einzelstrang-RNA (wird durch TLR7 und TLR8 erkannt), unmethylierte CpG DNA (durch TLR9) und Doppelstrang-DNA (durch TLR9). TLR7 und TLR8 erkennen ebenso synthetische Komponenten, die strukturelle Ähnlichkeiten mit Nukleinsäuren haben, wie Imidazoquinoline. Es sind keine Liganden von TLR10 bekannt [3, 29, 39]. Myeloide dendritische Zellen erkennen bakterielle, virale und Pilz-Antigene [3].

Die Mitglieder der TLR-Familie sind charakterisiert durch extrazelluläre Leucinreiche Repeat-Domänen und eine intrazelluläre Toll- bzw. IL-1-Rezeptor-ähnliche Domäne (Toll/IL-1R-Domäne, TIR-Domäne) [30, 40, 41]. Diese vermitteln die

Interaktion zwischen dem Andocken der Liganden und der intrazellulären Signal-Kaskade [30], über das Adaptermolekül MyD88 (*myeloid differentiation primary-response protein 88*), die IL-1R-assoziierte Kinase (IRAK), den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF6) und die Transkriptionsfaktoren NF-κB (nuclear factor-κB) bzw. interferon regulatory factor 3 [34, 39]. Die Signal-Kaskade ist für die meisten TLRs identisch [39].

Bei den Liganden der TLR handelt es sich nicht nur um die erwähnten mikrobiellen Substanzen, sondern auch um endogene, entartete Substanzen, die neben Infektionen Gewebsverletzungen oder -neoplasmen bedeuten können [30, 39, 42, 43].

Das Blockieren oder Verstärken der TLR-Funktion kann zu einer Veränderung der Th1/Th2-Balance und damit zu Störungen im Immunsystem führen, die zu Tumoren, Allergien (wie Asthma bronchiale) und Autoimmunität (beispielsweise systemischer Lupus erythematoses) führen können [32].

Man hofft hier einen Angriffspunkt, in Form der TLRs, gefunden zu haben, über deren Aktivierung man das Immunsystem beeinflussen kann. Dies versucht man sich in Bezug auf die Immuntherapie bei Tumorkranken zu Nutzen zu machen [44].

Auch auf Tumorzellen sind TLRs gefunden worden [28, 43, 45]. Ebenso wie in gesunden Zellen induzieren sie die Zellapoptose, was ein weiterer möglicher Angriffspunkt für die Tumormuntherapie sein kann. Ihre alleinige Expression scheint nicht zur Apoptose zu führen [28]. Auf der anderen Seite scheinen sie aber auch, abhängig von weiteren Bedingungen, das Überleben der Tumorzellen schützen zu können [28, 43].

1.5 Die Funktion der „suppressors of cytokine signaling“-Proteine in den Zytokin-Signalkaskaden

Zytokine sind Polypeptide, die über kurze Distanzen auto- und parakrine Wirkungen auf die Genregulation ihrer Zielzellen haben. Sie werden nach auslösenden Noxen von verschiedenen Zellen schnell synthetisiert und freigesetzt. Zu ihnen gehören neben Wachstumsfaktoren Interleukine, Interferone und Chemokine. Ihre Wirkung erreichen sie bereits im nano- und pikomolaren

Bereich. Sie induzieren Differenzierung, Proliferation, Migration und Apoptose der Zellen. Dadurch sind Zytokine ein wesentlicher Bestandteil des angeborenen und des erworbenen Immunsystems.

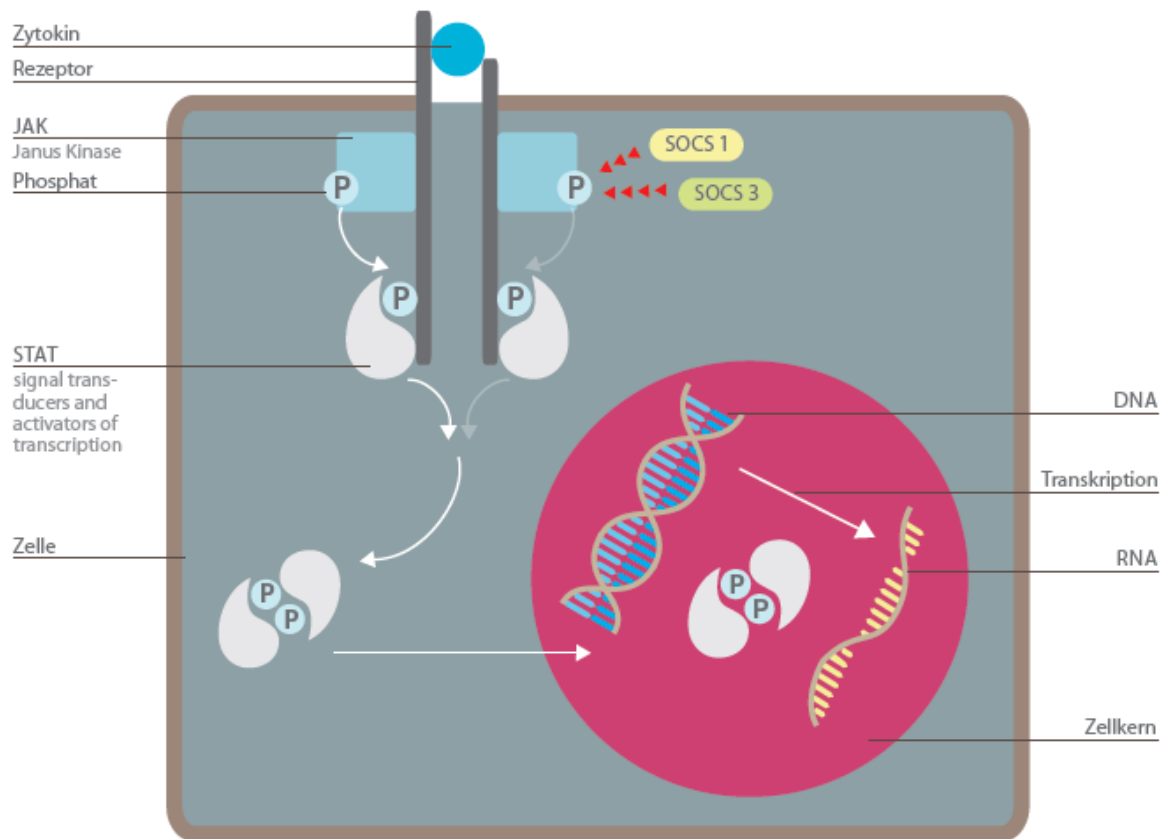


Abbildung 2: Die Zytokin-Wirkung auf die Zielzelle über die JAK/STAT-Signaltransduktion kann durch SOCS1- und SOCS3-Proteine inhibiert werden (in Anlehnung an [20, 46]).

Damit es zu keinen überschießenden Reaktionen durch die Zytokine kommt, muss es inhibierende Mechanismen geben. Zu ihnen gehören die SOCS-Proteine (*suppressors of cytokine signaling*). Sie werden von Interleukinen induziert und greifen in die durch die Zytokine ausgelöste Signalkaskade ein [20]. An der Signaltransduktion vieler Zytokine sind die vier Mitglieder der Janus-Kinase (JAK1 bis 3 und TYK2) und die sieben Mitglieder der STAT-Familie (*signal transducer and activator of transcription*), STAT1 bis 4, 5a, 5b und 6 beteiligt [46]. Die SOCS-Proteine binden und hemmen die aktivierte Janus-Kinase (JAK) oder kompetieren mit *signal transducer and activator of transcription* (STAT)-Faktoren um ihre Bindungsstelle am Zytokin- Rezeptor [20]. SOCS beeinflussen die Qualität und die Quantität der Zellantwort auf die Zytokine. Sie sind ebenso wie jene wichtig für das angeborene und das erworbene Immunsystem [46]. Es konnten indirekte Effekte

auf die TLR-Signalkaskade beobachtet werden, jedoch keine komplette bzw. direkte Inhibition [47-50]. Sie werden rasch durch das Proteasom abgebaut. Daher ist ihr Eingreifen in die Signalweiterleitung nur von kurzer Dauer [20].

Zur SOCS-Protein-Familie gehören acht Proteine: SOCS1 bis 7 und das *cytokine inducible SH2 domain-containing protein* (CIS). Ihnen ist eine zentrale SH2-Domäne und ein C-terminales Motiv, die sogenannte SOCS-Box, gemein. Die Länge und Sequenz der N-terminalen Region ist jeweils unterschiedlich.

SOCS1 ist ein physiologischer, negativer Schlüssel-Regulator der Signaltransduktion von IFN γ , die über STAT1 läuft. SOCS1 bewirkt dabei einen Abbruch der Signaltransduktion nach einer bestimmten Zeit [46]. Hierfür interagiert er mit der JAK-Kinase [51]. So kann ein immunologisch, vorteilhafter Effekt erzeugt werden, ohne dass dieser mit z.B. einer überschießenden lokalen Entzündungsreaktion einhergeht, die dem Organismus schaden kann.

Knockout-Mäuse, denen beide SOCS1-Allele fehlten zeigten eine periphere Lymphozytopenie in Assoziation mit einer gesteigerten Apoptose und einem verschobenen Verhältnis von CD8⁻ zu CD4⁺-T-Zellen zu Gunsten der CD8⁺-T-Zellen.

SOCS3 scheint eine Schlüsselrolle bei der Herunterregulation der durch IL-6 ausgelösten Signalkaskade zu spielen. Hieran sind STAT1 und STAT3 beteiligt. Das Protein bindet dabei an den Zytokin-Rezeptor und an die Janus-Kinase [51]. SOCS3 treten ebenso wie SOCS1 in naiven T-Zellen auf, ist dann aber vorrangig in Th2-Zellen exprimiert.

Auch für die dendritischen Zellen sind SOCS1 und 3 wichtig: Ihre Expression wird nach CpG DNA-Exposition induziert [46, 48]. Dies scheint jedoch nicht über den JAK/STAT-Signalweg zu laufen.

Bei malignen Zellen zeigten Untersuchungen, dass eine gesteigerte SOCS1-Expression die Zell-Transformation verzögert [46]. Bei Lungen- und Leber-Karzinomen wurde hingegen die Methylierung von SOCS1 und 3 festgestellt, die möglicherweise Teil der Tumorgenese sind. Bei HNSCC wurde die deutliche Methylierung der Promotor-Region für SOCS3 in einem hohen Prozentsatz von Gewebeproben von HNSCC und in einem geringeren auch von Dysplasien in diesem Bereich, festgestellt. Für SOCS1 war der Prozentsatz der Methylierung

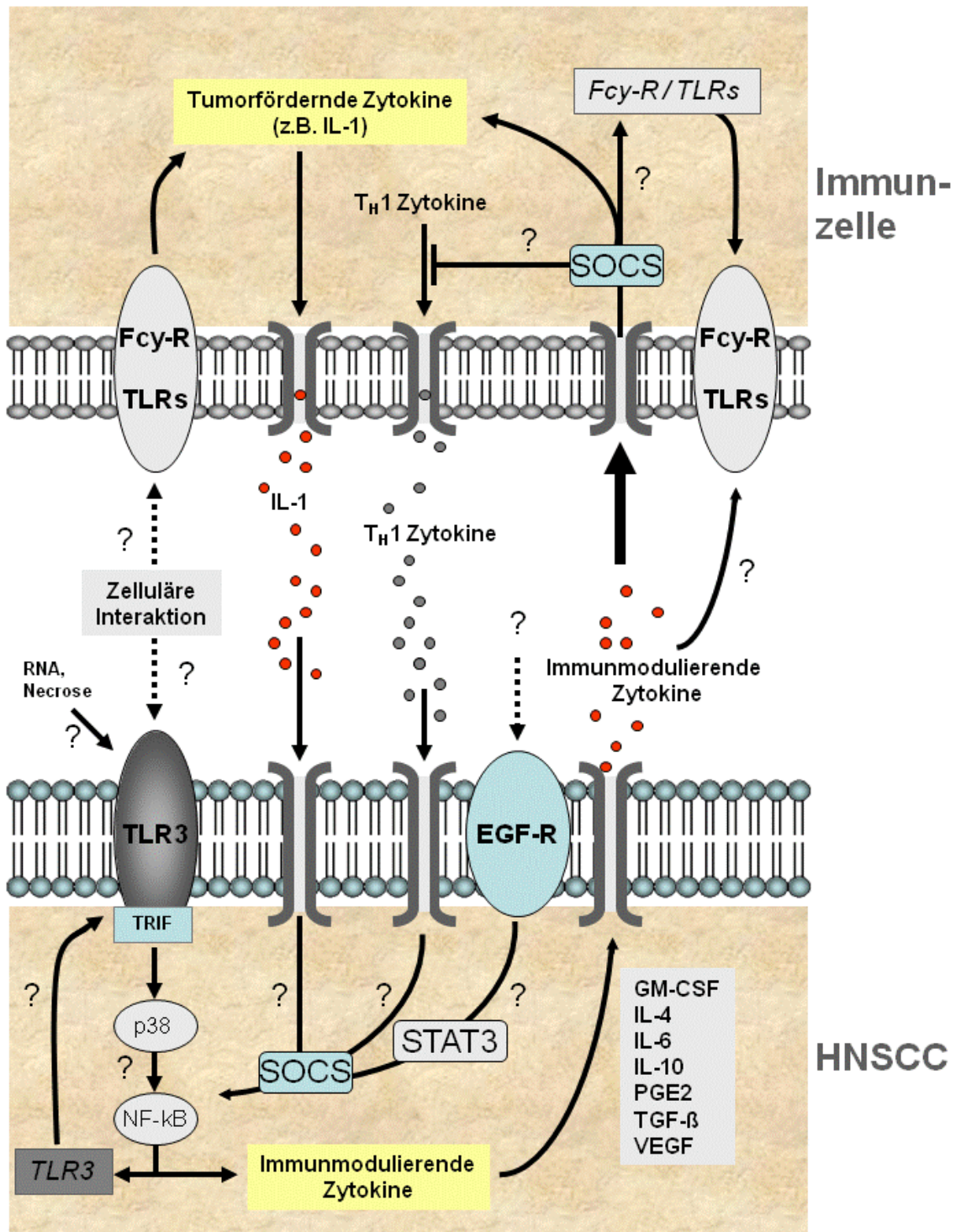


Abbildung 3: Model der Interaktion von HNSCC-Zellen und Immunzellen. Durch ihre Zytokinausschüttung beeinflusst der Tumor die Immunzellen in für ihn nützlicher immunsuppressiver Weise [42].

schwächer ausgeprägt, konnte aber auch bei Pankreas-Karzinomen, hepatozellulären Karzinomen und Hepatoblastomen gefunden werden. Man geht davon aus, dass hierdurch das Tumorwachstum begünstigt wird. Die Aktivierung von STAT3 korreliert mit der Proliferation von HNSCC und malignen Melanomen. Die Inhibition des JAK/STAT-Signalweges hingegen unterdrückt das Karzinom-

Zellwachstum und führt zur Apoptose bei unterschiedlichen Karzinom-Typen [51, 52]. SOCS1 und 3 scheinen eine Tumor-Suppressor-Aktivität zu besitzen [51]. Für dendritische Zellen wurde gezeigt, dass die Inhibierung der Translation von SOCS1 die spezifische Anti-Tumor-Immunität deutlich steigert, indem die Stimulierbarkeit der dendritischen Zellen und der Umfang der Antwort des erworbenen Immunsystems deutlich verbessert würden [53]. SOCS-Proteine regulieren die Aktivierung von dendritischen Zellen [54].

Wie die Abbildung 3 beschreibt, werden zahlreiche Modulationsmöglichkeiten in den Tumorzellen und bei den Zellen des Immunsystems derzeit diskutiert. Unumstritten ist die Komplexität der interagierenden Rezeptoren und Moleküle. Die Manipulation der SOCS-Aktivität mag eine neue therapeutische Möglichkeit für das Eingreifen in immunologische Ungleichgewichte, auch bei Tumoren bieten [46].

1.6 Fragestellung

Trotz der Fortschritte in der Chirurgie und Radiotherapie hat sich die schlechte 5-Jahresüberlebensrate von HNSCC-Patienten binnen der letzten 40 Jahre nur unwesentlich geändert [5]. Daher ist es dringend erforderlich nach Alternativen zu suchen. Eine solche ist die Immuntherapie. Für diese sind die dendritischen Zellen von besonderer Bedeutung, da es sich bei ihnen um die stärksten Antigen-präsentierenden Zellen des Organismus handelt [18, 20], die die T-Zellen aktivieren und damit entscheidend für die tumorspezifische Immunantwort sind [16, 18, 19]. Es ist bekannt, dass HNSCC-Gewebe von dendritischen Zellen infiltriert ist, diese aber funktionell eingeschränkt sind und die Anzahl der myeloiden dendritischen Zellen unter ihnen vermindert ist [14, 26]. Von großer Bedeutung für ihre Aktivierung, Reifung und Zytokin-Sekretion sind die Toll-like-Rezeptoren [3, 32]. Auch suppressor of cytokine signaling-Proteine regulieren die Reifung von dendritischen Zellen [54] und sind damit entscheidend für die körpereigene Immunabwehr der Tumorzellen.

Daher ist Ziel dieser Arbeit die Expression von TLR 1 bis 10, SOCS1 und SOCS3 bei dendritischen Zellen im pathologischen Tumormilieu zu untersuchen. Betrachtet werden dabei myeloide dendritische Zellen, die CD8⁺-Zellen-induzierende DC1 sind [18, 24] und auf denen daher der Fokus der Immuntherapie-Forschung liegt [27]. Dieses Modell soll Hinweise darauf geben, welche Mechanismen der Immunfunktion bei MDCs von Erkrankten möglicher Weise gestört sind.

Nicht nur für die Immunzellen auch für die Tumorzellen sind die SOCS-Proteine von großer Bedeutung. Es ist über den starken prozentualen Anteil von Tumorzellen mit methyliertem SOCS3- und auch SOCS1-Promotor in HNSCC-Gewebe berichtet worden. Aus diesem und anderen Ergebnissen wurde geschlossen, dass SOCS1 und SOCS3 Tumor-Suppressor-Eigenschaften besitzen [51]. Daher soll hier ihre Expression auf Zellen von Tumorzelllinien unter Einfluss des klassischen Th1-Zytokins und damit antitumoralen IFN γ und des auch in HNSCC TLR3-stimulierenden Poly I:C betrachtet werden, um zu sehen, ob die Suppression der SOCS-Proteine auch auf diesen Zelllinien gezeigt werden kann und ob sie durch IFN γ oder Poly I:C beeinflusst wird.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Zum *Auftauen von Zellen* (der Karzinomzelllinien BHY, PCI-1 und -13 und der Fibroblasten NIH 3T3) werden zunächst 10ml DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Pasching, Österreich) in einem Röhrchen vorgelegt und mit Natriumpyruvat (Sodium Pyruvat Solution, PAA, Pasching, Österreich) 1:100, NAA (*MEM, Non-Essential Amino Acids* (100x), invitrogen, Carlsbad, USA) und FCSC (*fetales Kälberserum*, PAA-Gold), das 30 min bei 56°C inaktiviert wurde, versetzt. Die Kryoröhrchen mit den aufzutauenden Zellen werden nach Entnahme aus dem -80°C-Schrank sofort im Wasserbad bei 30°C aufgetaut. Diese Zellen werden dann in das vorgelegte DMEM pipettiert. Die Zellsuspension wird bei 200g 8 Minuten lang zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird mit Medium aufgenommen und resuspendiert. Diese Zellsuspension wird auf Zellkulturflaschen verteilt. Diese werden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Spätestens am nächsten Tag sollte ein Mediumwechsel durchgeführt werden.

Ein *Nährmediumwechsel* findet alle zwei bis drei Tage an der sterilen Bank statt. Der Überstand wird aus der Zellkulturflasche herauspipettiert. Je nach Flaschengröße werden 10 ml (T75 - Flasche) bzw. 15 ml (T175 - Flasche) PBS (*Phosphate Buffered Saline*, Dulbecco's PBS, PAA Pasching, Österreich) auf die zellfreie Seite der flachen Flasche gegeben, damit die Zellen geschont werden. Das PBS soll das FCS (*fetales Kälberserum*) herauswaschen, das im Nährmedium DMEM enthalten ist und das im Folgenden zugegebene Trypsin inhibieren würde. Das Trypsin wird wiederum zum Lösen der Zellen von der Flaschen-Oberfläche benötigt. Die Lösung wird umgeschwenkt und das PBS wieder abpipettiert. Je nach Flaschengröße werden nun 3 ml (T75) oder 5 ml (T175) Trypsin auf die Zellen gegeben und die Flaschen für 10 min bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Durch vorsichtiges Klopfen gegen die Flasche sollen sich die Zellen entgültig vom Boden lösen, was unter dem Lichtmikroskop kontrolliert wird.

Es wird das zwei- bis dreifache des Trypsinvolumens an DMEM dazugegeben um das Trypsin zu inhibieren. Nach mehrfachem Abspülen des Bodens wird die

Lösung in ein 50 ml Tube pipettiert und 8 Minuten bei 30°C und 200g abzentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen. Das Zellpellet wird resuspendiert und die Zellen in neue Flaschen mit vorgelegtem DMEM gegeben, eingefroren oder ein Teil der Zellen wird abgetrennt um unter anderen Bedingungen in einer separaten Flasche inkubiert zu werden. Die Konzentration richtet sich dabei nach der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen.

Die *Bestimmung der Zellzahl* wird in einer Neubauer-Zählkammer mittels eines Lichtmikroskops durchgeführt. Es werden zunächst 10µl aus der entsprechenden gut resuspendierten Zellsuspension benötigt. Bei hohen Zellkonzentrationen werden sie verdünnt. 10µl hiervon werden mit 10µl des Farbstoffs Trypanblau vermischt. Davon werden wiederum 10µl in die Neubauer-Zählkammer gegeben. Lebendige Zellen nehmen im Gegensatz zu toten diesen Farbstoff nicht auf. Die Zellen können unter dem Lichtmikroskop unterschieden werden.

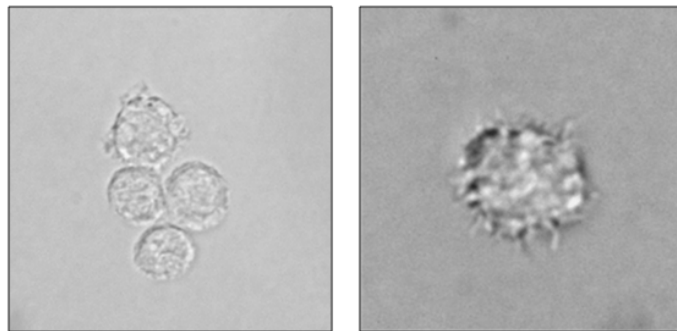


Abbildung 4: Foto von myeloiden dendritischen Zellen unter dem Lichtmikroskop

Die Zellzahl in der Zellsuspension wird mittels folgender Formel berechnet:

$$\begin{aligned} & \text{Mittelwert der Zellzahlen pro Eckquadranten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \text{ Zellen/ml} \\ & = \text{Zellzahl pro ml} \end{aligned}$$

Zum *Einfrieren von Zellen* werden diese wie zuvor beschrieben von der Zellkulturflasche abgelöst (Waschen und Trypsinieren) und dann bei 200g für 8 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Sediment wird entweder mit einfach Einfriermedium resuspendiert, z.B. 1,8ml ohne Zellzählung oder mit normalem Medium ohne FCS aufgenommen, resuspendiert, gezählt und anschließend die gleiche Menge zweifach Einfriermedium zugegeben und gemischt.

Die Zellen werden anschließend in beschriftete Kryoröhrchen gegeben und in einem, mit Isopropanol gefüllten Einfrierkarussell langsam eingefroren.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Einfriermediums

Einfriermedium	einfach	zweifach
FCS	10ml	20ml
DMSO	5ml	10ml
Medium	35ml	20ml

2.2 Herstellung von Proteinextrakten

Zunächst wird der Überstand in der Zellkulturflasche, welche die gewünschten adhärenen Zellen enthält, abpipettiert. Dies sind die Fibroblasten NIH 3T3 und die permanenten HNSCC Tumorzelllinien BHY und PCI-13, die je unter verschiedenen Bedingungen inkubiert worden sind. Dabei wurden BHY, PCI13 und NIH3T3 mit je 2000pg/ml INF γ bzw. 50 μ g/ml poly I:C oder ohne Zusatz über 15 Stunden inkubiert.

In die Flasche werden nun 5ml PBS (*Phosphate Buffered Saline*, Dulbecco's PBS, PAA Pasching, Österreich) gegeben, die Flasche wird geschwenkt und danach das PBS entfernt. Die adhärenen Zellen werden mit PBS gewaschen und mit einem Zellschaber abgekratzt und aus der Flasche herauspipettiert. Die Zellsuspensionen werden in Eppendorf Gefäßen 3min bei 10 000U/min und 4°C abzentrifugiert. Zu den Zellpellets werden 150 μ l des RIPA-Puffer-Mix gegeben:

Tabelle 3: Zusammensetzung des RIPA-Puffers und RIPA-Mixes

Ripa-Puffer		
100ml 1x PBS		
1% Igepal CA-630		(Sigma I-3021, 200ml, Lot 59H0466)
0,5% Natrium Deoxydiolat		(Sigma D-6750, 100g, Lot 30K0197)
0,1% SDS		(BioRad 161-0302, 1kg, Lot 139820B)

Zu 1ml RIPA-Puffer werden direkt vor dem Gebrauch folgende Agenzien zum Erhalt des RIPA-Mixes hinzugefügt:

- 30µl/ml Aprotinin (Sigma A6279)
- 10µl/ml PMSF (Sigma P7626, 5g)
- stock: 10mg/ml in 100%EtOH
- 10µl/ml Natrium Orthovanadat (Sigma S6508, 10g, Lot 99H0852)

Von einem 100mM stock in H₂O.

Die Zellsuspension wird ca. 5 x mit Hilfe einer kleinen Nadel resuspendiert und dann für 60 Minuten auf Eis gestellt. Das Lysat wird für 10 Minuten bei 4°C und 10000U/min zentrifugiert. Der hierdurch gewonnene Überstand wird in ein neues Röhrchen überführt und auf Eis gestellt. Das Pellet besteht aus zerstörten Zellmembranen und kann verworfen werden.

Tabelle 4: Zusammensetzung von 50ml des SDS-Puffers

2x SDS-Proben-Puffer

2g (4%)	SDS, Natriumdodecylsulfat (engl. <u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)
5ml (10%)	2-Mercaptoethanol
10ml (20%)	Glycerol
Spatelspitze (0,002%)	Bromphenolblau
5ml (0,1M)	Tris HCL pH 6,8

Im nächsten Schritt wird die gleichmäßige Beladung für die Größenfraktionierung der Proteine während der Gelelektrophorese mittels der Bestimmung der Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben nach Bradford, 1976 sichergestellt. Dazu werden 4µl der Proteinlösung mit je 156µl destilliertem Wasser und 40µl Bradforldösung (Quick StartTM Bradford Dye Reagent, 1x, BIO-RAD, USA) versetzt. Die Proteinkonzentration wird in einem automatischen UV-Spektrometer (Eppendorf BioPhotometer 6131) bestimmt. Nachdem die Proteinkonzentration bestimmt ist, wird das Volumen der Überstände ermittelt (theoretisch 300µl) und dann mit dem gleichen Volumen an SDS versetzt und für 5 Minuten in einem 100°C-Heizblock erhitzt. Hierdurch wird das Protein denaturiert.

2.3 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Auftrennung der Proteinextrakte erfolgt mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*engl. SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE*) nach LAEMMLI (1970). Je nach Größe der Proteine beträgt der Anteil an Acrylamid im Trenngel 10-12,5 % (Tabelle 5) und im Sammelgel 4-6 % (Tabelle 6). Die Stärke der Gele beträgt 0,75 oder 1,5 mm.

Tabelle 5: Zusammensetzung eines 1,5mm bzw. zweier 0,75mm dicken Trenngele (10%)

Reagenzien	Volumen
1M Tris HCl pH (8,8)	4ml
1% SDS	1ml
Acrylamid	3,3ml
Aqua dest.	1,7ml
APS	100µl
TEMED	10µl

Tabelle 6: Zusammensetzung eines 1,5mm bzw. zweier 0,75mm dicken Sammelgele (4%)

Reagenzien	Volumen
1M Tris HCl pH (6,8)	0,6ml
1% SDS	0,5ml
Acrylamid	0,7ml
Aqua dest.	3,2ml
APS	50µl
TEMED	5µl

Als Starter und zur Stabilisation der Polymerisation werden direkt vor dem Giessen 10%iges Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) gegeben.

Falls die Proteinprobe nach ein paar Monaten das erste Mal wieder oder überhaupt zum ersten Mal benutzt wird, sollte diese für 5 Minuten in einem 100°C-Heizblock erhitzt werden.

Die Elektrophoresekammer (BIORAD, Mini-PROTEAN®) wird mit einem Elektrophoresepuffer aufgefüllt und die Proteine in die Geltaschen pipettiert. Als Molekulargewichtsstandard wird der Prestained SDS-PAGE Standard (25-127 kDa) von Sigma-Aldrich verwendet. Die Elektrophorese wird mit einer Spannung von 200V durchgeführt. Sie wird beendet, wenn die Proteine durchgelaufen sind. Nach der Elektrophorese wird das Gel für die Western Hybridisierung verwendet.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers, der vor dem Gebrauch 1:10 verdünnt wird.

10x Elektrophoresepuffer

10g (1%) SDS

15g (0,25M) Tris, mit 1l Aqua dest. versehen

72g (1,92M) Glycin

2.4 Western Hybridisierung

Nach Auftrennung der Proteine im SDS-Gel werden diese nun durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulose-Membran (Trans-Blot® Transfer medium, BioRad, USA) transferiert. Membran und Whatman-Papier werden exakt auf die Größe des Gels zugeschnitten und in Blotpuffer getränkt. Hierbei wird Whatman-Papier, das mit Roti®-Blot K (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) getränkt wurde zuerst auf den Western Blotter überführt. Darauf wird die Membran mit dem Gel und zuletzt das mit dem Roti®-Blot A getränkte Whatman-Papier zu einem „Sandwich“ zusammengelegt. Es sollte darauf geachtet werden, dass Luftblasen unter dem Gel entfernt werden. Der Blotvorgang erfolgt in einer Semi-Dry-Blot Apparatur (Trans-Blot® SD, semi-dry transfer cell) bei 0,12 A für zwei Gele für ca. 90 Minuten.

2.5 Proteinanalyse

Die erhaltenen Nitrozellulosemembranen werden mit Aqua dest. von den Gelresten befreit, 1min in PonceauS (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) auf dem Schüttler inkubiert und anschließend so häufig mit Aqua dest. gewaschen bis Banden erscheinen. Schließlich werden sie 10min und danach noch einmal 50min lang in 10ml frischem Blotting Puffer geschüttelt. Der Blocking-Puffer besteht aus einer 3%igen Milchpulverlösung in PBS. Zuletzt werden die Blots noch einmal 10min lang in 10ml PBS gewaschen.

Die Lösung wird abgegossen und PBS mit Antikörpern versetzt. Die Blots werden mit der Lösung über Nacht bei 4°C verschlossen auf dem Schüttler inkubiert.

Tabelle 8: Für die Proteinanalyse verwendete Antikörper

Verwendete Antikörper

SOCS1 (Anti SOCS1, Acris GmbH, Deutschland)

SOCS3 (Anti SOCS3, Acris GmbH, Deutschland)

TLR 1 – 10 (Ingenex, San Diego, USA)

β-Actin (β-Actin-Loading Control Mouse monoclonal, Abcam, Cambridge, GB)

Am nächsten Morgen, werden die Blots mindestens dreimal 5 Min lang auf dem Schüttler mit PBS gewaschen.

3,5µl Sekundärantikörper werden pro Blot mit 10ml 1%igen auf 37°C erwärmten Gelatinepuffer versetzt, auf die trockenen Blots gegeben und bei Raumtemperatur zwei Stunden lang auf dem Schüttler inkubiert. Diese werden abermals dreimal 5min lang mit PBS gewaschen.

Danach werden die Blots jeweils mit 12,5ml Entwicklungsreagenz auf dem Schüttler inkubiert, bis Protein-Banden erscheinen. Danach werden die Blots mit Aqua dest. gewaschen, was die Banden verstärkt.

Die unter 2.3-2.5 beschriebenen Schritte wurden ebenfalls mit BHY- und PCI1-Zellen, die nicht mit Zytokinen inkubiert wurden und mit Zellen aus soliden Tumorproben (T126: Lymphknotenmetastase Level II, T202: Tonsille) und Proben

von einer gesunden Nasenmuschel (G60) von Patienten der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Universität zu Lübeck durchgeführt. Hierfür wurden β -Actin-, SOCS1- und SOCS3-Antikörper verwendet.

2.6 Isolierung und Inkubation von MDCs

Die Isolierung der MDCs erfolgte durch die „*Magnetic Bead Separation*“ nach Angaben des Herstellers des verwendeten BDCA-1Kits, Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Deutschland).

Zur Isolierung von myeloiden dendritischen Zellen werden Buffy Coats aus der Blutbank der Universität zu Lübeck benutzt. Hierbei handelt es sich um die Leukozyten und Thrombozyten aus dem Vollblut [55]. Die Spender sind zwischen 18 und 65 Jahren alt, gesund, auch in den vorhergehenden vier Wochen frei von Infektionen gewesen, ohne bekannte Allergien und nehmen keine Medikamente ein. Werden mehrere Buffy Coats verarbeitet, sind diese rhesuskompatibel und entsprechen der selben Blutgruppe des ABO-Systems.

In 50 ml Schraubgefäßen werden je 12,5 ml Blut aus den Buffy Coats gegeben, die dann mit PBS (*Phosphate Buffered Saline*, Dulbecco's PBS, PAA Pasching, Österreich) aufgefüllt und durchmischt werden. Es werden jeweils 25 ml dieser Lösung vorsichtig auf 20 ml Ficoll (LSM 1077 Lymphocyte Separation Medium, PAA, Pasching, Österreich) geschichtet. Dieses ist in weiteren 50 ml Tubes vorgelegt.

Die Tubes werden 30 min lang bei 400g und 20°C zentrifugiert. Die Zentrifugenbremse ist ausgeschaltet, so dass Verwirbelungen vermieden werden. Nun muss die Interphase herauspipettiert werden. Diese hat sich zwischen der Ficollschicht, die das Erythrozytensediment enthält und der PBS-Schicht gebildet. Die Interphase besteht aus Leukozyten und wenigen Erythrozyten, die nicht abzentrifugiert sind. Die abgesaugte Interphase wird in 50 ml Schraubgefäßen, die jeweils 30 ml MACS- (*Magnetic cell sorting of human cells*, Miltenyi Biotec GmbH Bergisch Gladbach, Deutschland) Puffer enthalten, pipettiert. Der MACS-Puffer besteht aus 500 ml PBS, das mit 7,0ml FCS (*fetalem Kälberserum*, PAA, Pasching, Österreich) und 2ml EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid disodium*

salt solution, SIGMA, St. Louis, USA) versetzt worden ist und in 50 ml Tubes 10 min lang bei 4°C und 300g abzentrifugiert wurde. Im Folgenden wurden die Tubes auf Eis gelagert. Es soll von nun an möglichst bei 4°C gearbeitet werden.

Die Tubes mit der Interphase und dem MACS-Puffer werden 10 min lang bei 400g und 4°C zentrifugiert. Auch bei den folgenden Schritten der Isolation wird die Zentrifuge jeweils mit der selben Einstellung verwendet. Der Überstand wird abgegossen. Die erhaltenen Zellsedimente werden in ein gemeinsames Gefäß überführt. Dieses wird zwei weitere Male mit MACS-Puffer aufgefüllt und nochmals zentrifugiert.

Damit die verbliebenen Erythrozyten entfernt werden, wird das Sediment resuspendiert und sein Volumen bestimmt. Das doppelte Volumen an destilliertem Wasser wird hinzugegeben. Mit einer Pipette wird die Lösung genau 1min 10sek lang resuspendiert. Es kommt zur Zytolyse der Erythrozyten. Das Gefäß wird mit MACS-Puffer aufgefüllt und anschließend abermals zentrifugiert.

Das erhaltene Sediment wird resuspendiert. Die Zellzahl wird unter dem Lichtmikroskop bestimmt.

Die Zelllösung wird nun so weit mit MACS-Puffer aufgefüllt, dass eine Konzentration von 10^8 Zellen/200µl vorliegt. Entsprechend der errechneten Gesamtzellzahl werden nun pro 10^8 Zellen je 100µl FcR blocking reagent (FcR blocking reagent human, Miltenyi Biotec GmbH Bergisch Gladbach, Deutschland), 100µl CD 19 Micro Beads (Microbeads human, Miltenyi Biotec GmbH Bergisch Gladbach, Deutschland) und 100µl CD1c (Anti-BDCA-1- Biotin-*Antibody* human, Miltenyi Biotec GmbH Bergisch Gladbach, Deutschland) hinzugegeben. Die CD19 Micro beads markieren die B-Lymphozyten. CD1c bindet an die MDCs. Die Zelllösung wird gut geschüttelt und 15min lang auf Eis inkubiert.

Das Tube wird mit MACS-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert. Der Überstand wird abkantiert. Die Zellen werden in 500µl MACS-Puffer pro 10^8 Zellen aufgenommen und gut resuspendiert.

Es wird die LD MACS Separationssäule (MACS[®] Separation LD Columns, Miltenyi Biotec GmbH Bergisch Gladbach, Deutschland) in den zugehörigen Magneten gespannt. Durch das magnetische Feld können die Eisenkügelchen, die an die CD19 MicroBeads gekoppelt sind, in der Säule zurückgehalten werden. Die Säule wird mit 2ml MACS-Puffer equilibriert. Danach wird die Zellsuspension auf die Säule gegeben. Nachdem sie durchgelaufen ist, wird die Säule zweimal

hintereinander mit je 1ml MACS-Puffer gewaschen. In der Säule, sind die CD19⁺-B-Lymphozyten enthalten. Sie können verworfen werden. Der Durchfluss wird aufgefangen. In ihm sind die MDCs enthalten, da sie nicht CD19⁺ sind.

Die Zellzahl wird erneut bestimmt und die Konzentration auf 10⁸ Zellen / 400 µl MACS-Puffer eingestellt. Die Zellsuspension wird mit 100µl Anti-Biotin MicroBeads (Miltenyi Biotec GmbH Bergisch Gladbach, Deutschland) pro 10⁸ Zellen versetzt, gut durchmischt und 15 min lang auf Eis inkubiert.

Das Anti-Biotin ist der Sekundärantikörper, der an die CD1c-Antikörper bindet. An ihn ist ein Magnet gebunden. So können die markierten Zellen in der folgenden Säule herausgefiltert werden. CD1c-positiv sind MDCs und eine Subpopulation von B-Lymphozyten, die allerdings bereits in der ersten Säule herausgefiltert worden ist [56].

Nach der Inkubation wird das Tube mit MACS-Puffer aufgefüllt und unter den gleichen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.

Die Konzentration wird auf 10⁸Zellen/500µl MACS-Puffer eingestellt. Die LS MACS Separation Säule (MACS[®] Separation LS Columns, Miltenyi Biotec GmbH Bergisch Gladbach, Deutschland) wird in den Magneten gespannt und mit 3ml MACS-Puffer equilibriert. Daraufhin wird die Zellsuspension auf die Säule gegeben. Nachdem sie durchgelaufen ist, wird die Säule dreimal hintereinander mit je 3ml MACS-Puffer gewaschen. Die CD1c (human blood dendritic cell antigen-1, BDCA-1) -positiven MDCs verbleiben in der Säule. Die Säule wird aus dem Magneten genommen. Auf die Säule werden 3,0 ml MACS-Puffer gegeben. Mit dem zugehörigen Stempel werden mit ihnen die CD1c-positiven Zellen durch die Säule hindurchgedrückt. Man erhält die CD1c - positiven MDCs. Die Reinheit beträgt dabei mindestens 80 bis 90% [56].

Im Anschluss werden die Zellsuspensionen abzentrifugiert und unter verschiedenen Bedingungen in Wells bei 37°C und 5% CO₂ über 36 Stunden im Brutschrank inkubiert. Ein Well enthält 3ml Nährmedium. Die anderen beiden jeweils 1,5ml und je 1,5ml Karzinomzellen-Überstand von BHY (DSMZ Germany) oder PCI-1 (Hypopharynx-Karzinom, Pittsburgh Cancer Institute, USA). Der zellfreie Überstand wurde, nachdem die Zellen 48 Stunden lang inkubiert worden waren, durch Zentrifugation und Filtration gewonnen.

Tabelle 9: Zusammensetzung des Nährmediums**Das Nährmedium enthält:**

45,5 ml X-VIVO-Gemisch (BioWhittacker™ X-VIVO15 without Phenol red and Gentamicin, Cambrex Bio Science Verviers, Belgien)

5% FCS, 0,5ml L-Glutamin (L-Glutamine (100x), PAA, Österreich)

0,5ml NAA (MEM, Non-Essential Amino Acids (100x), invitrogen, Carlsbad, USA)

0,5 ml Natrium Pyruvat (Natrium Pyruvat Solution, PAA, Pasching, Österreich)

0,5 ml Penicillin-Streptomycin (Penicillin/Streptomycin 10 000 E / 10 000 µg/ml, Biochrom)

2.7 FACS-Analyse

Die FACS-Analyse („Fluorescence Activated Cell Sorting“) stellt eine Möglichkeit zur Identifizierung und Charakterisierung von Zellen dar. Diese Methode ermöglicht eine Analyse der Zellen bezüglich ihrer Oberflächenantigene, Größe und Granularität. Die Zellen werden hierbei mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern versehen und im Durchflusszytometer analysiert. Die Einzelzellen wandern hintereinander in einem feinen Flüssigkeitsfaden und werden auf ihre Fluoreszenz hin geprüft, wenn sie einen Laserstrahl passieren. Zellgröße und Granularität werden anhand der Lichtstreuung einer vorderen und seitlichen, um 90° versetzten Lichtquelle gemessen. Durch Markierung mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen können bis zu drei Oberflächenantigene parallel erfasst werden. Zur Darstellung der Daten dient ein Histogramm, in dem Zellzahl gegen Intensität der Fluoreszenz aufgetragen ist, oder eine zweidimensionale Dot Blot-Darstellung, in der jeder Punkt eine Zelle entsprechend ihrer Fluoreszenz und Größe bzw. Granularität repräsentiert.

Zum Ausschluss von Artefakten, die aus Fluoreszenzspektren resultieren, werden die Detektorkanäle zu Beginn gegeneinander kompensiert. Dazu werden Kompensationsbeads jeweils mit Antikörpern inkubiert, die mit den später zu messenden Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Die Kompensationsparameter werden dann für alle Messungen beibehalten.

Von den isolierten Zellfraktionen wurden je 200 000 Zellen in DMEM in Polystyren-Rundbodenröhrchen überführt, abzentrifugiert und das Zellpellet in 50µl PBS resuspendiert. Dann wurden 2µl des markierten Antikörpers (siehe Tab.10) und je 2µl CD11c-APC (*Anti-CD11c-APC, Becton Dickinson*), HLA-DR-PerCP (*HLA-DR-PerCP, BENEX Limited, Shanon, Irland*) und Lin-FITC (*lin1 (CD3, 14, 16, 19, 20, 56) FITC, BD Biosciences, San Jose, USA*) in jede Probe gegeben.

Tabelle 10: Verwendete Primär- und ggf. Sekundärantikörper zur Markierung für die FACS-Analyse.

Primärantikörper

Toll like receptor 1 (PE-Conjugated Anti-human TLR1, Bioscience, San Jose, USA)

Toll like receptor 2 (PE-Conjugated Anti-human TLR2, Bioscience, San Jose, USA)

Toll like receptor 3 (PE-Conjugated Anti-human TLR3, Bioscience, San Jose, USA)

Toll like receptor 4 (PE-Conjugated Anti-human TLR4, Bioscience, San Jose, USA)

Toll like receptor 5 (Anti-TLR5-PE, IMGENEX Corporation, San Diego, USA)

Toll like receptor 6 (Anti-TLR6-FITC, IMGENEX Corporation, San Diego, USA)

Toll like receptor 7 (TLR7 (Isotype: Rabbit IgG), IMGENEX Corporation, San Diego, USA)

Sekundärantikörper: Rabbit-Fitc (FITC labeled goat anti-rabbit Ig, BD PharmingenTM, San Diego, USA)

Toll like receptor 8 (Anti-TLR8-PE, Imgenex, IMGENEX Corporation, San Diego, USA)

Toll like receptor 9 (PE-Conjugated Anti-human TLR9, Bioscience, San Jose, USA;

Anti TLR9 FITCS, IMGENEX Corporation, San Diego, USA)

Toll like receptor 10 (Anti-TLR10, Stratagene, Texas, USA)

Sekundärantikörper: Mouse-APC (FITC labeled goat anti-mouse Ig, BD PharmingenTM, San Diego, USA)

SOCS 1 (anti SOCS1, Acris GmbH, Deutschland)

Sekundärantikörper: Rabbit (FITC labeled goat anti-rabbit Ig, BD PharmingenTM, San Diego, USA)

SOCS 3 (anti SOCS3, Acris GmbH, Deutschland)

Sekundärantikörper: Mouse (FITC labeled goat anti-mouse Ig, BD PharmingenTM, San Diego, USA)

Annexin (V-FITC, BD PharmingenTM, San Diego, USA)

PI (Propidium Iodide Staining Solution, BD PharmingenTM, San Diego, USA)

Die Zellsuspension wurde für 20 Minuten im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und das Pellet mit 500µl PBS^{def} aufgenommen. Ggf. wurde die Lösung noch einmal mit einem Sekundärantikörper versetzt, auf Eis inkubiert, gewaschen und abzentrifugiert. Um eine intrazelluläre Antigenmarkierung zu erreichen wurde die Hälfte der Zellsuspensionen initial mit 0,1% Saponin statt mit PBS versetzt und die Zellen dann für 20 Minuten in 0,1% Saponin mit dem Antikörper auf Eis inkubiert. Durch Saponin entstehen Poren in der Zellmembran, so dass auch Aussagen über die Präsenz intrazellulärer Antigene möglich sind.

Ist es nicht möglich die Durchflusszytometrie sofort durchzuführen, können die Zellen nun bis zu 24h lang mit Paraformaldehyd (Sigma) fixiert werden.

Die Analyse der Zellen erfolgte in einem FACSCanto (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Die Messergebnisse wurden mittels der FACS DIVA Software ausgewertet (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland).

Nicht nur die isolierten myeloiden dendritischen Zellen wurden nach ihrer Inkubation mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht, sondern auch die Zellen der Zelllinien BHY, PCI-1 und PCI-13, nachdem sie über 12 oder 24 Stunden mit oder ohne INF γ (2000pg/ml) bei 37°C und 5%CO $_2$, wie unter 2.1 beschrieben, inkubiert worden sind. Sie wurden mit SOCS1- und SOCS3-Antikörpern und jeweils mit oder ohne Saponin versetzt.

2.8 Verwendete Software

Zum Erstellen der vorliegenden Inauguraldisseratation wurden die Programme Microsoft Office Word 2007, Microsoft Office PowerPoint 2007 und End Note 7 verwendet.

Die Analyse der Zellen in der Durchflusszytometrie erfolgte in einem FACSCanto (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Die Messergebnisse wurden mittels der FACS DIVA Software ausgewertet (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland).

2.9 Zustimmung der Ethikkommission

Der Durchführung der vorliegenden Dissertationsarbeit hat die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck zugestimmt (Aktenzeichen 06-027).

3. Ergebnisse

3.1 Expressionsanalyse von myeloiden dendritischen Zellen

3.1.1 Mit HNSCC-Überständen inkubierte myeloide dendritische Zellen zeigen eine verstärkte Toll-like-Rezeptor 7-Expression

Humane myeloide dendritische Zellen machen 0,5 bis 1% aller peripheren Blutzellen aus. Sie haben eine monozytenartige Morphologie und exprimieren CD11c, HLA-DR und CD1c, was *human blood dendritic cell antigen-1* (BDCA-1) entspricht. Gleichzeitig zeigen sie keine Expression der Lineage-Marker CD3, CD16, CD19, CD20 und CD56.

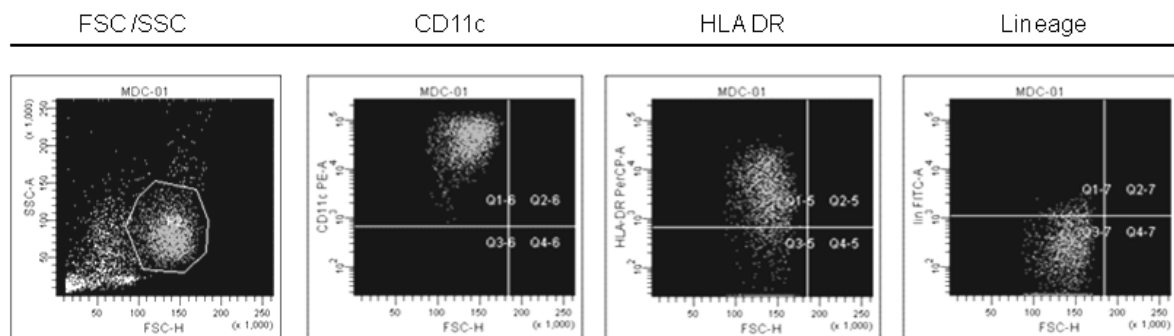


Abbildung 5: Identifikation der isolierten MDCs in der Durchflusszytometrie. MDCs sind HLA-DR- und CD11c-positiv. Sie lassen sich nicht durch Lineage-Marker kennzeichnen. Anhand dieser Merkmale lässt sich ihre Population in der Durchflusszytometrie identifizieren.

Die MDCs sind aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern durch die *magnetic bead separation* isoliert worden. Hierbei wurden mit magnetischen Beads versehene anti-BDCA-1-Antikörper verwendet. Abgesehen von den MDCs exprimiert auch eine kleine CD19⁺ Subpopulation B-Zellen CD1c (BDCA-1). Daher wurden CD19 MicroBeads zur Entfernung der B-Zellen verwendet, bevor die BDCA-1⁺ myeloiden dendritischen Zellen isoliert wurden. Mit dem Lichtmikroskop wurde die Zellzahl bestimmt und dabei mit Trypanblau die toten Zellen identifiziert.

Nach der Zellisolierung wurden die charakteristischen Oberflächen-Antigene analysiert. Im Durchflusszytometer wurden die HLA-DR und CD11c exprimierenden Zellen, die keine Lineage-Marker (lin) exprimierten, als myeloide dendritische Zellen identifiziert (Abbildung 5).

Die meisten Untersuchungen der TLR-Expression, die bisher an den Subpopulationen der dendritischen Zellen vorgenommen worden sind, wurden mit der *real time*-PCR durchgeführt, da keine Antikörper erhältlich waren. Nun sind Antikörper verfügbar und konnten zur Durchführung der Durchflussanalyse von TLR1 bis 10 verwendet werden. Der Versuch wurde für jeden TLR zwei- bis viermal durchgeführt. Ebenso konnte damit die Western Hybridisierung durchgeführt werden (n= 3).

Das Ergebnis der Untersuchungen war, dass eine TLR-Expression auf MDCs für alle TLRs mit Ausnahme der TLR 4 und 9 nachgewiesen werden konnte. Für diese beiden wurde kein signifikantes Expressionslevel beobachtet.

Anschließend sollte der Einfluss des Tumormilieus auf das TLR-Expressionsmuster der myeloiden dendritischen Zellen, als wichtiger Verbindungsstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität, näher analysiert werden. Um den Unterschied zwischen der TLR-Expression von MDCs in physiologischer Umgebung und von MDCs im Tumormilieu zu vergleichen, wurden isolierte MDCs in reinem Nährmedium und mit BHY- oder PCI 1-Überstand versehenem Medium über je 36 Stunden inkubiert. Anschließend wurden sie mit der Durchflusszytometrie untersucht. Dabei zeigte sich bei der TLR7-Expression ein Anstieg der Fluoreszenzintensität bei den mit Überstand inkubierten Zellen im Vergleich zu den in reinem Medium inkubierten MDCs (Abbildung 6).

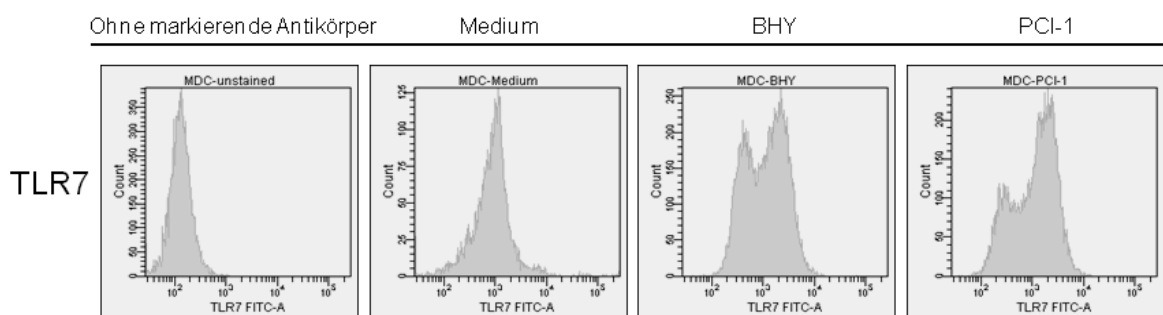


Abbildung 6: Durchflusszytometrie-Analyse der Expression von TLR7 an der Zelloberfläche von humanen MDCs in Ab- und Anwesenheit von HNSCC-Überstand (BHY und PCI 1).

Bei den restlichen TLRs (TLR1 bis 6 und TLR8 bis 10) zeigte sich ein solcher Anstieg der Rezeptor-Expression nicht. Die Graphiken in Abbildung 6 zeigen für

TLR7 einen deutlichen Expressionsanstieg für die Mehrzahl der MDCs, die mit Tumor-Überstand inkubiert wurde.

Zusätzlich zu der Durchflusszytometrie wurde die Western Hybridisierung durchgeführt um die TLR-Expressions-Level auf MDC zu untersuchen. Die Ergebnisse bestätigen die zuvor genannten. Es konnte eine erhöhte TLR7-Protein-Expression nach 12 stündiger Inkubation in BHY- und PCI 1-Überständen gezeigt werden (Abbildung 7). Es wurden durchschnittlich drei unabhängige Messungen für jede Bedingung durchgeführt, die einen durchschnittlichen TLR7-Expressionsanstieg von 30% zeigten.

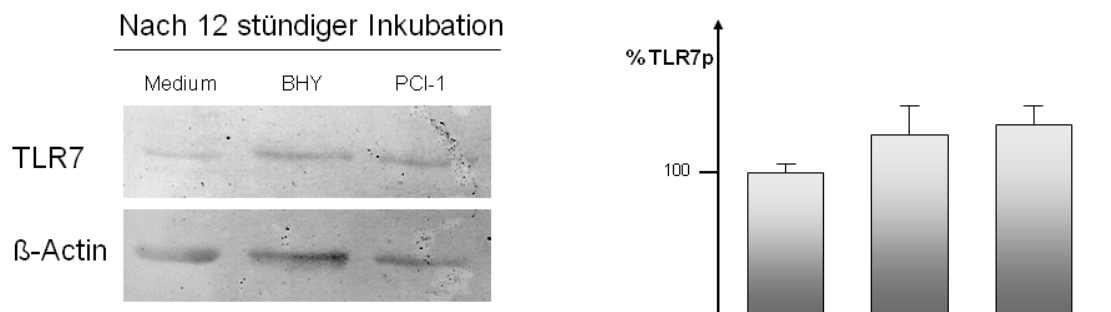


Abbildung 7: Expression von Toll-like-Rezeptor 7 in Proteinextrakten aus MDCs nach 12 stündiger Inkubation mit Überständen von permanenten Tumorzelllinien. Die Prozentangaben beziehen sich auf das Expressionsniveau der nur in Medium inkubierten Zellen (100%).

3.1.2 Einfluss von HNSCC auf die Expression von SOCS-Protein 1 und 3 in myeloiden dendritischen Zellen

Es wurde in einem weiteren Schritt die Auswirkung des Tumormilieus auf die Expression von SOCS1- und -3-Proteinen im Tumormilieu untersucht. Dafür wurden abermals MDCs mit Tumorüberstand von BHY und PCI 1 inkubiert. Als Vergleich wurden weitere myeloide dendritische Zellen in reinem Nährmedium inkubiert. Nach 36 Stunden Inkubation fand mit dem Durchflusszytometer die Expressionsanalyse statt (n = 2).

Suppressor of cytokine signaling-Protein 1 und 3 waren beide nachweisbar. Die Expression der Proteine blieb nach der Inkubation mit HNSCC-Überständen (Abbildung 8a und b) im Vergleich zu der der Zellen, die in reinem Nährmedium inkubiert worden waren, konstant.

SOCS1 in MDC

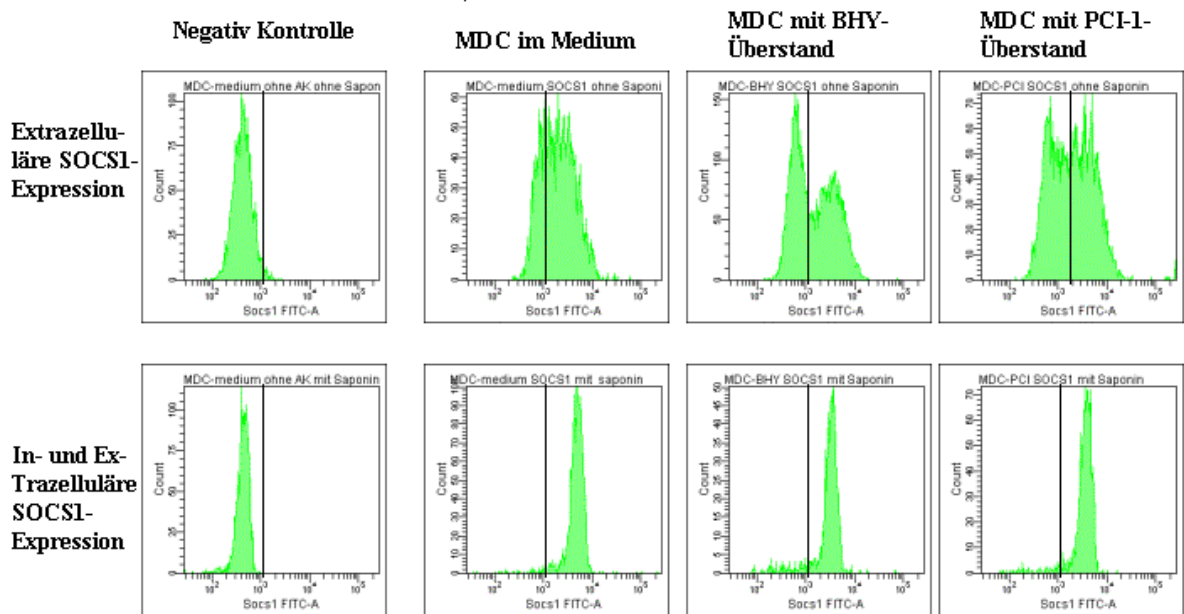


Abbildung 8a

SOCS3 in MDC

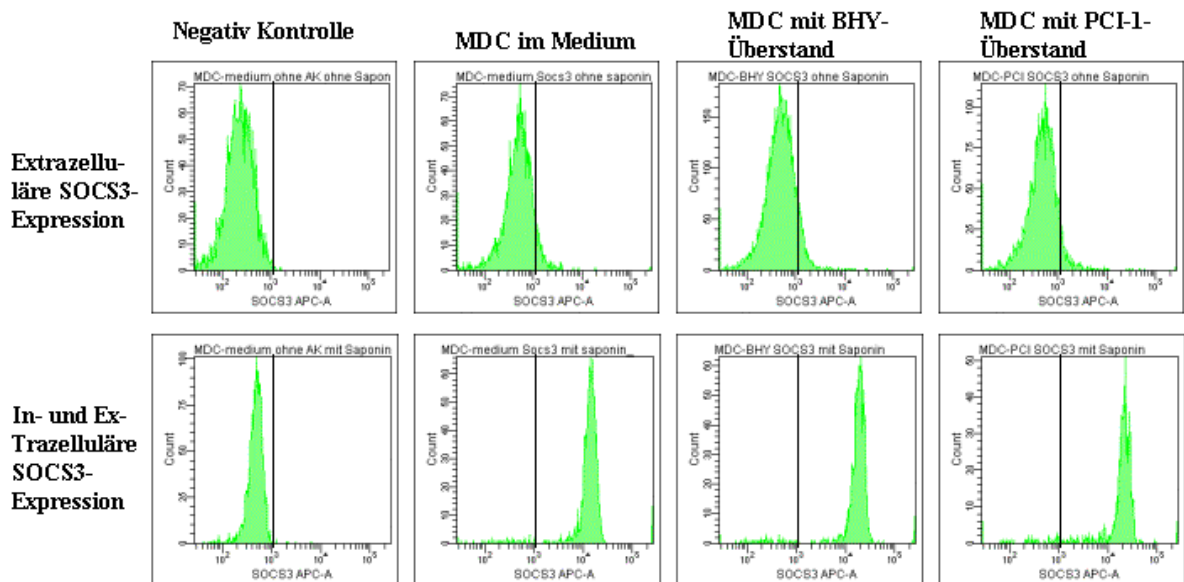


Abbildung 8b

Abbildung 8a und b: SOCS1- und -3-Expression von MDCs. Diese wurden mit Überständen permanenter Zelllinien (BHY und PCI 1) über 36 Stunden inkubiert. Im Vergleich wird die Expression der Zellen, die in Nährmedium inkubiert wurden, dargestellt (2. Spalte). Die linke Spalte zeigt jeweils die Eigenfluoreszenz der Zellen an (bis zu 10^3 /Zelle), die ohne markierende Antikörper analysiert wurden.

Es zeigten sich Fluoreszenzen von bis zu 10^4 /Zelle für SOCS1, wobei die Eigenfluoreszenz der Zellen bis zu 10^3 /Zelle beträgt (Abbildung 8a und b je linke Spalte). Ihre Intensität unter Saponin-Gabe, was Poren bildet und die intrazellulären Proteine markieren lässt, veränderte sich nicht. Die Expression von SOCS1 ist sowohl unter Saponin-Zugabe als auch ohne sie deutlich zu erkennen. Die Expression von SOCS3-Protein ist jedoch nur nach Saponin-Zugabe deutlich nachweisbar. Ohne Saponin zeigt sich nur eine geringe Anzahl von Zellen, deren SOCS3-Fluoreszenz mit Werten bis zu $10^{3,2}$ (≈ 1585) über die Eigenfluoreszenz von 10^3 /Zelle hinausgeht (Abb. 8b). Unter Saponin-Zusatz zeigen die Zellen Fluoreszenz-Werte bei SOCS3-Antikörper-Gabe über 10^4 /Zelle.

Die Durchflusszytometrie für MDCs, zeigt für SOCS1- und SOCS3-Proteine eine konstante Expression nach Inkubation mit Tumorüberständen. Das Maximum der Fluoreszenz pro Zelle verschiebt sich unter dem Einfluss der Tumor-Überstände weder nach links noch nach rechts.

Die Vitalität der Zellen wurde mittels Annexin und PI-Färbung verifiziert.

3.2 “Suppressor of cytokine signaling“-Proteine bei permanenten Tumorzelllinien

3.2.1 SOCS1- und SOCS3-Proteine werden auf HNSCC-Zellen exprimiert

Auch Tumorzellen exprimieren SOCS-Proteine. Auch bei ihnen regulieren sie die Signalkaskade, die durch Zytokine ausgelöst wird und damit ihre Proliferation, Migration, Differenzierung, Apoptose und Aktivierung moduliert. Dies wäre ebenfalls ein möglicher Angriffspunkt für die Tumorthherapie. Um die genauere Bedeutung des Tumormilieus für die HNSCC-Tumorzellen selber zu analysieren, wurden zunächst Zellen der permanenten Tumorzelllinien BHY, PCI 1 und PCI 13 inkubiert (vgl. 2.1) und mit dem Durchflusszytometer FACSCanto ihre SOCS1- und SOCS3-Expression untersucht ($n = 2 - 4$). Durch die Zugabe von Saponin, das Poren in der Zellmembran bildet, konnten auch die intrazellulären Verhältnisse beurteilt werden (vgl. 2.7).

Die in den Negativ-Kontrollen (Abbildung 9 linke Spalte) ohne Antikörper-Zugabe gezeigte Fluoreszenz beruht auf der Eigenfluoreszenz der Zellen. Sie erreicht Werte von $10^{3,1}$ /Zelle bis $10^{3,2}$ /Zelle. Daher werden erst höhere Fluoreszenzwerte in den anderen Graphen als durch die SOCS-Antikörper bedingte Fluoreszenz

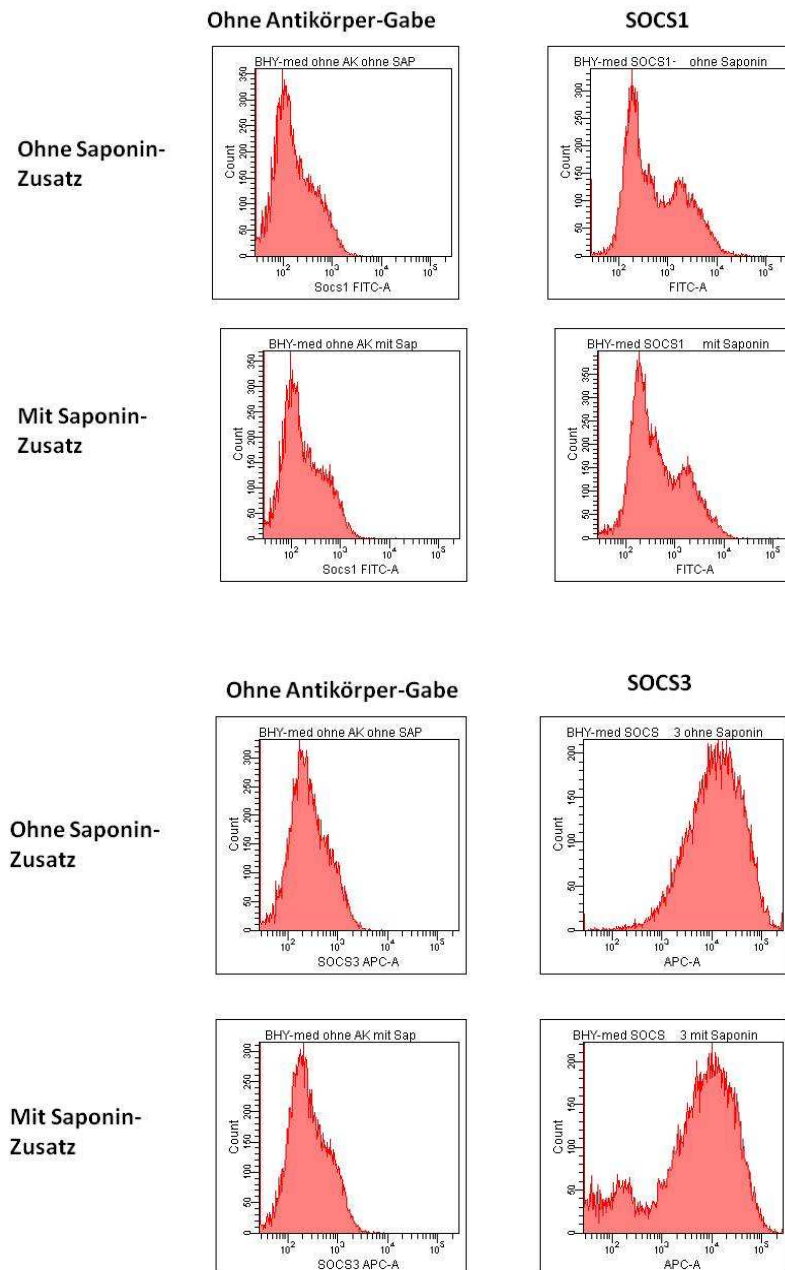


Abbildung 9: Durchflusszytometrie von BHY-Zellen ohne und nach Gabe von SOCS1- und -3-Antikörpern. Während den Graphen in der linken Spalte als Negativ-Proben keine Antikörper zugesetzt worden sind, haben die Proben deren Ergebnisse rechts abgebildet sind Antikörper erhalten. Die Fluoreszenz der linksseitig abgebildeten Zellen beruht auf ihrer Eigenfluoreszenz ($<10^{3,1}$ /Zelle). Die Fluoreszenz der Graphen in der rechten Spalte, die über die der Graphen in der linken Spalte hinausgeht ($>10^{3,1}$ /Zelle), repräsentiert die SOCS1- bzw. SOCS3-Expression der HNSCC-Zellen.

Saponin perforiert die Zellwand. Die Antikörper können so ins Zellinnere gelangen und an die intrazellulären SOCS1- und -3-Proteine binden.

betrachtet. Hierbei sieht man, dass sowohl das suppressor of cytokine signaling1- als auch -3-Protein von den BHY-Zellen exprimiert werden. Für alle drei HNSCC-Zelllinien konnte die Expression von SOCS1- und SOCS3-Proteinen unabhängig von der Anwesenheit von Saponin nachgewiesen werden.

3.2.2 Die SOCS1- und SOCS3-Expression von HNSCC-Zelllinien bleibt unter IFN γ -Einwirkung konstant

Im Folgenden wurden die drei Tumorzelllinien BHY, PCI1 und PCI 13 über 12 und 24 Stunden mit und ohne 2000pg/ml IFN γ inkubiert. IFN γ ist ein immunmodulatorisch wirksames Th1-Zytokin, dass T- und B-Lymphozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen aktiviert. Der Versuch wurde je nach Tumorzelllinie zwei- bis viermal wiederholt.

Die Graphen (Abbildungen 10 und 11) zeigen das Ergebnis der Durchflusszytometrie. Zunächst bildet die jeweils links stehende Negativ-Kontrolle, analog zu Abbildung 9 die Fluoreszenz, die bereits ohne die Zugabe von Antikörpern gemessen wurde, ab.

Die Expression blieb bei Inkubation mit IFN γ gegenüber der in reinem Medium in der visuellen Analyse konstant. Saponin macht durch die Zellmembranperforation auch die intrazellulären Proteine den Antikörpern zugänglich. Zwischen den Graphen mit und denen ohne Saponin-Zusatz können jedoch sowohl für die SOCS1- als auch für die SOCS3-Expression keine auffälligen Unterschiede gefunden werden.

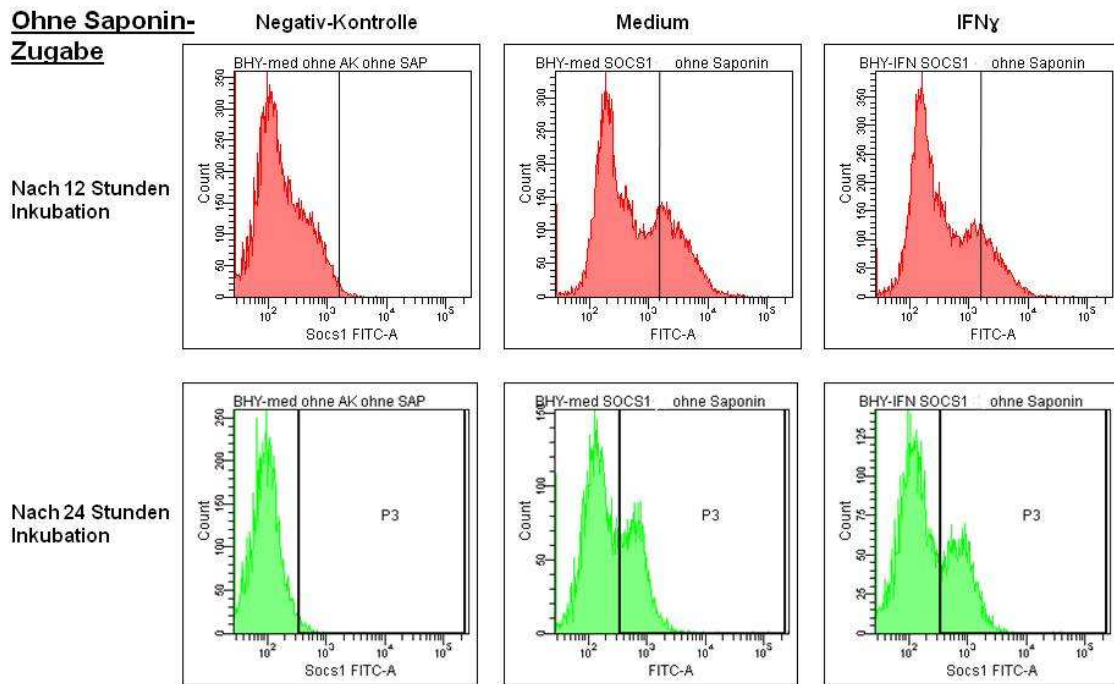
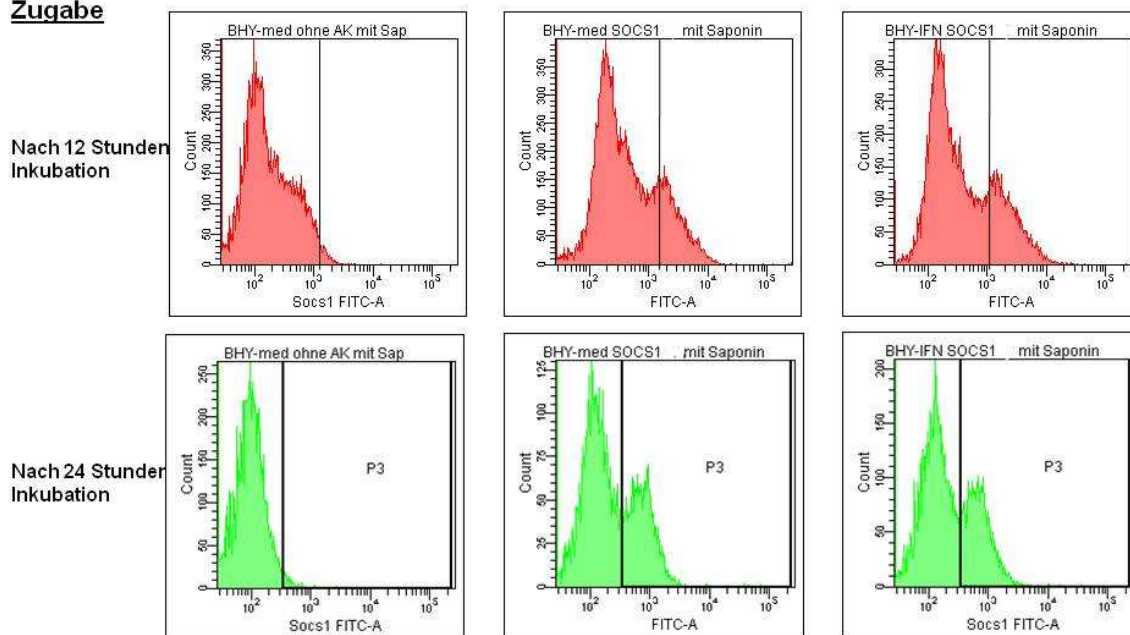
**Ohne Saponin-
Zugabe****Unter Saponin-
Zugabe**

Abbildung 10: SOCS1-Expression in der HNSCC-Tumorzelllinie BHY. Nachdem die BHY-Zellen über 12 bzw. 24 Stunden mit oder ohne IFN γ inkubiert worden sind, wird die Fluoreszenzintensität (x-Achse) der SOCS1-Antikörper gegen die Zellzahl (y-Achse) aufgetragen. Den Zellen der Graphen in den unteren beiden Zeilen ist Saponin zugegeben worden, das die Zellmembran perforiert, so dass die Antikörper hier, im Gegensatz zu denen in den oberen beiden Zeilen, auch an die intrazellulären SOCS1-Proteine binden. Die Negativ-Kontrolle (linke Spalte) ist nicht mit Antikörpern versetzt worden und entspricht jeweils der Eigenfluoreszenz der Zellen. Die entsprechenden Bereiche werden in den mittig und rechts abgebildeten Proben durch einen Balken abgetrennt.

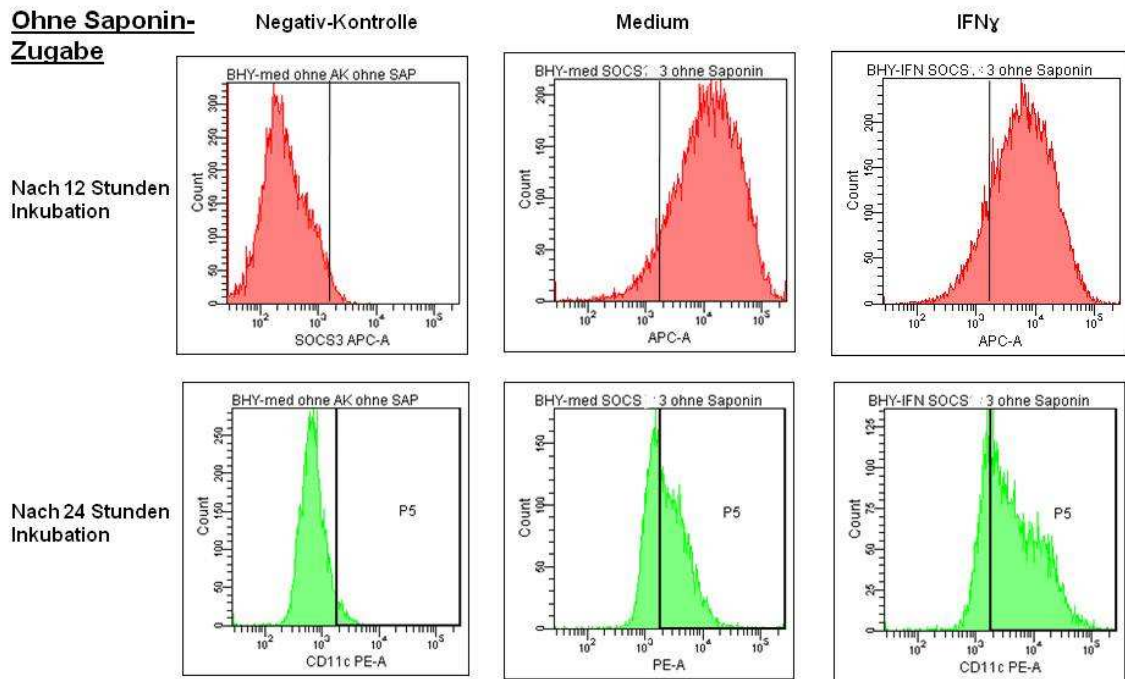
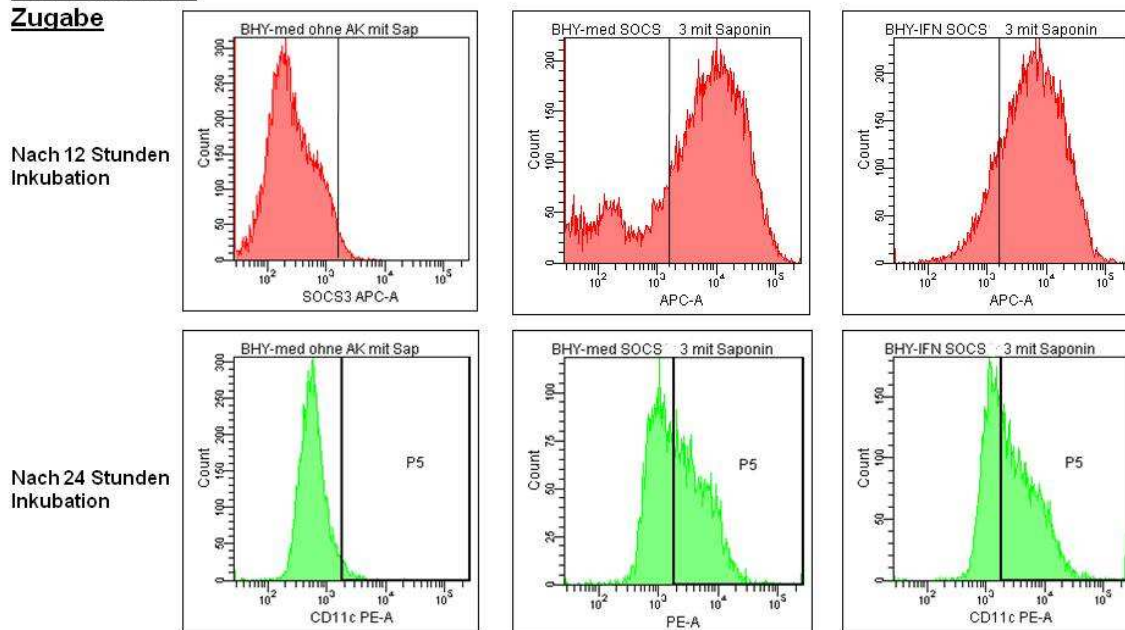
**Ohne Saponin-
Zugabe****Unter Saponin-
Zugabe**

Abbildung 11: Graphen der SOCS3-Expression der HNSCC-Zelllinie BHY. Die Zugabe des die Membran perforierenden Saponins ermöglicht das Eindringen der Antikörper in die Zelle und damit die Darstellung der intrazellulären SOCS3-Expression (untere beiden Zeilen). Es ist die Intensität der Fluoreszenz (x-Achse) gegen die Zellzahl (y-Achse) aufgetragen. Die Inkubation fand über 12 und 24 Stunden mit und ohne IFN γ statt. Der linke Graph zeigt jeweils die Negativ-Probe, die nicht mit Antikörpern versetzt wurde. Ihre Fluoreszenz ist die Eigenfluoreszenz der Zelle. Daher wird sie in den anderen beiden Proben durch den Balken abgegrenzt.

3.2.3 SOCS1-Proteine lassen sich im Gegensatz zu SOCS3-Proteinen in der Western Hybridisierung von Tumorzelllinien nachweisen

Es wurde die Western Hybridisierung mit den Proteinen der permanenten Tumorzelllinien PCI1 und BHY, sowie aus dem soliden Tumorgewebe von Lymphknoten des Levels II (T126), der Tonsille (T202) und gesundem Nasenmuschelgewebe (G60) durchgeführt.

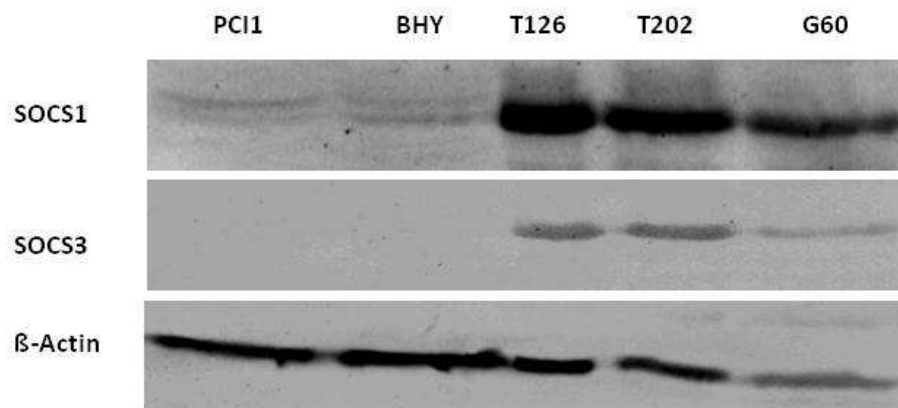


Abbildung 12: Protein-Banden der permanenten HNSCC-Zelllinien PCI1 und BHY, Gewebeprobe von tumorös veränderten Gewebeprobe (T126: Lymphknoten, T202: Tonsille) und physiologischem Gewebe der Concha nasalis (G60).

Die positiv-Kontrolle in Form von β -Actin war bei allen Proben nachweisbar. Für die PCI1- und BHY-Proben zeigten sich, übereinstimmend mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie, SOCS1-Banden. Für SOCS3-Proteine konnten jedoch keine Banden nachgewiesen werden. Sowohl die Probe des gesunden Gewebes der Nasenmuschel als auch der soliden Tumorgewebe zeigte sowohl SOCS1- als auch SOCS3-Banden.

Im Anschluss wurden BHY- und PCI13-Zellen und NIH3T3 Fibroblasten in Nährmedium, das mit 2000pg/ml INF γ oder mit 50 μ g/ml poly I:C versetzt war oder in reinem Medium über je 15 Stunden inkubiert.

β -Actin-Banden zeigen sich als positiv-Kontrolle bei allen Proben. SOCS1-Proteinbanden zeigen sich sowohl bei BHY- als auch bei PCI13-Zellen, wie zuvor bei den ohne Zusatz inkubierten Zellen (Abbildung 12) und in der Durchflusszytometrie. Bei den benignen NIH3T3-Zellen sind die Banden jedoch nur schwach zu erkennen. Die Fibroblasten zeigen jedoch deutliche SOCS3-Banden, die wiederum auch in dieser Versuchsanordnung von keiner der Tumorzelllinien demonstriert wird. Die Inkubation unter INF γ oder poly I:C hat

auch hier keinen Einfluss auf die Proteinexpression, sie bleibt im Vergleich zur Inkubation der Zellen in reinem Medium konstant. Die Versuche wurden jeweils nur einmal durchgeführt.

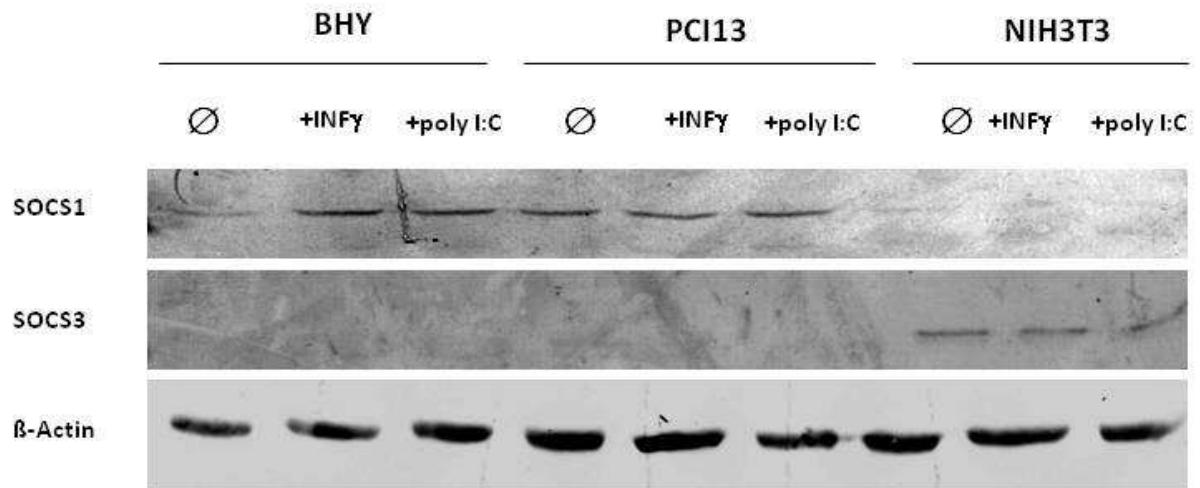


Abbildung 13: SOCS1- und SOCS3-Protein-Banden in der Western Hybridisierung nach 15 stündiger Inkubation von Tumor- (BHY und PCI13) und Fibroblasten-Zellen (NIH3T3). Die Zellen sind in reinem Nährmedium und unter Zugabe von INF γ oder poly I:C inkubiert worden.

4. Diskussion

4.1 HNSCC-Überstände beeinflussen das Expressionsprofil von myeloiden dendritischen Zellen

4.1.1 TLR-Expression von isolierten myeloiden dendritischen Zellen nach der Inkubation mit Tumorüberständen

Beim Entwickeln einer effizienten Immuntherapie für HNSCC-Patienten sind die Immune-escape-Mechanismen des Tumors das größte zu überwindende Problem. Ihre Modulation des Zytokin-Profiles beeinträchtigt die zelluläre Immunantwort mit negativen Auswirkungen für den Organismus und zu Gunsten des Tumors [12].

Es ist bekannt, dass sich in solidem Tumorgewebe zahlreiche Immunzellen und darunter auch myeloide dendritische Zellen aufhalten. Diese scheinen jedoch in ihrer Funktion eingeschränkt zu sein [26, 57]. Myeloide dendritische Zellen wurden zwar nachgewiesen, aber in verringerter Anzahl [14]. Die Aktivierung, Reifung und Zytokin-Ausschüttung der dendritischen Zellen wird durch ihre Toll-like-Rezeptoren bewirkt [3, 32]. Zu den Liganden der TLRs gehören nicht nur mikrobielle Antigene, sondern auch Bestandteile entarteter Zellen, die auf Neoplasien hinweisen [30, 39, 42, 43].

Zur genaueren Analyse der myeloiden dendritischen Zellen im Tumormilieu wurden MDCs aus dem peripheren Blut gesunder Spender isoliert und für 36 Stunden in reinem Nährmedium und im Vergleich dazu unter Zugabe von zweierlei Tumorüberständen inkubiert.

In der Durchflusszytometrie ($n = 2 - 4$) zeigte sich, dass, mit Ausnahme von TLR4 und TLR9, alle TLRs auf den MDCs, die in reinem Nährmedium inkubiert worden waren, exprimiert wurden. Dies entspricht dem bereits in Tabelle 1 dargestellten TLR-Expressionsprofil der MDCs [3, 31, 35, 37, 38].

Ito et al. [58] berichten hingegen von einer TLR4- und TLR9-Expression in PDCs und MDCs, die mit der *real time*-PCR (rt-PCR) nachgewiesen wurde. Perrot et al. [59] und Sioud et al. [60], deren Methoden nicht benannt werden und Jarrossay et al. [61], aufgrund ihrer rt-PCR-Ergebnisse, gehen von einer TLR4- jedoch nicht von einer TLR9-Expression bei MDCs aus. Die letztgenannte Arbeitsgruppe geht auch von einer TLR7-Expression in PDCs nicht aber in MDCs aus. Kadowaki et al. [62] wiesen mit der rt-PCR unter den zehn TLRs TLR4, 7 und 9 nach Gabe

bestimmter Pathogene in MDC-Vorläuferzellen nicht bzw. in nicht signifikanten Konzentrationen nach.

Für TLR4, wofür in keiner der Proben eine deutliche Expression durch die Durchflusszytometrie nachgewiesen werden konnte, wurde die Inhibierung der Phagozytose von apoptotischen Tumorzellen nach der Rezeptoraktivierung beschrieben. Gleiches wurde auch für TLR3 beschrieben, der sich in der Durchflusszytometrie deutlich nachweisen ließ. Ebenso soll hierdurch auch die Kreuzpräsentation (*cross-presentation*), d.h. die Präsentation von Antigenen aus der Umgebung an MHC I, herunterreguliert werden. Diese ist für eine Immunantwort auf Tumore und Viren besonders wichtig, da die Präsentation der Antigene durch eine gesunde Zelle stattfindet [63]. An MHC I präsentierte Antigene stimulieren die für die Tumorumwehr besonders wichtigen CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen [21, 64]. Damit wäre die in meiner Arbeit gezeigte Abwesenheit von TLR4 für die myeloide dendritische Zelle im Tumormilieu ein Vorteil, da die Kreuzpräsentation so weiterhin stattfinden kann.

Auch TLR9 konnte ich nicht klar nachweisen. Sein am häufigsten beschriebener Ligand ist nicht-methylierte CpG-DNA. CpG wird von Bakterien aber auch von nekrotischem Gewebe exprimiert [60].

Es zeigte sich bei meinen Versuchen ein Anstieg der Intensität der Expression von Toll-like Rezeptor7 auf den mit Überständen inkubierten MDCs im Vergleich zu den in reinem Nährmedium inkubierten MDCs (n = 2 - 4). Die Western Hybridisierung nach 12 Stunden Inkubation mit BHY- oder PCI 1-Überstand, zeigte ebenfalls eine verstärkte TLR7-Expression im Vergleich zu der von lediglich in reinem Nährmedium inkubierten MDCs. Für alle anderen TLRs blieb ihr Expressionsmuster in den Tumorüberständen im Vergleich zu dem im reinen Nährmedium konstant.

Als Liganden für TLR7 ebenso wie für TLR8, der ebenfalls endosomal lokalisiert ist, sind Nukleosid-Strukturen, wie die eigene RNA, Einzelstrang-RNA (*single-stranded RNA*, ssRNA) und die *short interfering RNA*, bei denen es sich um kurze Doppelstrang-RNA handelt (21 bis 27 Basenpaare) und synthetische Komponenten, wie die Imidazoquinolin-Derivate Imiquimod (IMQ) und Resiquimod bekannt [65]. TLR7 wird sowohl durch MDCs als auch durch PDCs exprimiert [58].

Die Induktion der Rezeptoren führt zur verstärkten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, wie dem wachstumsinhibierenden IFN α (insbesondere bei PDCs) und dem proinflammatorischen IL-12 (insbesondere bei MDCs). Die Produktion kostimulierender Moleküle wird angeregt und wie auch durch die Auswirkung der meisten anderen TLRs, die Th1-Ausrichtung der naiven T-Zellen verstärkt [58, 60, 65-67]. Dabei werden durch Stimulation von TLR7 und 8 auch NF- κ B und andere Transkriptionsfaktoren aktiviert [66, 68]. TLR7/8-Agonisten führen zu einer verstärkten Reifung, Migration und Aktivierung von APCs. Alle diese Prozesse und Auswirkungen sind also für den Organismus durchaus wünschenswert, da sie eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort fördern [68].

Fraglich ist, ob MDCs des Patienten im Tumormilieu ähnlich wie die hier in vitro verwendeten und nur über wenige Stunden inkubierten Zellen der gesunden Spender reagieren. Eine Untersuchung von in vivo-Zellen Erkrankter ist z.Zt. jedoch nur schwer möglich, weil keine ausreichende Menge an MDCs aus dem Tumoreal isoliert werden kann, die danach adäquat analysiert werden kann [66]. Möglich ist eine Unterdrückung der TLR7-Aktivität durch das Tumormilieu, die zur funktionellen Beeinträchtigung der MDCs beiträgt. Perrot et al. [59] konnten bei der Untersuchung von MDCs in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen nicht komplett reife dendritische Zellen finden, die funktionell eingeschränkte waren, wenig Zytokine produzierten und nur geringfügig auf TLR-Stimulationen reagierten. Auch anormal differenzierte dendritische Zellen wurden beschrieben. Die Präsentation von Antigenen an unreifen dendritischen Zellen aber führt zur Toleranz [60].

Durch das bereits geringe Vorkommen der MDCs im peripheren Blut sind die Möglichkeiten der Untersuchungen grundsätzlich sehr eingeschränkt und eine effiziente Isolierungsmethode wird benötigt. Nach der Durchführung der in meiner Arbeit verwendeten Methode, der *magnetic bead separation* konnte eine Zellreinheit von 90% nachgewiesen werden [56].

Dem synthetischen Nukleosid-Analogon Imiquimod wird durch seine Wirkung v.a. auf TLR7 aber auch auf das phylogenetisch eng verwandte TLR8 [68] das Auslösen einer antiviralen und antitumoralen Immunantwort mit antiangiogenetischen Effekten zugeschrieben. Als Immunantwort-Modifizierer

(*immune response modifier*, IRM) war Imiquimod bereits 1997 als Creme gegen durch HPV ausgelöste Genitalwarzen im Handel [65, 68-70]. Unterdessen wird es nicht nur zur Therapie von Warzen, aktinischer Keratose und Basaliomen lokal appliziert, wo es eine Entzündungsreaktion bewirkt [66, 71], sondern auch bei Hautneoplasien [65, 66] und der chronisch myeloischen Leukämie [65] angewendet. In klinischen Studien werden TLR7/8-Agonisten als Vakzin-Adjuvantien bei Melanom-Patienten getestet [70]. Sogar Apoptose-induzierende bzw. die Sensibilität der Zelle hierfür verstärkende Eigenschaften werden ihm zugeschrieben [68]. Auf der anderen Seite werfen Smits et al. [65] die Frage auf, ob nicht der Tumor zur Proliferation durch das induzierte Entzündungsmilieu angeregt wird. Während IMQ bei Basal-Zell-Karzinomen die Apoptose anregt, führen Loxoribin und R484, die ebenfalls TLR7/8-Liganden sind, bei bestimmten multiplen Myeloma-Typen zur Zellproliferation [65]. TLR-Liganden als Immunadjuvantien können sowohl antitumorale als auch eine für den Tumor nützliche Wirkung im Milieu verschiedener Tumore haben [42].

Es ist zu überlegen, ob trotzdem nicht auch der Einsatz von Imiquimod oder anderen Imidazoquinolin-Derivaten bei HNSCC denkbar wäre. Sie würden den antitumoralen Effekt, der durch die TLR7-Aktivierung entsteht, als Rezeptor-Agonist verstärken. Dies wäre jedoch aufgrund der z.T. schwer zugänglichen Lokalisation der Karzinome und der topischen Anwendung von IMQ schwer durchführbar. Eine systemische Gabe wird aufgrund der starken Entzündungsreaktion und Nebenwirkungen, zu denen auch die Gefahr von Autoimmunreaktionen auf IMQ als starkem Immunaktivator gehört, vermieden [65, 70]. Eine weitere Möglichkeit wäre der Einsatz von TLR7/8-Agonisten als Vakzin-Adjuvantien, wie bei Melanom-Patienten [63, 65].

Zu bedenken ist ferner, dass unterschiedliche Liganden der selben TLRs unterschiedliche Reaktionen der dendritischen Zellen auslösen [33, 58, 62, 63, 68, 72]. Dies ist ein entscheidender Punkt, der genaueren Untersuchungen bedarf um die Zellen durch die Liganden oder ihre Signalwege therapeutisch beeinflussen zu können.

TLR3, 7, 8 und 9 sind endosomal lokalisiert [65], die anderen TLRs lediglich in der Zellmembran, was teilweise auch mit der Lokalisation ihrer Liganden korreliert [3,

31]. Es zeigte sich jedoch in meiner Arbeit für keinen der zehn Toll-like-Rezeptoren ein Unterschied zwischen den Ergebnissen der Versuche die mit und denen, die ohne das membranperforierende Saponin durchgeführt wurden. Dies mag an einer zu geringen Konzentration oder einer zu kurzen Wirkungszeit gelegen haben.

4.1.2 SOCS1- und SOCS3-Expression von isolierten myeloiden dendritischen Zellen nach der Inkubation mit Tumorüberständen

Unter den selben Bedingungen ist mit Hilfe der Durchflusszytometrie auch der Einfluss der Tumorüberstände auf das Expressionsverhalten von suppressor of cytokine signaling-Proteinen 1 und 3 in MDCs aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern untersucht worden (n=2). Suppressor of cytokine signaling-Proteine modulieren die Wirkung von Zytokinen auf die einzelnen Zellen, indem sie deren Signalkaskade-Weg inhibieren [20, 46]. Zytokine induzieren die Differenzierung, Proliferation, Migration und Apoptose der Zellen und sind damit von wesentlicher Bedeutung für die Immunzellen, wie die dendritischen Zellen [20], deren Aktivierung sie regulieren [54]. Hierdurch sind sie essentiell für die physiologische Immunantwort aber auch an der Entwicklung von Störungen dieser beteiligt [73], durch die sich möglicherweise Karzinome entwickeln können.

SOCS1 unterdrückt STAT1, welches Makrophagen und dendritische Zellen aktiviert. Daher ist SOCS1 ein negativer APC-Regulator [73]. Es reguliert deutlich die Stimulierbarkeit der dendritischen Zellen und das Ausmaß der Immunantwort. Eine verminderte Expression führt zur verstärkten Antigen-spezifischen Antitumor-Immunität, einer verstärkten zytotoxischen T-Zell-Antwort [53, 74] und einer Betonung der Th1-Zytokin-Produktion der T-Lymphozyten (IFN γ , TNF α) [74]. Während SOCS1 die T-Zell-Stimulation herabsetzt [53]. *Socs^{-/-}-knockout*-Mäuse zeigten nicht nur höhere Konzentrationen von kostimulierenden Molekülen, sondern entwickelten sogar Autoimmunkrankheiten [75].

Die erwünschte, antitumorale, verminderte SOCS1-Expression, die durch IFN γ , IL-2 und IL-12 bewirkt wird, lässt sich durch die Ergebnisse der Durchflusszytometrie nicht zeigen [53]. Shen et al. [53] gehen bei reduzierter SOCS1-Expression von einer starken Induktion einer effektiven Antigen-spezifischen Antitumor-Antwort

aus, die schwach immunogene Tumore in ihrem Wachstum hemmt und bei gleichzeitiger Gabe die Potenz eines möglichen Tumor-Vakzins steigert. Auch Dimitriou et al. [75] erwägen den Nutzen von Socs1-Gen-freien dendritischen Zellen im Rahmen der Tumorthherapie.

Das Ausbleiben eines veränderten Expressionsmusters mag für SOCS1 und SOCS3 an der Tumorart, den fehlenden induzierenden Zytokinen oder einer zu kurzen oder zu langen Inkubationszeit liegen.

SOCS3 unterdrückt STAT3, das Makrophagen und dendritische Zellen aktiviert, so dass SOCS3 ein positiver APC-Regulator ist [73]. Es beeinflusst IL-6 und G-CSF negativ [74].

Sowohl das proinflammatorische IL-6 als auch das antiinflammatorische IL-10 aktivieren STAT3 [74]. Die STAT3/SOCS3-Achse, die über pro- oder antiinflammatorische Reaktionen entscheidet, ist sehr genau ausbalanciert [75]. Wobei dendritische Zellen von *Socs3^{-/-}knockout*-Mäusen T-Zellen schlechter aktivieren als der Wildtyp [73], so dass ein Anstieg der SOCS3-Expression als Antitumor-Antwort zu erwarten gewesen wäre.

SOCS1-Proteine waren sowohl unter der Gabe von Saponin als auch ohne sie in der FACS-Analyse nachweisbar. Die Expression von SOCS3-Proteinen konnte nach der Zugabe von Saponin sehr deutlich nachgewiesen werden. Ohne Saponin zeigte sich nur ein geringfügiger Nachweis von SOCS3-Proteinen.

Hierbei, ebenso wie bei der Betrachtung der TLR-Expression auf MDCs, ist zu berücksichtigen, dass es sich bei den Versuchen in meiner Arbeit um MDCs von gesunden Spendern handelt, die lediglich über 36 Stunden mit dem Tumorüberstand inkubiert worden waren. Es wurden keine Tumorzellen verwendet. Auch kann so nicht beurteilt werden, ob sich nicht MDCs von Tumorpatienten anders in soliden Tumoren verhalten. Hierbei lägen möglicherweise Unterschiede zu den durchgeführten Versuchen vor, da zwar eine deutliche Infiltration des Tumorgewebes durch Immunzellen beschrieben wird, gleichzeitig aber auch von einer deutliche Einschränkung der Antigen-präsentierenden Funktion der dendritischen Zellen berichtet wird [26]. Diese bzw. ihre Auswirkung auf die TLR- und SOCS- Expression in vivo kann durch die durchgeführte Arbeit nicht komplett in vitro betrachtet werden.

4.2 SOCS1- und SOCS3-Expression bei permanenten Tumorzelllinien unter Zytokineinwirkung

Nicht nur das Überleben, die Proliferation, Differenzierung und Funktion der Zellen des Immunsystems, auch die der Zellen der meisten anderen Organe werden durch Zytokine reguliert [51, 73, 74], deren Wirkung wiederum durch SOCS-Proteine reguliert wird.

Weber et al. [51] beschreiben, dass bei 90% der untersuchten HNSCC-Proben der SOCS3-Promotor methyliert und SOCS3 damit herunterreguliert war, was wiederum den Jak/STAT-Weg aktivierte. Die Autoren gehen davon aus, dass dies ein wichtiger Schritt der Karzinogenese ist. Während die Inhibierung dieses Weges das Tumorstadium unterdrückt und die Apoptose unterschiedlicher Karzinomtypen induziert. Ebenso wird über die verminderte SOCS3-Expression in Lungenkarzinom-Zellen an anderer Stelle berichtet, was mit dem Wachstum des Tumors assoziiert wird. Auf der anderen Seite ist SOCS3 in chronisch myeloischen Leukämiezellen, v.a. in der Blastenkrise exprimiert, was zur Resistenz gegen die IFN γ -Therapie beitragen mag [74]. Weber et al. [51] zeigten in mehreren Tumorzelllinien, darunter auch BHY, mit Hilfe der PCR, dass die SOCS3-Transkription nicht oder kaum stattgefunden hatte. Sie vermuten, dass es sich bei SOCS3 um ein bedeutendes Tumor-Suppressor-Gen handelt.

Der von mir lediglich einmal durchgeführte Western Blot erbrachte für Zellen aus Tumorgewebe sowie für gesundes Gewebe der Concha nasalis den Nachweis von SOCS1- und SOCS3-Proteinen. Der Western Blot der Tumorzelllinien zeigt ebenso wie das Ergebnis der Durchflusszytometrie in meiner Arbeit die Präsenz von SOCS1-Proteinen. SOCS3-Proteine waren in meiner Arbeit, ähnlich wie bei den meisten von Weber et al. untersuchten Proben, im Western Blot in Zelllinien nicht nachweisbar. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind möglicherweise damit zu erklären, dass bei den Gewebeproben eine Verunreinigung durch z.B. gesunde Zellen oder das Tumorgewebe infiltrierende Immunzellen vorliegt. Auch bei den Versuchen von Weber et al. waren nicht alle Nachweise von SOCS3 negativ. Die von mir durchgeführte Durchflusszytometrie hatte hingegen den Nachweis für SOCS1- und SOCS3-Proteine erbracht. Auch Weber et al. berichteten von unterschiedlichen Ergebnissen bei verschiedenen verwendeten Methoden.

Um nun zu sehen, ob weitere äußere Faktoren Einfluss auf die Expression von SOCS1 und 3 in Tumorzellen haben, wurden Zellen der Tumorzelllinien BHY und PCI13 und vergleichsweise NIH3T3 Fibroblasten in reinem Nährmedium und unter Zugabe des antitumoral wirkenden INF γ oder des Immunstimulanz und TLR3 Liganden poly I:C, welches strukturelle Ähnlichkeiten mit Doppelstrang-RNA aufweist [76, 77], inkubiert. Die Expression blieb unter allen drei Inkubationsmöglichkeiten konstant. Bei beiden Tumorzelllinien ließen sich SOCS1-Proteine nachweisen, jedoch keine SOCS3. Die Fibroblastenzellen zeigten im Gegensatz hierzu den Tumorsuppressor SOCS3 und kaum erkennbare SOCS1-Banden. Dies unterstützt die These, dass SOCS3 ein Tumorsuppressor ist, der das Wachstum unterdrückt und zur Apoptose führt [51].

Die Aussagekraft dieses Ergebnisses ist eingeschränkt, da dieser Versuch lediglich einmal durchgeführt wurde. Es wurde nicht untersucht, ob bei höheren oder niedrigeren Konzentrationen oder anderen Inkubationszeiträumen Veränderungen auftreten. Die Auswirkung von poly I:C und INF γ auf Immunzellen des Organismus, die dann mit den Tumorzellen reagieren, wurde ebenfalls nicht untersucht.

SOCS1 betrachten Yoshimura et al. [74] als mögliches anti-Onkogen. Die DNA-Hypermethylierung von SOCS1-Genen ist bereits in anderen Tumoren (Kolon, Magen, Ovar, Lunge und Mamma) beschrieben worden. Daher ist es ein mögliches Ziel der Tumorthherapie. Es scheint das Tumorstadium zu unterdrücken und Apoptose in hepatozellulären Karzinomen, deren SOCS1-Expression angeregt wurde, induzieren zu können [51]. Daher profitiert der Tumor von einer verminderten SOCS1-Expression. SOCS1 konnte sowohl in der Durchflusszytometrie als auch durch die Western Blots der Zelllinien, die mit INF γ und poly I:C inkubiert wurden, nachgewiesen werden. Dies mag daran liegen, dass sich HNSCC-Zellen anders verhalten als andere Tumorzellen oder explizit an den andersartigen Eigenschaften der Tumorzelllinien im Vergleich zu anderen Zelllinien bzw. solidem Tumorgewebe.

Zusammenfassend ist die Immunmodulation myeloider dendritischer Zellen ein hochkomplexes Netzwerk interzellulärer Wechselwirkungen. Ein Großteil der molekularen Mechanismen liegt nach wie vor im Dunkeln.

Man geht davon aus, dass es durch unterschiedliche Oberflächenrezeptoren, wie TLRs, EGF-R (*epidermal growth factor-receptor*) und Fcγ-R (*fragment, crystallizable*) zum Zell-Zell-Kontakt zwischen den HNSCC- und den Immunzellen kommt. Der Tumor erkennt die Immunzellen. Die Zellen des Immunsystems infiltrieren den Tumor und sezernieren Th1-Zytokine. Diese führen zur Aktivierung von Abwehrmechanismen des Tumors. All diese Stimuli und Interaktionen bewirken über verschiedene Mediatoren (p38 MAPK, SOCS, STAT3) und Transkriptionsaktivatoren, wie NF-κB die Induktion unterschiedlicher Biosynthesewege in den HNSCC-Zellen. Diese führen zur Sekretion immunmodulierender Zytokine durch die Tumorzellen. Sie führen zur funktionellen Beeinflussung der den Tumor infiltrierenden Immunzellen über deren Rezeptoren und Mediatoren (TLRs, Fcγ-R und SOCS-Proteine), was zur Th1-Inhibierung und zur Sekretion tumorfördernder Zytokine, wie IL-1 durch die Immunzellen führt. So entsteht ein dauerhaftes, sich selbst stimulierendes Netzwerk, welches für das Ausbleiben einer effizienten antitumoralen Immunantwort verantwortlich ist und die Proliferation und Metastasierung des Tumors massiv unterstützt. Ziel der weiteren Forschung im Rahmen der Immuntherapie muss es sein Angriffspunkte zu finden, über die die Immunescape-Mechanismen der Tumorzellen überwunden oder ausgeschaltet werden können.

5. Zusammenfassung

Die schlechte Prognose der Patienten mit Karzinomen im Bereich des Kopfes und Halses hat sich innerhalb der letzten 40 Jahre durch die chirurgische Behandlung, die Chemo- und Strahlentherapie kaum verändert. Dies macht eine intensive Suche nach geeigneten Alternativen, wie der Immuntherapie notwendig. Hierbei sind besonders die myeloiden dendritischen Zellen als stärkste Antigen-präsentierende Zellen und Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem von großem Interesse. Es ist bekannt, dass sie im Tumormilieu funktionell eingeschränkt sind, was die T-Zell-Aktivierung negativ beeinflusst. Daher sollte das Expressionsmuster ihrer Mustererkennungsrezeptoren TLR1-10 und der SOCS1- und SOCS3-Proteine, die die intrazellulären, durch Zytokine ausgelösten Signalkaskaden inhibieren, genauer untersucht werden.

Die Durchflusszytometrie-Untersuchung von myeloiden dendritischen Zellen gesunder Spender, die über 36 Stunden in reinem Medium inkubiert waren, zeigte, dass alle TLRs, mit Ausnahme von TLR4 und 9 durch die MDCs der gesunden Spender exprimiert wurden. Diese Methode war zur Untersuchung der TLR-Expression bisher nicht möglich gewesen, da keine Antikörper existierten. TLR7 zeigte unter der Einwirkung von Tumor-Überständen eine Steigerung der Expression bei den Zellen. Da die TLR7-Aktivierung zu antitumoralen Effekten führen kann, ist dies ein möglicher Hinweis darauf, dass die Expression von TLR7 im Tumormilieu unterdrückt wird. So dass eine künstliche Induktion durch TLR7-Agonisten die physiologische, antitumorale Immunreaktion unterstützen könnte. Dies bedarf jedoch weiterführender Untersuchungen in vivo.

Eine Veränderung der nachweisbaren SOCS1- und SOCS3-Expression konnte unter Einfluss von Tumorüberständen im Vergleich zur Inkubation in reinem Nährmedium nicht festgestellt werden, was daran liegen kann, dass mögliche Manipulationen dieser Proteine, die im erkrankten Organismus ablaufen, in vitro unter Einfluss der Überstände nicht auftreten.

Die in Anlehnung an die Veröffentlichung von Weber et al. 2005 in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung von permanenten Tumorzelllinien und der Fibroblastenlinie, die mit INF γ oder poly I:C inkubiert wurden, zeigt, dass benigne und maligne Zellen ein unterschiedliches SOCS-Profil exprimieren. Ein direkter

Zusammenhang zwischen diesem und INF γ oder poly I:C konnte jedoch nicht gezeigt werden. Die Expression von SOCS3 auf benignen Zellen und nicht auf Tumorzellen stützt jedoch die These, dass es sich bei SOCS 3 um einen Tumorsuppressor handelt, wessen Promotor-Gene wie von Weber et al. beschrieben als Teil der Karzinogenese methyliert werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Hunter, K.D., E.K. Parkinson, and P.R. Harrison, *Profiling early head and neck cancer*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(2): p. 127-35.
2. Probst, R., G. Grevers, and H. Iro, *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*. 2. ed. Vol. 1. 2004.
3. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-95.
4. Chin, D., et al., *Head and neck cancer: past, present and future*. Expert Rev Anticancer Ther, 2006. **6**(7): p. 1111-8.
5. Chin, D., et al., *Molecular introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis*. Br J Plast Surg, 2004. **57**(7): p. 595-602.
6. Riede, U.-N., M. Werner, and H.-E. Schaefer, *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 5. ed. Vol. 1. 2004, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
7. Boenninghaus, H.-G. and T. Lenarz, *HNO*. 12. ed. 2005, Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
8. Werner, J.A. and B.M. Lippert, *HNO-Heilkunde*. 1. ed. Vol. 1. 2003, Stuttgart: Schattauer Verlag.
9. Chen, R., L.M. Aaltonen, and A. Vaheri, *Human papillomavirus type 16 in head and neck carcinogenesis*. Rev Med Virol, 2005. **15**(6): p. 351-63.
10. cancer.net, *Head and Neck cancer*, in <http://www.cancer.net/patient/Cancer+Types/Head+and+Neck+Cancer/ci.Head+and+Neck+Cancer.printer>. [Zugriff: 16.12.2008].
11. Chin, D., et al., *Invasion and metastasis markers in cancers*. Br J Plast Surg, 2005. **58**(4): p. 466-74.
12. Pries, R. and B. Wollenberg, *Cytokines in head and neck cancer*. Cytokine Growth Factor Rev, 2006. **17**(3): p. 141-6.
13. DKFZ.Krebsinformationsdienst, *Tumormarker: Krebszellen hinterlassen Spuren im Blut*, in <http://www.krebsinformationsdienst.de/themen/untersuchung/tumormarker.php>. [Zugriff: 16.12.2008].
14. Hoffmann, T., Whiteside, TL, Bier, H, *Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs*. Springer Medizin Verlag HNO, 2005. **3**.
15. Whiteside, T.L., *Immunobiology of head and neck cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2005. **24**(1): p. 95-105.
16. Janeway, C.A., *Immunology*. 6 ed. 2005, Oxford, UK: Garland Science Publishing.
17. Schnurr, M., et al., *Dendritische Zellen - Träger tumorgerichteter Immuntherapie*. Deutsches Ärzteblatt, 2002: p. 2408-2416.
18. Hahn, H., et al., *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 5 ed. 2005, Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
19. Hof, H. and R. Dörries, *Medizinische Mikrobiologie*. 3 ed. 2005, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
20. Löffler, G. and P.E. Petrides, *Biochemie und Pathobiochemie*. 7 ed. 2003, Berlin: Springer-Verlag.
21. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
22. Hart, D.N., *Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response*. Blood, 1997. **90**(9): p. 3245-87.

23. Staatsbibliothek, B., Langerhans, Paul, in <http://mdz10.bib-bvb.de/~db/0001/bsb00016330/images/index.html?id=00016330&fip=84.142.213.238&no=3&seite=609>. [Zugriff: 07.01.2009].
24. Lambrecht, B.N. and H. Hammad, *Myeloid dendritic cells make it to the top*. Clin Exp Allergy, 2002. **32**(6): p. 805-10.
25. Merad, M., et al., *Differentiation of myeloid dendritic cells into CD8alpha-positive dendritic cells in vivo*. Blood, 2000. **96**(5): p. 1865-72.
26. 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.
27. Schnurr, M., et al., *Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery*. Blood, 2005. **105**(6): p. 2465-72.
28. Salaun, B., P. Romero, and S. Lebecque, *Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis*. Eur J Immunol, 2007. **37**(12): p. 3311-8.
29. Kirk, P. and J.F. Bazan, *Pathogen recognition: TLRs throw us a curve*. Immunity, 2005. **23**(4): p. 347-50.
30. Janssens, S. and R. Beyaert, *Role of Toll-like receptors in pathogen recognition*. Clin Microbiol Rev, 2003. **16**(4): p. 637-46.
31. Systems, R.D., *The Toll-like Receptor Family*, in http://www.rndsistemas.com/mini_review_detail_objectname_MR04_TollLikeReceptorFamily.aspx. [Zugriff:12.01.2009].
32. Kaisho, T. and S. Akira, *Toll-like receptor function and signaling*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(5): p. 979-87; quiz 988.
33. Schnare, M., et al., *Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2001. **2**(10): p. 947-50.
34. Pandey, S. and D.K. Agrawal, *Immunobiology of Toll-like receptors: emerging trends*. Immunol Cell Biol, 2006. **84**(4): p. 333-41.
35. Muzio, M., et al., *Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells*. J Immunol, 2000. **164**(11): p. 5998-6004.
36. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. Cell Death Differ, 2006. **13**(5): p. 816-25.
37. 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.
38. Hogrefe, L., *Identifizierung und Charakterisierung von TLR3 bei malignen Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC)*. 2008, Med. Diss., Lübeck.
39. Tsan, M.F., *Toll-like receptors, inflammation and cancer*. Semin Cancer Biol, 2006. **16**(1): p. 32-7.
40. Zarembek, K.A. and P.J. Godowski, *Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines*. J Immunol, 2002. **168**(2): p. 554-61.
41. Muzio, M. and A. Mantovani, *Toll-like receptors (TLRs) signalling and expression pattern*. J Endotoxin Res, 2001. **7**(4): p. 297-300.
42. Pries, R., S. Wulff, and B. Wollenberg, *Toll-like receptor modulation in head and neck cancer*. Crit Rev Immunol, 2008. **28**(3): p. 201-13.

43. Wolska, A., E. Lech-Maranda, and T. Robak, *Toll-like receptors and their role in carcinogenesis and anti-tumor treatment*. Cell Mol Biol Lett, 2008.
44. Navabi, H., et al., *A clinical grade poly I:C-analogue (Ampligen((R))) promotes optimal DC maturation and Th1-type T cell responses of healthy donors and cancer patients in vitro*. Vaccine, 2009. **27**(1): p. 107-15.
45. Goto, Y., et al., *Activation of Toll-like receptors 2, 3, and 4 on human melanoma cells induces inflammatory factors*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(11): p. 3642-53.
46. Alexander, W.S. and D.J. Hilton, *The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 503-29.
47. Heeg, K. and A. Dalpke, *TLR-induced negative regulatory circuits: role of suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins in innate immunity*. Vaccine, 2003. **21 Suppl 2**: p. S61-7.
48. Dalpke, A.H., et al., *Suppressors of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3 are induced by CpG-DNA and modulate cytokine responses in APCs*. J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7082-9.
49. Dalpke, A., et al., *Regulation of innate immunity by suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins*. Immunobiology, 2008. **213**(3-4): p. 225-35.
50. Prele, C.M., et al., *SOCS1 regulates the IFN but not NFkappaB pathway in TLR-stimulated human monocytes and macrophages*. J Immunol, 2008. **181**(11): p. 8018-26.
51. Weber, A., et al., *SOCS-3 is frequently methylated in head and neck squamous cell carcinoma and its precursor lesions and causes growth inhibition*. Oncogene, 2005. **24**(44): p. 6699-708.
52. Lee, T.L., et al., *Epigenetic modification of SOCS-1 differentially regulates STAT3 activation in response to interleukin-6 receptor and epidermal growth factor receptor signaling through JAK and/or MEK in head and neck squamous cell carcinomas*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(1): p. 8-19.
53. Shen, L., et al., *Silencing of SOCS1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(12): p. 1546-53.
54. Yoshimura, A., T. Naka, and M. Kubo, *SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(6): p. 454-65.
55. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. 260 ed. 2004: Walter de Gruyter Verlag.
56. Brocks, C., et al., *Isolation of human myeloid dendritic cells from tumor tissue and peripheral blood*. In Vivo, 2006. **20**(2): p. 239-42.
57. Brocks, C.P., et al., *Functional alteration of myeloid dendritic cells through head and neck cancer*. Anticancer Res, 2007. **27**(2): p. 817-24.
58. 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.
59. Perrot, I., et al., *Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2763-9.
60. Sioud, M. and Y. Floisand, *TLR agonists induce the differentiation of human bone marrow CD34+ progenitors into CD11c+ CD80/86+ DC capable of inducing a Th1-type response*. Eur J Immunol, 2007. **37**(10): p. 2834-46.
61. 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.

62. 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.
63. Weck, M.M., et al., *TLR ligands differentially affect uptake and presentation of cellular antigens.* Blood, 2007. **109**(9): p. 3890-4.
64. Wells, J.W., et al., *Combined triggering of dendritic cell receptors results in synergistic activation and potent cytotoxic immunity.* J Immunol, 2008. **181**(5): p. 3422-31.
65. Smits, E.L., et al., *The use of TLR7 and TLR8 ligands for the enhancement of cancer immunotherapy.* Oncologist, 2008. **13**(8): p. 859-75.
66. Sary, G., et al., *Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells.* J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1441-51.
67. Deane, J.A., et al., *Control of toll-like receptor 7 expression is essential to restrict autoimmunity and dendritic cell proliferation.* Immunity, 2007. **27**(5): p. 801-10.
68. Schön, M.P. and M. Schön, *TLR7 and TLR8 as targets in cancer thapy.* Oncogene, 2008. **27**: p. 190-199.
69. Vollmer, J., et al., *Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8.* J Exp Med, 2005. **202**(11): p. 1575-85.
70. Adams, S., et al., *Immunization of malignant melanoma patients with full-length NY-ESO-1 protein using TLR7 agonist imiquimod as vaccine adjuvant.* J Immunol, 2008. **181**(1): p. 776-84.
71. Novak, N., et al., *Toll-like receptor 7 agonists and skin.* Drug News Perspect, 2008. **21**(3): p. 158-65.
72. 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.
73. Kubo, M., T. Hanada, and A. Yoshimura, *Suppressors of cytokine signaling and immunity.* Nat Immunol, 2003. **4**(12): p. 1169-76.
74. Yoshimura, A., et al., *Negative regulation of cytokine signaling and immune responses by SOCS proteins.* Arthritis Res Ther, 2005. **7**(3): p. 100-10.
75. Dimitriou, I.D., et al., *Putting out the fire: coordinated suppression of the innate and adaptive immune systems by SOCS1 and SOCS3 proteins.* Immunol Rev, 2008. **224**: p. 265-83.
76. Dai, X., et al., *SOCS1-negative feedback of STAT1 activation is a key pathway in the dsRNA-induced innate immune response of human keratinocytes.* J Invest Dermatol, 2006. **126**(7): p. 1574-81.
77. Stone, G.W., et al., *Regression of established AB1 murine mesothelioma induced by peritumoral injections of CpG oligodeoxynucleotide either alone or in combination with poly(I:C) and CD40 ligand plasmid DNA.* J Thorac Oncol, 2009. **4**(7): p. 802-8.

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. B. Wollenberg, die mir die Durchführung der vorliegenden Arbeit durch das Überlassen des Themas und die Bereitstellung der benötigten Geräte und Materialien ermöglichte.

Herrn Dr. rer. nat. Ralph Pries danke ich für die freundliche Betreuung, die entgegengebrachte Geduld, die ständige Ansprechbarkeit und die zahlreichen, weiterführenden Diskussionen.

Mein großer Dank gilt Frau Ewelina Szymanski, Frau Brigitte Wollmann, Dr. rer. nat. Christine Riebe, Dr. med. Carsten Brooks und Dr. med. Henning Frenzel für ihre geduldige Unterstützung bei der Einarbeitung in die Methoden und ihre große Hilfsbereitschaft.

Ich danke der Arbeitsgruppe, allen weiteren wissenschaftlichen Mitarbeitern und Doktoranden für die freundschaftliche Aufnahme in die Gruppe, die gute Arbeitsatmosphäre und die gegenseitige Unterstützung.

Dr. med. Ulrike Brocks danke ich für die Hilfe bei der Erstellung des Layouts und ganz besonders Mirja Loth für die Erstellung der beiden Abbildungen der Einleitung.

Mein größter Dank aber gilt meinen Eltern, ohne die weder mein Studium noch die Entstehung der vorliegenden Dissertationsarbeit in dieser Form möglich gewesen wäre.

8. Lebenslauf

Bettina Hoffmann



PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

Geburtsdatum: 22. Juli 1982, in Hamburg

STUDIUM

Okt. 2002 – Nov. 2008	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
August 2004	Physikum
Okt. 2005 – Juli 2006	Anfertigung des experimentellen Teils der Dissertationsarbeit
Okt. 2006 – Juni 2007	Studium an der Università degli Studi di Parma, Italien als Stipendiatin im Rahmen des Erasmus-Programms

Praktisches Jahr

Aug. – Okt. 2007	Innere Medizin: McMaster University, Hamilton, Kanada
Okt. – Dez. 2007	Asklepios Klinik Bad Oldesloe
Dez. 2007-März 2008	Chirurgie: Berufsgenossenschaftliches Unfallkrankenhaus Hamburg
April – Juli 2008	Neurochirurgie: Kantonsspital St. Gallen, Schweiz
November 2008	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung und Erhalt der Approbation als Ärztin

BERUFLICHER WERDEGANG

Mai 2009 - Jan. 2010	Assistenzärztin in der Klinik für Unfallchirurgie und Orthopädische Chirurgie der Asklepios-Klinik Nord - Heidberg, Hamburg
Feb. 2010 – Jan. 2011	Assistenzärztin in der Klinik für Unfall-, Hand-, Wiederherstellungschirurgie und orthopädische Chirurgie der Asklepios Klinik Altona, Hamburg
seit Februar 2011	Assistenzärztin in der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie der Asklepios- Klinik Nord - Heidberg, Hamburg

Publikationsliste

Toll like receptor interference in myeloid dendritic cells through head and neck cancer

Frenzel H., Hoffmann B., Brocks C., Schlenke P., Pries R., Wollenberg B.
Anticancer Research 2006 Nov.-Dec., 26 (6B): 4409-13

Toll like-Rezeptor Interaktionen zwischen myeloiden dendritischen Zellen bei Hals-Kopf-Tumoren (HNSCC)

Graefe H., Frenzel H., Hoffmann B., Brocks C., Schlenke P., Pries R., Wollenberg B.
78. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde,
Kopf- und Hals-Chirurgie e.V., München, 16.-20.05.2007, Poster

Hamburg, den 21.02.2011