

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Professor Dr. med. Alexander Berghaus

**Sanierung der Immunfunktion von Patienten mit
Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereichs durch
Cyclooxygenase 2-Inhibition**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Lina Magdalene Lauffer
aus Köln

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	PD Dr. rer. nat. Reinhard Zeidler
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dolores J. Schendel
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Thomas Kirchner Prof. Dr. med. Rolf Issels
Dekan:	Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	3. April 2008

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	4
1.1	KLINISCHE GRUNDLAGE	4
1.1.1	EPIDEMIOLOGIE VON KARZINOMEN DES KOPF- UND HALSBEREICHS	4
1.1.2	PLATTENEPIHELKARZINOME	5
1.1.3	KLASSIFIKATION VON HNSCC	6
1.1.4	KLINIK	8
1.1.5	THERAPIE	8
1.1.5.1	Chirurgische Therapie	9
1.1.5.2	Strahlentherapie und Chemotherapie	9
1.2	RISIKO UND TUMORENTSTEHUNG	11
1.2.1	RISIKOFAKTOREN FÜR EIN HNSCC SIND NIKOTIN UND ALKOHOL	11
1.2.2	KARZINOGENESE	11
1.2.3	THEORIE DER IMMUNÜBERWACHUNG	12
1.3	IMMUNSYSTEM	13
1.3.1	ANGEBORENE UNSPEZIFISCHE IMMUNITÄT	14
1.3.2	SPEZIFISCHE ERWORBENE IMMUNITÄT	14
1.3.3	ZELLEN DES IMMUNSYSTEMS	15
1.3.3.1	Neutrophile Granulozyten	15
1.3.3.2	Monozyten/Makrophagen	16
1.3.3.2.1	Adhäsion und Migration	16
1.3.3.3	Natürliche Killerzelle (NK-Zelle)	16
1.3.3.4	T-Lymphozyten: T-Helferzelle	17
1.3.3.5	T- Lymphozyten: Zytotoxische T-Zelle	17
1.3.3.6	B-Lymphozyten	17
1.3.4	ZYTOKINE UND CHEMOKINE	18
1.4	MECHANISMEN, DURCH DIE TUMORE DER IMMUNABWEHR ENTGEHEN	19
1.4.1	CYCLOOXYGENASEN KATALYSIEREN DIE PROSTAGLANDIN E ₂ BILDUNG	19
1.4.2	TUMORE KÖNNEN DURCH CYCLOOXYGENASE 2 ÜBEREXPRESSION IMMUNSUPPRESSION INDUZIEREN	21
1.5	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	22
1.6	STUDIENDESIGN	23
1.6.1	STUDIENZIEL	23
1.6.2	STUDIENART	23
1.6.3	STUDIENPROTOKOLL	23
1.6.4	STUDIENMEDIKATION	25
1.6.5	ZIELKRITERIEN	26
1.6.6	ETHIK	26
1.6.7	STUDIEN TEILNEHMER	26
2	<u>MATERIAL</u>	28
2.1	ANTIKÖRPER	28
2.2	CHEMIKALIEN UND SONSTIGES	28
2.3	GERÄTE	29
2.4	VERBRAUCHSMATERIALIEN	29

3	METHODEN	30
3.1	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	30
3.2	FUNKTIONELLE EXPERIMENTE	32
3.2.1	ADHÄSIONSASSAY	32
3.2.2	MIGRATIONSASSAY	33
3.3	IMMUNHISTOCHEMIE	34
3.3.1	HERSTELLUNG DER GEWEBESCHNITTE	34
3.3.2	BEURTEILUNG DER MORPHOLOGIE	34
3.3.3	NACHWEIS VON OBERFLÄCHENMOLEKÜLEN	34
3.3.4	NACHWEIS VON MONOZYTEN	34
3.3.5	DOPPELFÄRBUNG	35
3.3.6	LICHTMIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG	35
3.4	STATISTIK	36
4	ERGEBNISSE	37
4.1	MORPHOLOGIE	37
4.1.1	ZELLPULATIONEN STELLEN SICH IN DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE KONSTANT DAR	37
4.1.2	LEUKOZYTEN VON HNSCC-PATIENTEN ZEIGEN EINE ANDERE EXPRESSION VON OBERFLÄCHENMOLEKÜLEN	41
4.1.2.1	Monozyten von HNSCC-Patienten exprimieren weniger CCR5 Chemokinrezeptoren	42
4.1.2.2	Monozyten von HNSCC-Patienten exprimieren weniger CD14 Rezeptoren	43
4.1.2.3	Granulozyten von HNSCC-Patienten exprimieren weniger CD14	44
4.1.2.4	Granulozyten von HNSCC-Patienten exprimieren weniger CD16	45
4.1.2.5	Granulozyten von Tumorpatienten exprimieren weniger CD16b	46
4.1.2.6	T-Lymphozyten von Tumorpatienten exprimieren weniger CD3	47
4.1.2.7	Monozyten von Tumorpatienten exprimieren weniger CD11b, auf Granulozyten bleibt CD11b unter dem Einfluss eines Karzinoms unverändert	48
4.1.2.8	Monozyten exprimieren unter Karzinomeinfluss weniger CD25	49
4.1.2.9	NK-Zellen von Tumorpatienten exprimieren weniger CD56	50
4.1.3	WEITERE OBERFLÄCHENMOLEKÜLE WAREN UNTER DEM EINFLUSS EINES KARZINOMS IN IHRER EXPRESSION UNVERÄNDERT	50
4.1.3.1	Die CXCR4 Expression auf den Lymphozyten verändert sich unter dem Einfluss eines Karzinoms nicht	51
4.1.3.2	Die CCR1 Expression auf den Monozyten verändert sich unter dem Einfluss eines HNSCC nicht	52
4.2	FUNKTION	54
4.2.1	MONOZYTEN VON HNSCC-PATIENTEN SIND IN DER MIGRATION DEUTLICH EINGESCHRÄNKT	54
4.3	STUDIE UND STUDIENERGEBNISSE	56
4.3.1	NACH CYCLOOXYGENASE 2-INHIBITION <i>IN VIVO</i> ZEIGEN LEUKOZYTEN VON HNSCC-PATIENTEN VERÄNDERUNGEN IN DER EXPRESSION VON REZEPTOREN	57
4.3.1.1	Normalisierung der Expression von Rezeptoren auf den Monozyten nach Cyclooxygenase 2 Inhibition	58
4.3.1.2	Verbesserung der Expression von Oberflächenmolekülen auf den Granulozyten durch Cyclooxygenase 2-Inhibition	62
4.3.1.3	Lymphozyten von HNSCC-Patienten zeigen in der Expression von Rezeptoren nur eine diskrete Reaktion auf Cyclooxygenase 2-Inhibition	64
4.3.2	POSTOPERATIVE REZEPTORDICHTE GLEICHT DENEN GESUNDER PROBANDEN	66
4.3.3	VERBESSERTE ADHÄSIONSFÄHIGKEIT DER MONOZYTEN VON HNSCC-PATIENTEN NACH HEMMUNG DER CYCLOOXYGENASE 2	69

4.3.4	NORMALISIERTE MIGRATION DER MONOZYTEN VON HNSCC-PATIENTEN NACH INHIBITION DER CYCLOOXYGENASE 2	71
4.3.5	CYCLOOXYGENASE 2-INHIBITION VERSTÄRKT DAS TUMORINFILTRAT	73
5	DISKUSSION	79
6	ZUSAMMENFASSUNG	85
7	ANHANG	86
7.1	LITERATURVERZEICHNIS	86
7.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	93
7.3	PUBLIKATIONEN	94
7.4	DANKSAGUNG	95
7.5	LEBENS LAUF	96

1 Einleitung

1.1 Klinische Grundlage

1.1.1 Epidemiologie von Karzinomen des Kopf- und Halsbereichs

Karzinome des Kopf- und Halsbereichs (*head and neck squamous cell carcinoma*: HNSCC) sind die achthäufigste Todesursache bei Krebserkrankungen weltweit. Im Jahr 2000 waren rund 320000 Todesfälle weltweit aufgrund von Karzinomen des Kopf- und Halsbereichs zu verzeichnen bei gleichzeitig rund 481100 Neuerkrankungen (Shibuya et al., 2002). In den industrialisierten Ländern ist die Inzidenz von HNSCC im Zeitraum von 1997 bis 2002 altersbereinigt zwar leicht gefallen, der Durchschnitt liegt jedoch mit 18,8 pro 100000 Männer und 7,2 pro 100000 Frauen noch relativ hoch (Jemal et al., 2006).

Die weltweite 5-Jahres-Überlebensrate liegt unter 50%, wobei mehr Frauen als Männer überleben (Parkin et al., 2005). Und diese ungünstige 5 Jahres-Überlebensrate hat sich seit 30 Jahren nicht verbessert (Edwards et al., 2005; Kastenbauer and Wollenberg, 1999).

Die Prognose für den Patienten ist stark abhängig vom Krankheitsstadium bei Diagnose. Liegt zu dem Zeitpunkt noch keine Metastasierung vor (Tx N0 M0), beträgt die 5 Jahres-Überlebensrate 82%. Bestehen bereits Lymphknotenmetastasen aber keine Fernmetastasen (Tx Nx M0) ist sie nur 51%. Lassen sich bei Diagnose bereits Fernmetastasen feststellen (Tx Nx Mx) ist die Überlebensrate trotz vollständiger Therapie nur durchschnittlich 28% nach 5 Jahren. Leider liegt bei Diagnosestellung in der Mehrzahl der Fälle, nämlich in 61%, bereits ein Lymphknotenbefall vor, so dass trotz aller Therapieanstrengungen eine ungünstige Prognose für die meisten HNSCC-Patienten besteht (Edwards et al., 2005).

Der letale Ausgang der Erkrankung ist in den meisten Fällen nicht direkt auf den Primärtumor zurückzuführen, da dieser oft vollständig entfernt werden kann. Die Patienten sterben vielmehr an den Auswirkungen der Metastasen, die sich aus disseminierten Tumorzellen entwickeln, die der Operation nicht zugänglich sind. Diese verbleibenden Tumorzellen werden als *minimal residual disease* bezeichnet (Wollenberg et al., 2004). Die Herausforderung für künftige, verbesserte Therapien ist es, auch disseminierte Tumorzellen zu eliminieren, um die Tumorerkrankung vollständig zu heilen und ein Rezidiv zu verhindern.

1.1.2 Plattenepithelkarzinome

Unter dem Begriff Karzinom des Kopf- und Halsbereichs werden maligne Tumore mehrerer Lokalisationen im oberen aerodigestiven Trakt zusammengefasst. Betroffen sein können die Mundhöhle, Oropharynx, Hypopharynx und Larynx. Ihnen gemeinsam ist der histologische Typ, denn es handelt sich in mehr als 90% der Fälle um Plattenepithelkarzinome, es sind also Tumore epithelialen Ursprungs (Massano et al., 2006).

Plattenepithel ist als Oberflächenepithel an vielen Stellen des menschlichen Körpers vorhanden. Man unterscheidet einschichtig von mehrschichtig und mehrreihigem Plattenepithel, es kommt verhornt oder unverhornt vor. Mehrschichtig verhorntes Plattenepithel bietet eine gute Barrierefunktion und bildet die oberste Hautschicht. Mehrschichtig unverhorntes Plattenepithel kleidet unter anderem die Mundhöhle, Pharynx, Larynx und den Ösophagus aus.

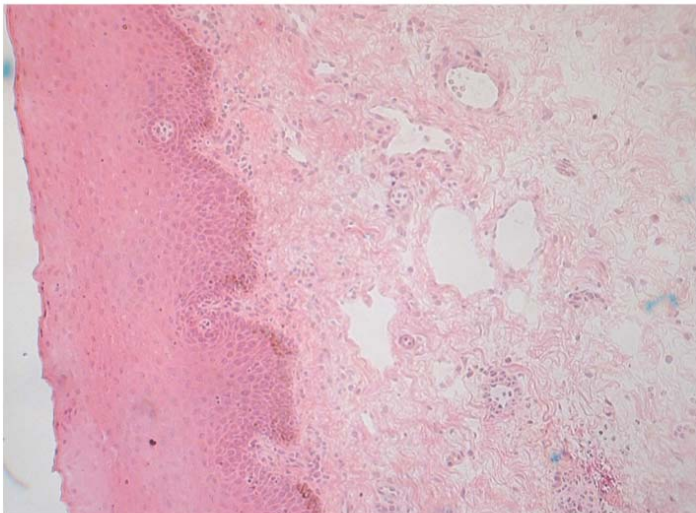


Abbildung 1.1.1: Mehrschichtig unverhorntes Plattenepithel, HE Färbung. Am linken Bildrand bilden die abgeflachten Epithelzellen die oberste Hautschicht. Sie gehen aus der Basalzellschicht hervor, die direkt an die Basalmembran grenzt. Diese ist als dunkel violett gefärbte Linie sichtbar. Insgesamt zeigt sich ein geordnetes Zellbild. Unter der Basalmembran liegt das lockere Unterhautfettgewebe (Subkutis), in dem Blutgefäße und Nerven verlaufen.

Im Gegensatz zum gesunden Plattenepithel zeigt der histologische Schnitt durch ein Plattenepithelkarzinom polymorphe Zellen mit großen Zellkernen und wenig Zytoplasma.

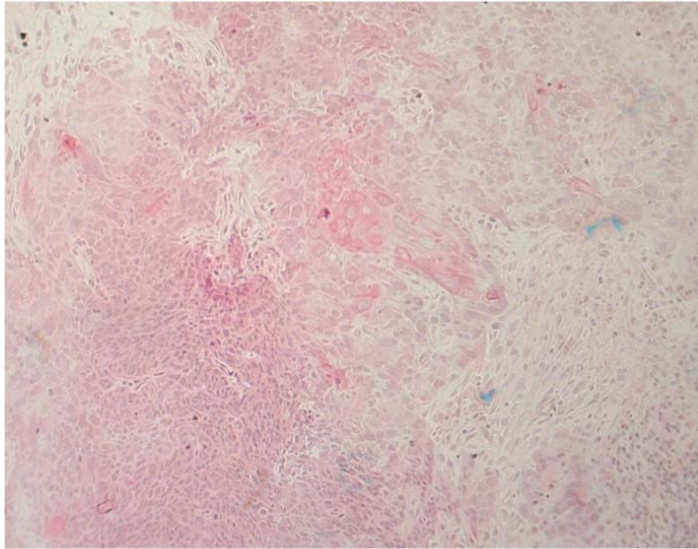


Abbildung 1.1.2: Ulzerierendes Plattenepithelkarzinom, HE Färbung. Die oberste Hautschicht ist in diesem histologischen Schnitt ebenfalls am linken Bildrand, allerdings kaum als solche zu erkennen. Man sieht polymorphe Zellen mit großen Zellkernen und wenig Zytoplasma. Im unruhigen Zellbild lässt sich eine Ordnung nicht erkennen. Auch die Basalmembran ist nicht darstellbar. Der Grund dafür ist, dass der Tumor die Basalmembran bereits durchbrochen hat, und damit ein invasives Karzinom vorliegt.

1.1.3 Klassifikation von HNSCC

Wie die meisten Tumoren werden auch HNSCC nach der in der Onkologie üblichen TNM-Klassifikation eingeteilt. Diese gibt Auskunft über die Schwere der Erkrankung.

- T steht für den Primärtumor, der nach Größe und Invasivität in umliegende Gewebe in die Stadien T1 (kleiner Tumor, keine Verwachsung mit der Umgebung) bis T4 (sehr großer Tumor, ausgedehnte Infiltration der Umgebung) eingeteilt wird.
- N steht für den Status der regionalen Lymphknoten, der in die Stadien N0 (kein Befall der Lymphknoten) bis N3 (ausgedehnte, verwachsene Lymphknotenmetastase) eingeteilt wird.
- M steht für Fernmetastasen in anderen Organen, die entweder nachgewiesen werden können (M1) oder nicht nachweisbar sind (M0).
- Die Einteilung nach dem *grading* kann nur histologisch vorgenommen werden, sie zeigt das Ausmaß der Differenzierung der Tumorzellen. Es reicht von G1 (gut differenziert) bis G3 (anaplastisch).
- Gelingt es, den Tumor operativ im Gesunden (*in sano*) zu entfernen, spricht man von einer R0 Resektion. Ist das nicht möglich, und es verbleiben makroskopisch sichtbare Tumorreste, handelt es sich um eine R1 Resektion.

Für HNSCC hat die Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie, folgende TNM Klassifikation festgelegt (Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, 1999).

T1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T4	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen, z. B. kortikalen Knochen, Skelettmuskel der Zunge, Kieferhöhle oder Haut

Tabelle 1: T-Klassifikation Mundhöhlen-Karzinome

T1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T4	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen, wie z.B. M. pterygoideus, Unterkiefer, harter Gaumen, Skelettmuskel der Zunge, Larynx

Tabelle 2: T-Klassifikation Oropharynx-Karzinome

T1	Tumor auf einen Unterbezirk des Hypopharynx begrenzt und 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor infiltriert mehr als einen Unterbezirk des Hypopharynx oder einen benachbarten Bezirk, oder misst mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung, ohne Fixation des Hemilarynx
T3	Tumor misst mehr als 4 cm in größter Ausdehnung, oder Tumor mit Fixation des Hemilarynx
T4	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen, z.B. Schild/Ringknorpel, A. carotis externa oder interna, Weichteile des Halses, prävertebrale Faszien oder Muskeln, Schilddrüse und/oder Ösophagus

Tabelle 3: T-Klassifikation Pharynxkarzinom

T1	Tumor auf Stimmbänder begrenzt (kann auch vordere oder hintere Kommissur befallen), mit normaler Beweglichkeit
T1a	Tumor auf ein Stimmband begrenzt
T1b	Tumorbefall beider Stimmbänder
T2	Tumor breitet sich auf Supraglottis und/oder Subglottis aus und/oder Tumor mit eingeschränkter Stimmbandbeweglichkeit
T3	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmbandfixation
T4	Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und/oder außerhalb des Larynx, z.B. Trachea, Weichteile des Halses, Schilddrüse oder Pharynx

Tabelle 4: T-Klassifikation glottischer Larynx-Karzinome

T1	Tumor auf die Subglottis begrenzt
T2	Tumor breitet sich auf ein Stimmband oder beide Stimmbänder aus, diese mit normaler oder eingeschränkter Beweglichkeit
T3	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmbandfixation
T4	Tumor infiltriert durch Ring- oder Schildknorpel und/oder außerhalb des Larynx, z. B. Trachea, Weichteile des Halses, Schilddrüse oder Ösophagus

Tabelle 5: T-Klassifikation subglottischer Larynx-Karzinome

N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung
N2a	Metastase in solitärem ipsilateralem Lymphknoten mehr als 3 cm aber nicht mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N3	Metastase(n) in Lymphknoten, mehr als 6cm in größter Ausdehnung

Tabelle 6: N-Klassifikation aller Kopf-Hals-Tumoren

1.1.4 Klinik

Ungünstigerweise werden viele HNSCC erst in einem fortgeschrittenen Stadium symptomatisch. Die Beschwerden können eine länger andauernde Heiserkeit, ein Fremdkörpergefühl, Dysphagie, Dyspnoe, Hämoptoe, oder bereits eine sichtbare Raumforderung sein. Zusätzlich können auch Allgemeinsymptome einer malignen Erkrankung wie Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust und Nachtschweiß auftreten. Manchmal sind dies auch die einzigen Beschwerden. Der Zeitpunkt des Auftretens der ersten Symptome hängt entscheidend von der Lokalisation des Tumors ab. Tumore auf den Stimmlippen verursachen oft bereits in einem frühen Stadium Heiserkeit, weshalb sie früher diagnostiziert werden und so vor allem durch den frühzeitigen Therapiebeginn eine relativ günstige Prognose haben. Bei anderen Lokalisationen gibt es keine frühen Warnsignale, so dass viele Diagnosen erst im Tumorstadium T3 und T4 erfolgen, was eine große Tumorzellmasse und eine schlechte Prognose bedeutet (Boenninghaus, 2004).

1.1.5 Therapie

Die Operation eines HNSCC ist in den meisten Fällen die Therapie der Wahl, man unterscheidet Stimm-erhaltende (als Beispiel Kehlkopfteilresektion) von nicht Stimm-erhaltenden (Laryngektomie) Operationen (Strutz, 2001). Gerade bei kleinen Tumoren sind

die therapeutischen und funktionellen Ergebnisse sehr gut. Doch auch wenn der Larynx nicht betroffen ist und Gewebe von Zunge, Pharynx oder der Mundhöhle entfernt wurde, können postoperativ Störungen von Sprechen, Schlucken und Atmen auftreten, da alle diese Funktionen ein Zusammenspiel dieser anatomischen Einheiten voraussetzen (Boeninghaus, 2004). Die Einschränkung der Lebensqualität ist unter Umständen bedeutend. Bei fortgeschrittenen Tumorstadien ist eine Entfernung aller Lymphknoten des betroffenen Lymphabflussgebietes in der Halsregion notwendig. In der Regel folgen auf die Operation eine Strahlentherapie und ggf. auch eine Chemotherapie.

1.1.5.1 Chirurgische Therapie

Zum operativen Vorgehen bei HNSCC hat die Deutsche Krebsgesellschaft Leitlinien für die unterschiedlichen Lokalisationen festgelegt (Deutsche-Krebsgesellschaft, 2002). Beispielhaft wird hier das empfohlene operative Vorgehen beim Hypopharynxkarzinom aufgezeigt.

	Hypopharynxkarzinom
Tis	Exzision
T1	Hypopharynxteilresektion (transoral oder transzervikal) eventuell mit plastischer Deckung. In besonderen Fällen kann eine Laryngektomie notwendig sein (z.B. Postcricoid-Region).
T2	Partielle Pharyngektomie transzervikal oder transoral unter Erhalt des Larynx eventuell mit Resektion des ipsilateralen Schilddrüsenlappens; ggf. plastische Rekonstruktion; ggf. Pharynx-Larynx Teilresektion oder Laryngektomie mit partieller Pharyngektomie und ggf. Rekonstruktion. Alternativ: transorale Resektion
T3	Laryngektomie mit Teilpharyngektomie eventuell mit Resektion des ipsilateralen Schilddrüsenlappens und ggf. Rekonstruktion. Transorale Resektion in besonderen Fällen möglich.
T4	Oft nicht unter Organ- bzw. Funktionserhalt operabel. Pharyngolaryngektomie mit Resektion des ipsilateralen Schilddrüsenlappens und Rekonstruktion mit Magenhochzug oder anderem Transplantat.

Tabelle 7: Leitlinie zum operativen Vorgehen beim Hypopharynxkarzinom

1.1.5.2 Strahlentherapie und Chemotherapie

Die Strahlentherapie wird entweder als alleinige Behandlungsmethode oder als zusätzliche Maßnahme vor oder nach der Operation eingesetzt. Nach präoperativer Strahlentherapie beispielsweise kann anschließend eine kurative Resektion möglich werden, die vorher nicht möglich war. Indikationen für eine postoperative Strahlentherapie sind eine unvollständige operative Tumorresektion (R1- und R2-Resektion) und eine Tumorgröße T4, denn das bedeutet eine Infiltration von Nachbarstrukturen. Ist der Tumor aufgrund seiner

lokoregionären Ausdehnung funktionell nicht mehr sinnvoll operabel, so ist eine intensiviertere Strahlentherapie oder eine simultane Radiochemotherapie zu empfehlen. Die simultane Radiochemotherapie erbringt höhere Raten an lokoregionärer Tumorfreiheit im Vergleich zur alleinigen Strahlentherapie. Substanzen, die sich simultan mit einer hochdosierten Strahlentherapie applizieren lassen, sind 5-Fluorouracil, auch in Kombination mit Cisplatin bzw. Carboplatin. Die simultane Anwendung führt zu einer erhöhten therapieassoziierten Akutmorbidität und verlangt daher besondere Anstrengung auf dem Gebiet der Supportivtherapie. Bei reduziertem oder schlechtem Allgemeinzustand des Patienten ist die konventionelle palliative Strahlenbehandlung vorzuziehen (Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, 1999; Deutsche-Krebsgesellschaft, 2002).

1.2 Risiko und Tumorentstehung

1.2.1 Risikofaktoren für ein HNSCC sind Nikotin und Alkohol

Die Hauptrisikofaktoren für HNSCC sind Nikotin- und Alkoholabusus. Raucher haben gegenüber Nichtrauchern ein 20-fach erhöhtes Risiko, an einem Larynxkarzinom zu erkranken. Wobei es einen Zusammenhang in der Menge an Nikotin und Alkohol und der Zunahme des Risikos gibt. Alkohol und Nikotin wirken unabhängig voneinander kanzerogen, gemeinsam scheinen sie sich allerdings in ihrer karzinogenen Potenz nicht nur zu addieren, sondern eher zu multiplizieren (Talamini et al., 2002). Da die Noxen auf die gesamte Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes einwirken, kann es zur Feldkanzerisierung kommen. Das bedeutet, dass es mit einer Inzidenz von bis zu 20% zu synchronen oder metachronen Mehrfachmalignomen kommt, weswegen man HNSCC-Patienten eine engmaschige Tumornachsorge empfiehlt.

1.2.2 Karzinogenese

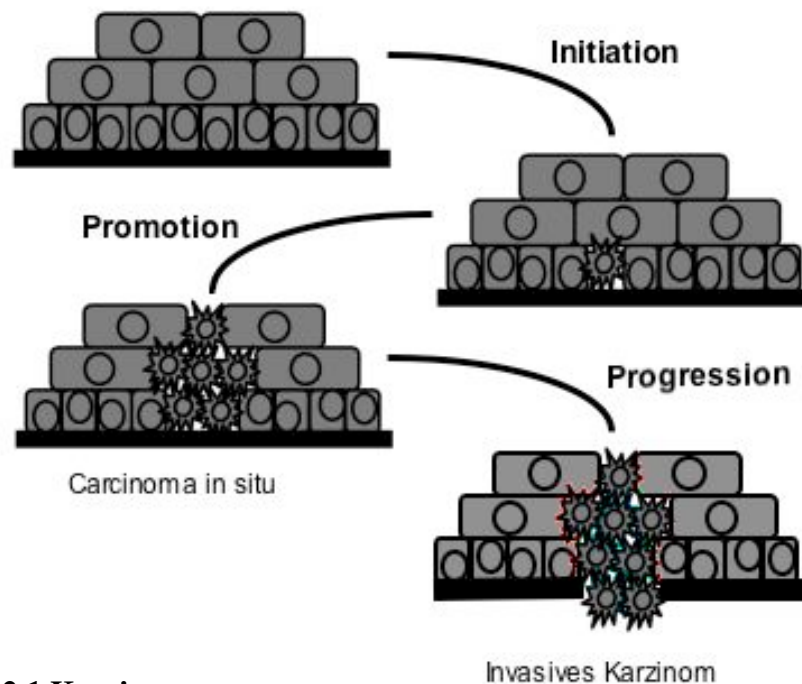


Abbildung 1.2.1 Karzinogenese

Die Entstehung von Tumoren ist ein komplexer Prozess, der in drei Phasen unterteilt wird: Initiation, Promotion und Progression. In der Initiierungsphase treten Mutationen und Transformationen auf, die genetisch bedingt sein können, wie eine Mutation im BRCA1-Gen bei familiärem Mammakarzinom, oder durch exogene Noxen hervorgerufen werden. Das können ultraviolette und radioaktive Strahlung sein, Umwelt- und Arbeitsplatzkanzerogene

und auch Nikotin und Alkohol. Die Gewebeveränderungen während der Karzinogenese sind zunächst reversibel. Im Fall von exogenen Noxen kommt es zu einer Epithelschädigung mit konsekutiver Epithelreaktion im Sinne einer Regeneration. Bei fortdauernder Einwirkung der Noxen und ständigem Regenerationsbedarf reagiert das Epithel mit Hyperplasie und Hyperkeratose, wodurch die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Epitheldysplasien steigt. Wenn die Dysplasien fortschreiten, kommt es zunächst zum *Carcinoma in situ*, das die Basalmembran noch nicht überschreitet. Ab diesem Zeitpunkt ist eine Rückbildung der Veränderung nicht mehr möglich. Schließlich erfolgt der Durchbruch durch die Basalmembran; man spricht nun von einem invasiven Karzinom. Ab diesem Zeitpunkt können bereits Metastasen entstehen.

1.2.3 Theorie der Immunüberwachung

Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts vermutete Paul Ehrlich, dass es im Menschen ständig einige anormale Zellen gibt, die jedoch durch das Immunsystem kontrolliert werden. Diese These wurde später von Burnet und Thomas zur Theorie der Immunüberwachung (*immune surveillance*) ausgearbeitet, die besagt, dass das Immunsystem ständig den Körper nach entarteten Zellen absucht und diese sofort zerstört. Diese Immunantwort setze so früh ein, dass der Großteil an Tumorzellen klinisch überhaupt nicht apparent würde (Burnet, 1971). Diese Theorie stützen folgende Beobachtungen:

- Viele Tumoren sind von einem ausgeprägten Lymphozyteninfiltrat umgeben.
- Es kommt bei manchen Tumorentitäten immer wieder zu Spontanremissionen.
- Tumore treten gehäuft im Alter auf, wenn das Immunsystem ineffizienter wird und sich Mutationen anhäufen.
- Immunsupprimierte Personen haben ein deutlich höheres Risiko, Tumore zu entwickeln.

Dennoch kommt es zur Bildung von Tumoren, deren transformierte Ursprungszelle nicht durch das Immunsystem eliminiert wurde. Um die Zellen der oben angesprochenen *minimal residual disease* zu erreichen und zu eliminieren, bevor Metastasen entstehen, zielen viele Anstrengungen darauf, bei Tumorpatienten das Immunsystem zu stärken, damit es entartete Zellen detektiert und eliminiert.

1.3 Immunsystem

Ohne das Immunsystem ist der Mensch nicht lebensfähig. Es ist notwendig, um Krankheitserreger, mit denen Menschen in der natürlichen Umwelt ständig in Kontakt treten, zu erkennen und zu vernichten - im günstigen Fall bevor eine manifeste Erkrankung entsteht. Es besteht aus verschiedenen Komponenten u. a. Leukozyten, Antikörpern, Zytokinen, die ein komplexes System bilden. Das Immunsystem kann man grob in zwei Teile teilen, die angeborene unspezifische Immunität und die erworbene (adaptive) spezifische Immunität, die an vielen Stellen ineinander greifen. Der wesentliche Unterschied besteht darin, dass die angeborene Immunität schnell, aber relativ unspezifisch reagiert, während die adaptive Immunität induziert werden muss, dafür aber hochspezifisch und lernfähig ist. Das Immunsystem kann körpereigen von fremd unterscheiden und so Pathogene wirksam und gezielt vernichten. Das können Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten sein, aber auch körpereigene Zellen, die ihre natürliche Funktion verloren haben. Das sind zum Einen abgestorbene, apoptotische Zellen, zum Anderen aber auch abnorme Zellen, die, werden sie nicht durch das Immunsystem vernichtet, der Beginn einer Tumorerkrankung sein können (Janeway, 2004).

Für gewöhnlich jedoch spricht das Immunsystem nicht auf spontan entstandene Tumorzellen an, da diese auf der Zelloberfläche keine Information haben, die sie als körperfremd kennzeichnen. Sind jedoch Antigene vorhanden, die die Tumorzelle als solche entlarven, können Tumore Ziel eines Immunangriffs werden. Tumore sind allerdings häufig genetisch instabil und können Zellvarianten bilden, die dem Angriff dadurch entgehen, dass sie die immunogenen Antigene nach Mutationen verlieren. Auf einigen Tumoren, wie Kolonkarzinom und Zervixkarzinom wird MHC-I (*major histocompatibility complex*) nur gering oder nicht mehr exprimiert (Facoetti et al., 2001). Und Tumore, die kein MHC-I exprimieren, können von zytotoxischen T-Zellen nicht erkannt werden, allerdings können diese Tumorzellen dann von natürlichen Killerzellen angegriffen werden.

Eine andere Möglichkeit des Tumors, der Immunüberwachung zu entgehen, ist die Produktion von immunsuppressiven Zytokinen, wie IL-10, TGF β (*transforming growth factor*) und Prostaglandin E₂, die die zellvermittelte Immunität unterdrücken, die zur Kontrolle des Tumorwachstums notwendig ist (siehe Kapitel 1.4).

1.3.1 Angeborene unspezifische Immunität

Die angeborene Immunität umfasst als Zellen die Monozyten/Makrophagen, Neutrophile Zellen, Natürliche Killerzellen und dendritische Zellen. Diese Zellen erkennen Krankheitserreger oder abnorme Zellen, wobei eine entscheidende Rolle der Toll-like-Rezeptor und die Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) spielen. Die angeborene unspezifische Immunität ist so leistungsfähig, dass sie bereits 90% der Infektionen abwehren kann. Die als fremd identifizierten Zellen bzw. Krankheitserreger werden entweder durch Phagozytose direkt vernichtet oder mit Hilfe des Komplementsystems unschädlich gemacht. Das Komplementsystem ist eine aus mehr als 20 Proteinen bestehende biochemische Kaskade, die letztlich die Zelloberfläche angreift und so den Zelltod herbeiführt. Die antigenpräsentierenden Zellen Makrophagen und dendritische Zellen haben zusätzlich die Möglichkeit, durch Präsentation von Teilen des phagozytierten Materials (Antigene) auf ihrer Oberfläche die adaptive Immunität zu aktivieren und so in die Abwehrreaktion mit einzubeziehen.

1.3.2 Spezifische erworbene Immunität

T-Lymphozyten erkennen ihr spezifisches Antigen, wenn es durch antigenpräsentierende Zellen (APC) dargeboten wird. Daraufhin wird gegen dieses Antigen eine zellvermittelte Zytotoxizität ähnlich der bei neutrophilen Granulozyten ausgelöst.

B-Lymphozyten benötigen keine Präsentation, sie können direkt durch Antigen aktiviert werden. Sie reifen zur Plasmazelle und bilden und sezernieren Antikörper gegen das erkannte Antigen. Hier handelt es sich um die humorale Immunantwort.

Anschließend bilden sich aus den aktivierten B- und T- Zellen Gedächtniszellen, die eine Zweitinfektion deutlich schneller beantworten. Oft ist das dann so schnell, dass erst gar keine Erkrankung entsteht. Diesem Prinzip folgen Impfungen, bei denen ein abgeschwächter, apathogener Erreger für die Ausbildung einer spezifischen Immunantwort sorgt.

1.3.3 Zellen des Immunsystems

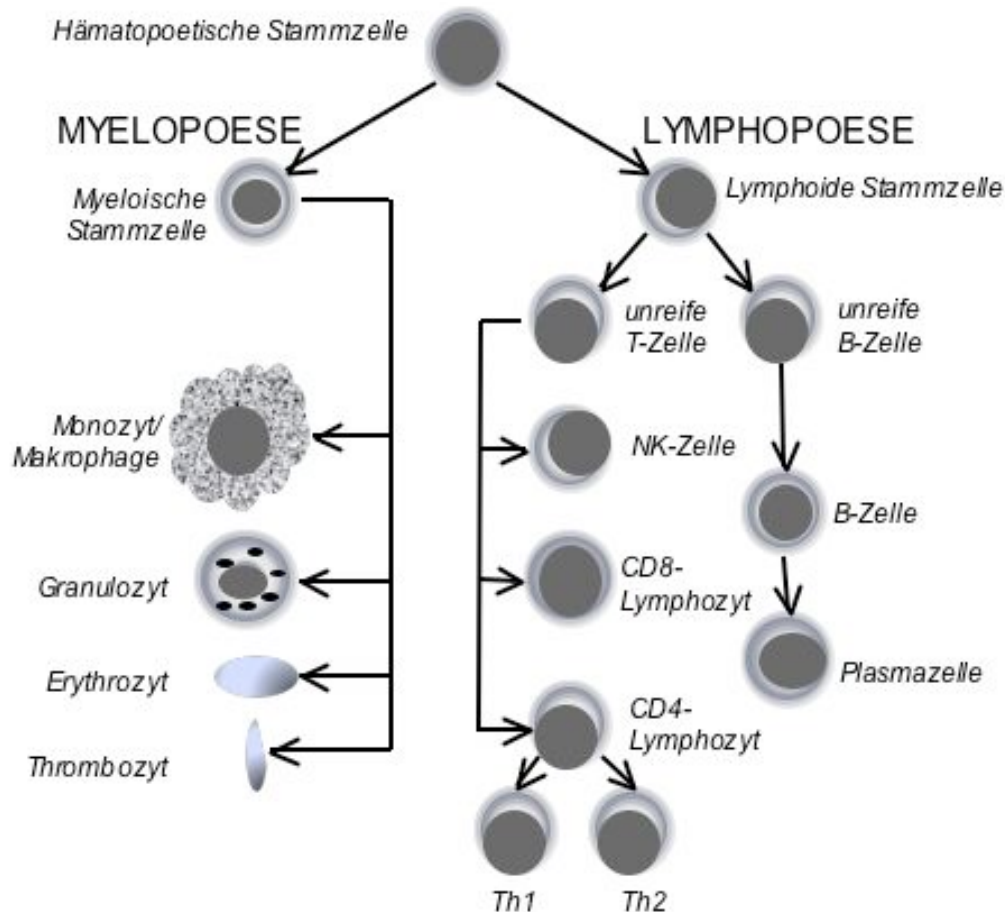


Abbildung 1.3.1 Die Zellen des Immunsystems stammen von den hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark ab.

1.3.3.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten machen normalerweise ungefähr 50% der im Blut zirkulierenden Leukozyten aus. Aktiviert durch Zytokine wandern sie an Ort der Infektion, wo sie durch Phagozytose Pathogene eliminieren. Gemeinsam mit Monozyten/Makrophagen sind sie nicht nur für die Bekämpfung von Mikroorganismen zuständig, sondern auch für die Elimination von Tumorzellen. Auf ihrer Oberfläche tragen sie u. a. das CD14 Molekül, mit dem sie apoptotische Zellen binden, und den Fc γ III Rezeptor CD16b, der nur auf neutrophilen Granulozyten vorkommt und an Zellen gebundene Antikörper erkennt. Über die Sekretion von Zytokinen (IL-1, IL-6, TNF α) können sie weitere Immuneffektorzellen aktivieren.

1.3.3.2 Monozyten/Makrophagen

In der Blutbahn zirkulieren Monozyten, die auf einen chemotaktischen Reiz in das Gewebe einwandern und zu Makrophagen ausreifen. Sie sind zur Phagozytose von Mikroorganismen und abnormen Körperzellen wie Tumorzellen fähig. Durch die Möglichkeit zur Antigenpräsentation haben sie eine Steuerungsfunktion für spezifische Immunreaktionen. Die von Monozyten sezernierten Zytokine (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IFN α , TNF α) tragen zur Differenzierung und Aktivierung weiterer Zelltypen bei. Auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen befinden sich viele spezifische Rezeptoren, wie MHC-II (*major histocompatibility complex*), der Haupthistokompatibilitätskomplex auf antigenpräsentierenden Zellen, das Adhäsionsmolekül Mac-1, das durch Bindung an ICAM-1 auf aktivierten Endothelzellen ein Anheften des Monozyten am Endothel ermöglicht, und der Chemokinrezeptor CCR5, der eine zielgerichtete Migration ermöglicht. Außerdem gibt es auf Monozyten den CD14 Rezeptor, mit dem apoptotische Zellen und auch Lipopolysaccharid aus der Bakterienwand gebunden werden können und der eine Rolle bei der Sepsis spielt, sowie CD16, der Fc γ III Rezeptor, der auf Zelloberflächen gebundenen Antikörper erkennt und Phagozytose auslöst.

1.3.3.2.1 Adhäsion und Migration

Um das Gefäßsystem verlassen zu können und ins Zielgewebe zu gelangen, müssen Monozyten zunächst an der Gefäßwand adhären. Dieser Prozess wird u. a. durch die β 2-Integrine vermittelt, die drei Heterodimere umfassen. Das sind Mac-1, das aus den Ketten CD11b und CD18 besteht und auf Monozyten und Granulozyten exprimiert wird, LFA-1, das aus CD11a und CD18 besteht und hauptsächlich auf lymphoiden Zellen vorkommt, und CR4 (CD11c und CD18, auf Monozyten und Granulozyten). Mac-1 bindet an ICAM-1 auf aktivierten Endothelzellen und bewirkt die Adhäsion des Monozyten am Endothel. Die weitere zielgerichtete Migration wird durch Chemokine induziert, die lokal bei Immunreaktionen gebildet werden, und durch Bindung an einen Chemokinrezeptor auf der Immunzelle eine chemotaktische Wirkung ausüben. Auf Monozyten ist das vor allem der Chemokinrezeptor CCR5, der RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β bindet (Janeway, 2004). Nur eine ausreichende Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren macht eine gerichtete Tumorzellelimination möglich.

1.3.3.3 Natürliche Killerzelle (NK-Zelle)

NK-Zellen gehören zu den Lymphozyten. Eine Aktivierung ist nicht notwendig, jedoch wird

ihre Aktivität durch Zytokine (IL-12, Interferone), die von Makrophagen sezerniert werden, gesteigert. Die NK-Zelle erkennt das MHC-I Molekül, wodurch eine körperfremde Zelle sofort als solche enttarnt und angegriffen wird. Aber auch körpereigene Zellen, die aufgrund einer Virusinfektion oder einer malignen Entartung MHC-I in geringerer Menge exprimieren, werden erkannt und diese Zellen durch Freisetzung zytotoxischer Granula und der Induktion von Apoptose vernichtet. Das Adhäsionsmolekül CD56 bewirkt die Adhäsion am Endothel, es folgt die Migration ins Zielgewebe. Durch CD16, den Fc γ III Rezeptor, ist die NK Zelle auch zur antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) fähig.

1.3.3.4 T-Lymphozyten: T-Helferzelle

T-Helferzellen tragen das CD4 Molekül und, wie alle T-Zellen, den T-Zellrezeptor (TCR) auf der Zelloberfläche, mit dem jeweils ein spezifisches Antigen erkannt werden kann. Dieses Antigen muss dazu auf antigenpräsentierenden Zellen gemeinsam mit MHC-II Molekülen dargeboten werden. Nach Aktivierung der T-Helferzelle setzt diese Lymphokine frei. Die Differenzierung in eine Th1 Zelle bewirkt über die Sekretion von Interferon- γ eine Verstärkung der zellulären Immunantwort durch eine Aktivierung von Makrophagen. Eine Th2 Zelle führt durch Sekretion von Interleukin-4 und IL-5 zur Verstärkung der Produktion von Antikörpern (humorale Antwort) durch B-Zellen. Beide Wege können sich gegenseitig unterdrücken. Zur Bekämpfung von Tumoren ist vor allem die zelluläre Immunantwort Th1 von Bedeutung (Desmedt et al., 1998).

1.3.3.5 T- Lymphozyten: Zytotoxische T-Zelle

Zytotoxische T-Zellen sind CD8-positiv. Sie tragen ebenfalls den T-Zellrezeptor, mit dem jeweils ein spezifisches Antigen erkannt werden kann. Zytotoxische T- Zellen brauchen dazu die Antigenpräsentation zusammen mit MHC-II Molekülen, d.h. körpereigene Zellen, die z.B. mit Viren infiziert sind. Daraufhin wird die Apoptose dieser Zelle induziert.

1.3.3.6 B-Lymphozyten

Der B-Lymphozyt trägt auf der Oberfläche Immunglobuline. Er entwickelt sich nach Kontakt mit dem passenden Antigen (auch freie Antigene) und unter dem Einfluss von Lymphokinen von aktivierten T-Helferzellen zur Plasmazelle, die Antikörper produziert, oder zur Gedächtniszelle. Die Gedächtniszelle gibt die gespeicherte Information bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen an die B-Zellreihe weiter, was schneller als beim Erstkontakt zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen führt.

1.3.4 Zytokine und Chemokine

Die Kommunikation der Zellen untereinander gelingt zum einen über direkten Kontakt, zum anderen über sezernierte Mediatoren, die sogenannten Zytokine, die in den komplexen Prozess der Immunantwort involviert sind. Ein prominentes Beispiel ist IL-2 (Interleukin-2), das von T-Zellen sezerniert wird, auto- und parakrin die Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen fördert und die Produktion von Immunglobulinen durch B-Zellen anregt. Dass IL-2 eine zentrale Rolle in der Auslösung einer adaptiven Immunreaktion einnimmt, wird an Medikamenten deutlich, die die IL-2-Produktion hemmen bzw. die Signalgebung durch IL-2 unterbinden. Medikamente wie Tacrolimus und Cyclosporin A sind Immunsuppressiva, die zur Unterdrückung unerwünschter Immunreaktionen wirksam bei Transplantationen eingesetzt werden.

Chemokine sind chemotaktische Zytokine, von denen mehr als 50 verschiedene bekannt sind. Chemokine binden an spezielle G-Protein gekoppelte Chemokinrezeptoren, diese können in den meisten Fällen mit mehreren Chemokinen interagieren (Luster, 1998). Physiologische Funktion ist sowohl die Steuerung der Leukozytenreifung im Knochenmark als auch deren Zirkulation im Körper und ihre Niederlassung in bestimmten Organen (Baggiolini and Loetscher, 2000). Bei Entzündungsreaktionen werden Chemokine lokal sezerniert und steuern so die Migration und Bewegung von Leukozyten zum Zielgewebe.

1.4 Mechanismen, durch die Tumore der Immunabwehr entgehen

Damit Tumorzellen einer Identifizierung und Elimination durch das Immunsystem entgehen, kommen folgende Mechanismen in Frage:

- geringe Immunogenität
- Veränderung von Antigenen und eine
- tumorinduzierte Immunsuppression.

1.4.1 Cyclooxygenasen katalysieren die Prostaglandin E₂ Bildung

Die Cyclooxygenase liegt in drei Isoformen vor: Cyclooxygenase (COX) 1, 2 und 3.

Cyclooxygenase 1 kommt in vielen Zellarten vor und ist ständig aktiv, im Gegensatz dazu findet man Cyclooxygenase 2 in aktivierten inflammatorischen Zellen und vermehrt in

malignen Zellen (Dubois et al., 1998). Die Cyclooxygenase 3 ist eine Acetaminophen-sensitive Form der Cyclooxygenase 1, die hauptsächlich im Gehirn exprimiert wird

(Chandrasekharan et al., 2002). Cyclooxygenase 2 wirkt vermutlich neoangiogenetisch und

beeinflusst so ein Tumorwachstum positiv. Alle Cyclooxygenasen werden durch nicht-

steroidale Antiphlogistika (NSAR) in ihrer Aktivität gehemmt, selektive Cyclooxygenase 2-

Inhibitoren hemmen gezielt die Cyclooxygenase 2.

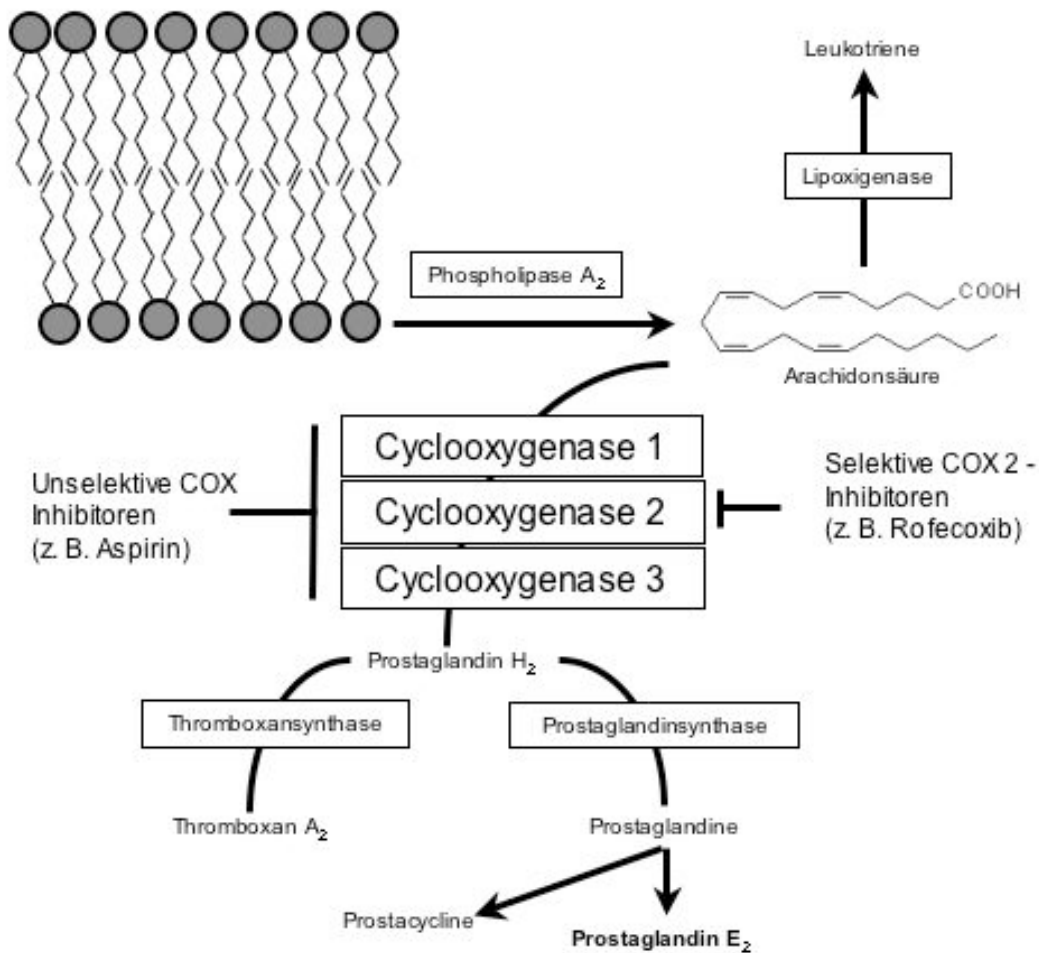


Abbildung 1.4.1 Die Cyclooxygenase nimmt eine Schlüsselrolle im Arachidonsäurestoffwechsel ein, als dessen Produkt unter anderen das Prostaglandin E₂, ein so genanntes Eicosanoid, entsteht. Zunächst löst das Enzym Phospholipase A₂ aus Phospholipidmembranen Arachidonsäure heraus, aus der dann entweder durch Katalysierung der Lipoxigenase Leukotriene entstehen, oder mittels der Cyclooxygenase Prostaglandine, Prostacycline und Thromboxan.

Studien zeigen, dass Patienten, die aus verschiedenen Gründen ein NSAR über längere Zeit einnehmen, ein niedrigeres Risiko haben, an Kolon- oder Ösophaguskarzinomen zu erkranken (Bosetti et al., 2002; Giovannucci et al., 1994). Jedoch kann die langfristige Einnahme von NSAR auch unerwünschte Wirkungen haben wie gastrointestinale Blutungen und Nierenfunktionseinschränkungen. Da in Tumorzellen hauptsächlich die induzierbare Form Cyclooxygenase 2 exprimiert ist, bietet sich zur Erzielung eines Effekts auf Karzinomzellen der Einsatz selektiver Cyclooxygenase 2-Inhibitoren wie Rofecoxib und Celecoxib an, da so die Produktion von Prostaglandin E₂ verhindert werden kann.

1.4.2 Tumore können durch Cyclooxygenase 2 Überexpression

Immunsuppression induzieren

Viele Tumore schützen sich vor einem Angriff des Immunsystems, indem sie selbst eine immunsuppressive Wirkung entwickeln; das geschieht häufig dadurch, dass sie Cyclooxygenase 2 überexprimieren (Ulrich et al., 2006), was auch für HNSCC nachgewiesen werden konnte (Young et al., 1996). Folglich entsteht im Tumor eine hohe Konzentration von Prostaglandin E₂, das auf verschiedene Immunzellen einen hemmenden Einfluss hat.

Prostaglandin E₂ induziert die Synthese des negativ-regulatorischen Zytokins IL-10 und supprimiert so die T und B Zellproliferation, die Lymphokinproduktion und die Zytotoxizität von Natürlichen Killerzellen, zytotoxischen Zellen und Makrophagen (Huang et al., 1996).

Die Wirkung von Prostaglandin E₂ wird wahrscheinlich über eine Erhöhung des *second messengers* cAMP vermittelt. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass sich die bei HNSCC Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden präoperativ erhöhte Prostaglandin E₂ Serumkonzentration postoperativ normalisierte, bei Auftreten von Rezidiven jedoch wieder anstieg (Klapan et al., 1992).

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Aufbauend auf Erkenntnissen der Arbeitsgruppe aus *in vitro* Versuchen, die gezeigt hatten, dass die Beeinträchtigung der Monozytenfunktion bei Tumorpatienten durch die pharmakologische Inhibition der Cyclooxygenase 2 reversibel ist, wollten wir testen, ob dieser Effekt auch *in vivo* stattfindet. Diese Frage sollte im Rahmen einer klinischen Studie an Tumorpatienten untersucht werden.

Dazu mussten zunächst geeignete molekulare Marker auf der Oberfläche der Leukozyten gefunden werden, die sich bei Tumorpatienten und Gesunden unterscheiden. Die tumorimmunologische Bedeutung dieser Unterschiede sollte in funktionellen Tests überprüft werden.

In der klinischen Studie sollte bei HNSCC-Patienten durch pharmakologische Cyclooxygenase 2-Inhibition eine Auswirkung auf die Leukozyten anhand der identifizierten molekularen Marker gemessen werden, wobei als „Erfolg“ eine Verschiebung in Richtung eines Phänotyps von Gesunden gewertet werden sollte. Außerdem sollte die Funktion der Leukozyten in verschiedenen Versuchen getestet werden. Um schließlich festzustellen, ob eine Cyclooxygenase 2-Inhibition auch Veränderung im Tumorgewebe bewirkt, sollten mit Hilfe der Immunhistochemie Gewebeschnitte untersucht werden.

Es ergaben sich folgende Fragen:

1. Welche Oberflächenmoleküle sind bei Leukozyten von HNSCC-Patienten vermindert oder verstärkt exprimiert im Gegensatz zu Leukozyten von gesunden Probanden?
2. Ist diese Expression bei HNSCC-Patienten durch medikamentöse Inhibition der Cyclooxygenase 2 *in vivo* beeinflussbar?
3. Ergibt sich dadurch eine Verbesserung der Funktion der Leukozyten?
4. Erreichen daraufhin tatsächlich mehr Immunzellen das Tumorgewebe?

1.6 Studiendesign

1.6.1 Studienziel

Ziel der durchgeführten Studie war die phänotypische und funktionelle Charakterisierung von Immunzellen, insbesondere von Monozyten, isoliert aus Patienten mit HNSCC unter der Hypothese, dass eine adjuvante Cyclooxygenasehemmung den supprimierten Immunstatus dieser Patienten wieder aufhebt und zu einer verbesserten Funktion der Immunzellen führt. Die Kontrollgruppe bildeten Patienten mit HNSCC, die keine Studienmedikation erhielten.

1.6.2 Studienart

Es handelte sich um eine prospektiv randomisierte Studie. Das Studienkollektiv bestand aus Patienten, bei denen aktuell ein Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereichs diagnostiziert worden war und die noch keine Therapie erhalten hatten. Das Untersuchungsmaterial umfasste peripheres Venenblut und Biopsien des Karzinoms.

1.6.3 Studienprotokoll

Die Rekrutierung der Studienteilnehmer erfolgte willkürlich in der Hals-, Nasen-, und Ohrenklinik unter Beachtung der Einschluss- und Ausschlusskriterien.

Die **Einschlusskriterien** waren:

- ein operativ resezierbares, unbehandeltes Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereichs
- Alter zwischen 18 und 70 Jahren
- Allgemeinzustand: Karnofsky-Index >60%
- Ausreichende hämatopoetische, renale, und hepatische Funktion
- Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung
- Verfügbarkeit der Patienten für den Zeitraum der Studie.

Ausschlusskriterien waren:

- akute oder chronische Infektionen
- Anfallsleiden oder andere zentral-nervöse Erkrankung
- Diabetes mellitus
- Anamnese für gastrointestinale Ulzera
- Zeichen einer signifikanten hämatologischen, respiratorischen, kardiovaskulären,

hepatischen oder renalen Erkrankung

- Zustände, die die Immunantwort beeinträchtigen
- Schwangerschaft
- Aktuelle oder chronische Einnahme von nicht-steroidalen Antiphlogistika
- Inoperabilität des Karzinoms.

Bei allen Patienten mit der Verdachtsdiagnose eines Plattenepithelkarzinoms im Kopf- und Halsbereich erfolgt zur Diagnosesicherung und Operationsplanung eine Panendoskopie mit Entnahme von Biopsien aus dem suspekten Bereich. Während dieses routinemäßig durchgeführten, diagnostischen Eingriffes wurde neben der zur histologischen Diagnosesicherung notwendigen Probebiopsie eine zusätzliche Tumorprobe asserviert und von uns immunhistochemisch untersucht.

Aus am gleichen Tag entnommenem Venenblut desselben Patienten wurden Immunzellen isoliert, und auf die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle sowie ihr Adhäsions- und Migrationspotential untersucht. Eine im Vergleich zu Gesunden verminderte Expression von Oberflächenmolekülen oder eine Einschränkung der Migration und Adhäsion wurde von uns als Ausdruck einer manifesten Immunsuppression gewertet.

Bis zur Operation des Karzinoms vergehen ungefähr drei Wochen, in denen Untersuchungen durchgeführt werden, die für die Stadieneinteilung und die Operationsplanung benötigt werden. Diese Zeit nutzten wir für unsere Studie. Mit dem Ziel, eine Immunkompetenz durch Cyclooxygenasehemmung zu erreichen, erhielt eine Gruppe der Studienteilnehmer in diesen drei Wochen präoperativ 1 x täglich den spezifischen Cyclooxygenaseinhibitor Rofecoxib (Handelsname Vioxx®) 25 mg per os, während die andere Gruppe unbehandelt blieb. Die Gruppe wurde per Zufall ermittelt. Anschließend wurden alle Studienteilnehmer ihrem regulär geplanten Eingriff zugeführt. Die nach den Regeln der ärztlichen Kunst notwendige und sinnvolle Therapie blieb durch die Studie völlig unbeeinflusst und wurde keinem Patienten vorenthalten.

Unmittelbar vor der Operation wurde erneut peripheres Venenblut entnommen, und die Immunzellen einer phänotypischen und funktionellen Analyse unterzogen.

Am Tag der Operation wurde aus dem exzidierten Tumor eine Probe entnommen, ohne die für eine histopathologische Beurteilung der Vollständigkeit der Resektion wichtigen Resektionsgrenzen zu tangieren. Diese Probe wurde ebenfalls immunhistochemisch untersucht, und mit den im Rahmen der panendoskopischen Untersuchung ermittelten Ergebnissen verglichen.

Eine dritte Blutentnahme erfolgte nach weiteren vier bis sechs Wochen, in denen die Studienteilnehmer nun keine Studienmedikation mehr eingenommen hatten. Die genannten Parameter wurden nun ein drittes Mal bestimmt und verglichen.

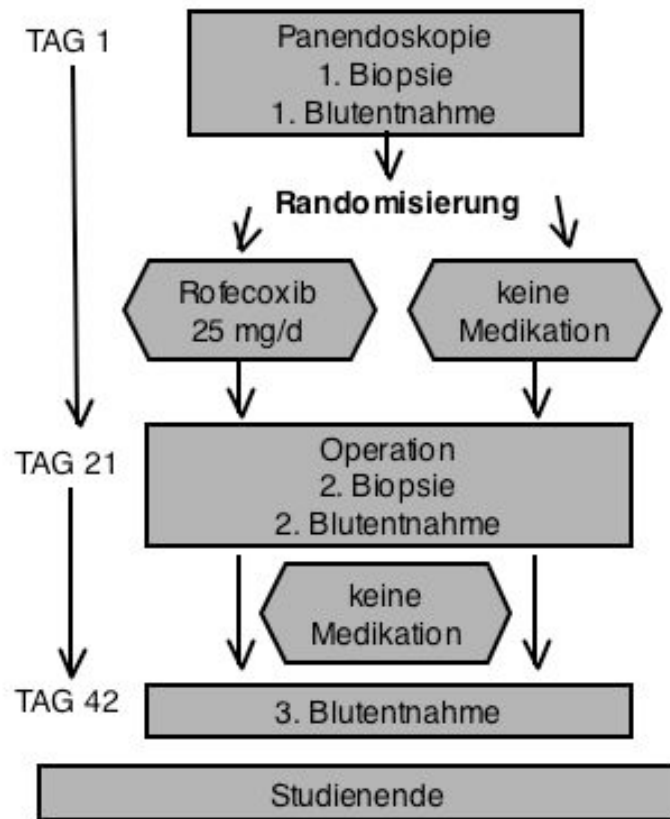


Abbildung 1.6.1 In der Studie wurde zu zwei Zeitpunkten eine Biopsie des Tumors untersucht, eine venöse Blutentnahme erfolgte zu drei Zeitpunkten. Rofecoxib wurde nach der Operation nicht mehr eingenommen.

1.6.4 Studienmedikation

Als Studienmedikament setzten wir Rofecoxib ein, ein spezifischer Cyclooxygenase 2-Inhibitor, mit Handelsname Vioxx© (MSD SHARP & DOHME). Rofecoxib hemmt hochspezifisch die Aktivität der Cyclooxygenase 2. Am 25. Mai 1999 hat das Medikament die Zulassung der amerikanischen Food and Drug Administration erhalten, im November 1999 wurde es auch in Deutschland zugelassen, inzwischen ist es aufgrund von unter der Medikation gehäuften Todesfällen mit kardiovaskulärer Ursache wieder vom Markt genommen worden. Zum Zeitpunkt der Studie handelte es sich um ein zugelassenes Medikament, während der Studie sind bei den Studienteilnehmern keine Nebenwirkungen

aufgetreten.

Das einmal täglich einzunehmende Arzneimittel konnte für die Behandlung von Schmerzen und Symptomen der Osteoarthritis, der akuten Schmerzbehandlung bei Erwachsenen und bei Menstruationsbeschwerden (essentielle Dysmenorrhö) verordnet werden. MSD SHARP & DOHME konnten belegen, dass unter täglicher Rofecoxib-Gabe die bei NSAR bekannten Nebenwirkungen, wie Erosionen und Ulzera im oberen Gastrointestinaltrakt, im Placebobereich lagen. Aufgrund der fehlenden Inhibition der Cyclooxygenase 1 mit signifikant reduziertem Risiko gastrointestinaler Nebenwirkung war eine Ulkusprophylaxe mit H₂ Rezeptorantagonisten nicht erforderlich. Als Nebenwirkungen konnten Durchfall und Kopfschmerzen auftreten - unsere Studienteilnehmer haben davon aber nicht berichtet. Die tägliche Dosis betrug 1 x 25 mg.

1.6.5 Zielkriterien

Als Bewertungskriterium im Sinne einer erfolgreichen Wiederherstellung der Immunfunktion in der Patientengruppe, die mit Rofecoxib therapiert wurde, galt im Vergleich zum unbehandelten Kontrollkollektiv laborchemisch die zum Zeitpunkt der Operation erfolgreiche Wiederherstellung einer präoperativ supprimierten Leukozytenfunktion.

Ein weiteres Zielkriterium ist eine postoperative Normalisierung einer präoperativ eingeschränkten Immunfunktion beim unbehandelten Kontrollkollektiv, da nach Resektion des Karzinoms der Tumor als Quelle einer immuninhibierenden Prostaglandin E₂ Produktion wegfällt.

1.6.6 Ethik

Da im Rahmen der Studie ein etabliertes Medikament in einer gängigen Dosierung, allerdings unter anderer Indikationsstellung, eingesetzt wurde, war die Gefährdung der Patienten als gering einzustufen. Die für die Erkrankung nötige und sinnvolle Therapie wurde durch die Studie in keiner Weise behindert. In der Risiko-Nutzen-Abwägung ließ sich ein Vorteil für den klinischen Verlauf des Patienten vermuten.

Das zustimmende Votum der Ethikkommission lag vor.

1.6.7 Studienteilnehmer

Vor Beginn der Studie untersuchten wir Monozyten gesunder Probanden und Monozyten von an einem Karzinom erkrankten Patienten aus der Hals-Nasen-Ohren Klinik. Die Daten dieser Patienten sind im Folgenden aufgezeigt.

Alter	Geschlecht	Tumorlokalisation	T-Stadium	N-Stadium
Ø = 58.4 (36-89)	M = 38 W = 2	Mundhöhle = 10		
		Oropharynx = 7	pT1 = 3	pN0 = 14
		Hypopharynx = 10	pT2 = 11	pN1 = 4
		Larynx = 9	pT3 = 7	pN2 = 17
		Parotis = 1	pT4 = 16	pN3 = 5
		COUP* = 3		

Abbildung 1.6.2: Klinische Daten der HNSCC Patienten in den vergleichenden Untersuchungen

*Cancer of unknown primary.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Daten, Tumorlokalisationen und Stadieneinteilungen der Studienteilnehmer zusammengefasst.

Alter	Geschlecht	Tumorlokalisation	T-Stadium	N-Stadium
Ø = 57.0 (44-77)	M = 24 W = 4	Mundhöhle = 6		
		Oropharynx = 9	pT1 = 3	pN0 = 8
		Hypopharynx = 6	pT2 = 11	pN1 = 3
		Larynx = 6	pT3 = 6	pN2 = 11
		COUP = 1	pT4 = 7	pN3 = 6

Abbildung 1.6.3: Klinische Daten der Studienteilnehmer beider Gruppen (Rofecoxib und Kontrollgruppe).

2 Material

2.1 Antikörper

Antikörper	Herkunft	Isotyp	Bezugsquelle
a-CD3-PE ¹	Maus	IgG ₁	Dianova, Hamburg
a-CD8-FITC ²	Maus	IgG ₁	Pharmingen, San Diego (USA)
a-CD11b-FITC	Maus	IgG ₁	Dianova, Hamburg
a-CD14-PE	Maus	IgG _{2a}	Dianova, Hamburg
a-CD16-PE	Maus	IgG ₁	Pharmingen, San Diego (USA)
a-CD16b	Maus	IgG ₁	Immunotech, Marseille (Frankreich)
a-CCR5-FITC	Maus	IgG _{2a}	Pharmingen, San Diego (USA)
a-Maus-FITC	Maus	IgG	Dianova, Hamburg
a-Maus-PE	Ziege	IgG	Dianova, Hamburg
FITC-Isotypkontrolle	Maus	IgG	Dianova, Hamburg
PE-Isotypkontrolle	Maus	IgG	Dianova, Hamburg

2.2 Chemikalien und Sonstiges

Artikel	Bezugsquelle
Alkoholreihe	Merck, Darmstadt
Avidin-Biotin	Vector Laboratories, England
Azeton	Merck, Darmstadt
Polyalkylenglykolether (Brij®)	Baack, Schwerin
Chloromethylfluoreszeindiazetat (CMFDA)	Invitrogen, Karlsruhe
Einschlussmedium für Objektträger	Eukitt, Freiburg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
FACS-Flow ©	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)
Fast-blue	Polysciences, Eppelheim
Ficoll Hypaque ©	Pharmacia Biotechnology, Uppsala (Schweden)
Fötale Kälberserum	Seromed/Biochrom, Berlin, Chargen 569U und 611A

¹PE: Phycoerythrin

²FITC: Fluorescein-Isothiocyanat

Glasflaschen	Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin-Eosin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Heparin	Braun, Melsungen
MIP 1 β	R&D Systems, Heidelberg
NH ₄ Cl	Merck, Darmstadt
PBS-Tabletten (<i>phosphate buffered saline</i>)	Gibco BRL, Karlsruhe
Propidiumiodid	Baack, Schwerin
Synthetisches Zellkulturmedium	PromoCell, Heidelberg
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt
Zellkulturmedien und Zusätze	Seromed/Biochrom

2.3 Geräte

Artikel	Bezugsquelle
Durchflusszytometer FACS-Calibur (Software: CellQuest)	Becton Dickinson, Heidelberg
Gefriermikrotom	Leica, Bensheim
Inkubator für Zellkultur, CO ₂ -begast	Haraeus, München
Phasenkontrast-/UV-Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Sicherheitswerkbank	Haraeus, München
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg; Hettich, Tuttlingen; Sorvall, Bad Homburg

2.4 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Bezugsquelle
Glasobjektträger, silanisierte	Schott, Mainz
Kanülen	Becton Dickinson, Heidelberg
Membran (Zellkultureinsatz)	Falcon, Franklin Lakes (USA)
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg; Gilson, Bad Camberg
Röhrchen, steril, Zellkultur	Falcon/BD, Le Pont de Claix; Nunc, Wiesbaden
Spritzen	Braun, Melsungen
Sterilfilter	Millipore, Bedford (USA)
Tiefkühlgefäße	Nunc, Wiesbaden
Zellkultur-Multiloch-Platten	Falcon/BD, Heidelberg
Zellsiebe, Polyester-Siebgewebe	Falcon/BD, Heidelberg
Zentrifugengefäße	Costar, New York (USA)

3 Methoden

Das entnommene Venenblut wurde durch Zentrifugation in Serum und zelluläre Bestandteile getrennt, das Serum wurde zur späteren Verwendung sofort eingefroren. Die Erythrozyten wurden durch einen Lysepuffer (10mM KHCO₃, 155mM NH₄Cl, 0.1mM EDTA) lysiert, der im Verhältnis 1 Teil Blutzellen: 3 Teile Puffer für 15 min auf Eis zugesetzt wurde. Nach einem Waschschrift wurde, um eine vollständige Lyse der Erythrozyten zu erreichen, dieser Vorgang wiederholt. Mit den so separierten Leukozyten wurden dann verschiedene Experimente durchgeführt.

3.1 Durchflusszytometrie

Zur Beurteilung der Antigene auf den Zelloberflächen eignet sich die Technik der Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS). Das Prinzip der Durchflusszytometrie basiert auf der Messung verschiedener Eigenschaften einzelner Zellen, die in einem Flüssigkeitsstrom einen Laserstrahl passieren. Jede Zelle interagiert mit dem Laserlicht, was zu einer Streuung des Lichtes führt. Das Maß dieser Streuung wird durch Eigenschaften der Zelle bestimmt, wie etwa Zellgröße, Zellmembran, Zellkern und Granularität. Darüber hinaus können verschiedene Antigene auf der Zelloberfläche oder im Innern der Zelle durch Markierung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern nachgewiesen werden. Die Fluorochrome werden durch Laserlicht angeregt und die emittierten Fluoreszenzen können analysiert werden.

So können im FACS verschiedene Parameter einer Zelle simultan gemessen werden:

- Vorwärtsstreulicht (FSC = *forward scatter*): Ein Teil des Lichts wird relativ zur Achse des einfallenden Lichtstrahls in einem Winkel von 2° bis 6° gestreut. Dieses Licht ist ein Maß für die Zellgröße; große Zellen streuen mehr Licht als kleine Zellen.
- Seitwärtsstreulicht (SSC = *sideward scatter*): Das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreute Licht wird als SSC bezeichnet. Die Intensität dieses Lichtes ist abhängig von der Granularität der Zelle. Je höher die Granularität, desto stärker das Seitwärtsstreulicht.
- Fluoreszenz: Durch spezielle Filtersysteme wird das seitwärts abgestrahlte Licht in drei verschiedene Spektralbereiche zerlegt. Damit ist es möglich, sowohl Einzel-, Doppel- als auch Dreifachfluoreszenzen zu messen, was die gleichzeitige Analyse von bis zu drei verschiedenen Zelloberflächenmarkern erlaubt, die Emissionsspektren der

verwendeten Fluorochrome müssen jedoch verschieden sein. Darüber hinaus zeigen Zellen durch Anregung mit Laserlicht auch ohne Anfärbung ein gewisses Maß an Autofluoreszenz, welche mit Hilfe geeigneter Kontrollen von der antigenspezifischen Fluoreszenz unterschieden werden muss.

Für eine typische FACS-Messung, wie sie hier beschrieben ist, wurden pro Ansatz 5×10^4 Zellen mit einem spezifischen Primärantikörper inkubiert (50 $\mu\text{g/ml}$ in PBS mit 3% fötalem Kälberserum (FCS)) für 30 min auf Eis. Anschließend wurde nicht gebundener Antikörper mit PBS abgewaschen und daraufhin die Zellen mit einem Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper inkubiert. Es kamen FITC- (Fluoresceinisothiocyanat) markierte oder PE- (Phycoerythrin) markierte Sekundärantikörper zum Einsatz. Erneut wurde nicht gebundener Antikörper abgewaschen und die Zellen in 500 μl PBS mit 3% FCS resuspendiert. Diese Suspension wurde durch ein Polyester-Siebgewebe (59 μm Maschenweite) gegeben, um Partikel herauszufiltern, die die durchflusszytometrische Messung beeinträchtigen können. Um zu überprüfen, ob die Zellen noch vital waren, wurde Propidiumjodid (5 $\mu\text{g/ml}$) zugesetzt, das nur von toten Zellen aufgenommen wird. Die Proben wurden nun per FACS-Analyse gemessen, und im entsprechenden Auswerteprogramm analysiert. Um spezifische von durch die Autofluoreszenz ausgelösten unspezifischen Signalen zu unterscheiden, war jeder gemessenen Probe eine Kontrollprobe zugeordnet, der anstatt des spezifischen Antikörpers nur ein Fluoreszenz-markierter Zweitantikörper zugesetzt war, und die parallel gemessen wurde. Bei der Verwendung direkt markierter Erstantikörper wurden zur Diskriminierung des unspezifischen Signals Fluoreszenz-markierte isotypische Kontrollantikörper eingesetzt.

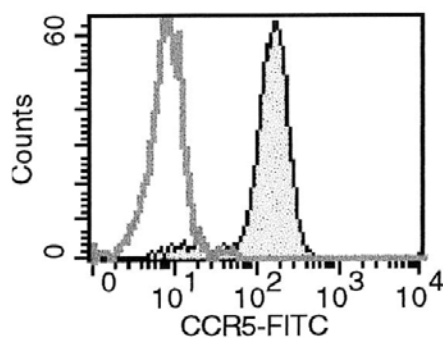


Abbildung 3.1.1: Fluoreszenz der Probe (grau) und der Kontrolle (weiß)

Um eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Proben herzustellen, wurde die durchschnittliche Fluoreszenz-Intensitäts-Rate (*mean fluorescence intensity ratio: mfir*) errechnet. Sie ergibt sich aus der durchschnittlichen Intensität der Fluoreszenz (*mean fluorescence intensity: mfi*) der gemessenen Probe dividiert durch die *mfi* der Kontrollprobe. zusammensetzt.

$$mfir = \frac{mfi(\text{Probe})}{mfi(\text{Kontrolle})}$$

3.2 Funktionelle Experimente

Zur Beurteilung der Funktion der Leukozyten wurden Experimente durchgeführt, die die Adhäsionsfähigkeit und Migrationsfähigkeit der Zellen prüfen.

3.2.1 Adhäsionsassay

Für den Adhäsionsassay wurden Zellkulturplatten zunächst mit einem anti-humanen IgG Antikörper beschichtet. IgG Antikörper eignen sich aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften zur Adsorption an polymere Oberflächen. Nicht gebundene Antikörper wurden abgewaschen. Freie Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit PBS (*phosphate buffered saline*) mit 3% FCS (fötales Kälberserum) abgesättigt. Nach erneutem Waschen wurden daraufhin die Platten mit einem in unserer Arbeitsgruppe rekombinant hergestellten Fusionsprotein beschichtet, das aus ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*) und dem FC Teil eines humanen IgG-Immunglobulin besteht. Nach einem dritten Waschschrift waren die Platten fertig präpariert. 10^6 Leukozyten wurden nun auf die Platte gegeben und für drei Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach mehrmalig gründlichem Abwaschen konnten die adhärenen Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt werden. Dieser Versuch wurde in Duplikaten angesetzt, der Mittelwert wurde gebildet.



Abbildung 3.2.1 Antikörper bindet an die Kunststoffoberfläche, daran bindet der FC-Teil des ICAM Fusionsproteins. Zur Adhäsion fähige Monozyten binden mittels des Adhäsionsmoleküls MAC-1 an ICAM (schematische Darstellung).

3.2.2 Migrationsassay

Für den Migrationsassay wurden die Leukozyten zunächst mit Hilfe eines Ficoll-Hypaque-Gradienten (500 g über 30 min) aufgetrennt in PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) und Granulozyten. Die PBMCs wurden in PBS aufgenommen und gründlich gewaschen. 10^6 dieser Zellen wurde nun auf einen Polycarbonatfilter gegeben, der $8\mu\text{m}$ große Poren aufweist. Diese Porengröße schließt aus, dass Monozyten, die eine Größe von etwa $20\text{-}30\mu\text{m}$ haben, durchfallen, sie müssen sich aktiv hindurchzwängen. In der Kammer unter dem Filter befand sich Zellkulturmedium mit einem Zusatz von MIP1- β (20 ng/ml), einem Chemokin, das lokal bei Inflammation gebildet wird, und durch Bindung an den Chemokinrezeptor CCR5 die Migration von Monozyten in diese Richtung induziert. Als Kontrolle diente der gleiche Versuchsaufbau, jedoch ohne den Zusatz von MIP- β . Die Zellen wurden für 45 min im Brutschrank inkubiert, danach wurde der Filter von unten abgespült und die so gewonnenen Zellen zur unteren Fraktion hinzugefügt. Diese Zellen hatten den Filter aktiv überwunden, unter dem Lichtmikroskop wurde ihre Anzahl ermittelt. Der Grad der Fähigkeit zur gerichteten Migration auf den chemotaktischen Reiz des MIP1- β hin wird ausgedrückt als Prozent der eingesetzten Zellen, die erfolgreich den Filter überwunden hatten, abzüglich derer, die auch ohne einen Zusatz von MIP1- β in die untere Kammer gewandert waren. Dieser Versuch wurde in Duplikaten angesetzt und der Mittelwert gebildet.

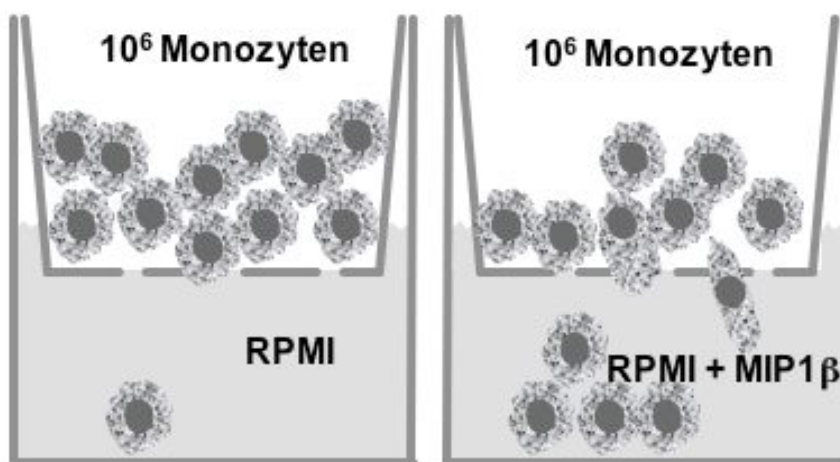


Abbildung 3.2.2 Zur Migration fähige Monozyten folgen dem chemotaktischen Reiz des MIP-1 β . Ohne Chemokin überwinden nur wenige Monozyten den Polycarbonatfilter.

3.3 Immunhistochemie

3.3.1 Herstellung der Gewebeschnitte

Das Tumorgewebe wurden unmittelbar nach Entnahme in Kunststoffschälchen platziert, mit Einbettmedium blasenfrei umgossen und Gewebe schonend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Mit einem Gefriermikrotom wurden 5 µm dicke Serienschritte hergestellt, auf silanisierte Glasobjektträger aufgezogen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Nach Fixierung in Azeton für 10 min erfolgte eine erneute Lufttrocknung.

3.3.2 Beurteilung der Morphologie

Um die Gewebemorphologie vor der immunhistochemischen Färbung beurteilen zu können, wurde jeweils ein Schnitt pro Gewebeblock wie folgt mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Für die Kernfärbung wurden die Gewebeschnitte für 10 min in Mayers Saures Hämalaun gegeben und anschließend 10 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Nach fünf Minuten Färbung in 0,5% wässriger Eosinlösung und Fixation in der aufsteigenden Alkoholreihe erfolgte die Härtung für 10 min in Xylol. Anschließend wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckt. Gewebe, die sich als strukturarm und nicht gut erhalten oder anderer Herkunft als erwartet erwiesen, wurden aussortiert und nicht weiter bearbeitet.

3.3.3 Nachweis von Oberflächenmolekülen

Der Nachweis von Oberflächenmolekülen auf den Zellen der Gewebeschnitte erfolgte mittels der Avidin-Biotin-Komplex Technik (ABC-Technik). Zunächst wurde ein gegen das Antigen gerichteter Primärantikörper auf das Gewebe gegeben und auf diesen dann ein Biotin-konjugierter Sekundärantikörper. Als drittes Reagenz wurde ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex eingesetzt, an dem das Avidin nicht vollständig mit Biotin besetzt ist, sondern freie Bindungsstellen hat, an die der Biotin-tragende Sekundärantikörper binden kann. Das Enzym Peroxidase - und damit das gesuchte Antigen – konnte anschließend mit dem Chromogen AEC-Substratlösung sichtbar gemacht werden.

3.3.4 Nachweis von Monozyten

Monozyten wurden detektiert durch den Nachweis von Panzytokeratin (KP1). KP1 wurde durch die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode (APAAP-Methode)

sichtbar gemacht, der das gleiche Prinzip wie der ABC-Methode zu Grunde liegt. Auf den primären monoklonalen anti-KP1 Antikörper, der aus der Maus stammt, folgt ein anti-Maus Antikörper. An diesen bindet ein Immunkomplex, der aus intestinaler alkalischer Phosphatase und einem Antikörper gegen dieses Enzym besteht. Die alkalische Phosphatase, die für das gesuchte Antigen steht, ergibt zusammen mit der verwendeten Substratlösung Fast-Blue ein tiefes Blau als Reaktionsprodukt. Anschließend wurden zur besseren Auswertbarkeit die Zellkerne mit Hämalaun gefärbt.

3.3.5 Doppelfärbung

Die APAAP-Methode ist anwendbar auch an Gewebeschnitten, die bereits vorher mit der ABC-Methode behandelt wurden. Deshalb wurden in den zu untersuchenden Geweben zunächst z.B. CCR5 und dann KP1 angefärbt, so dass durch diese Kombination der Nachweis von CCR5 auf Monozyten gelingt.

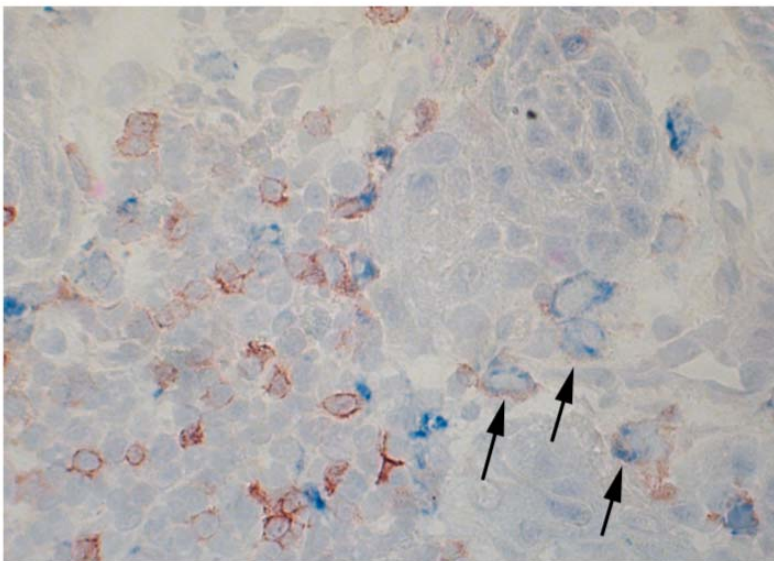


Abbildung 3.3.1: Immunhistochemie eines Plattenepithelkarzinoms bei 40-facher Vergrößerung. Die Doppelfärbung weist CCR5 (rot) und KP1 (dunkelblau) nach, die Pfeile markieren dunkelblau gefärbte Monozyten, auf denen CCR5 rot eingefärbt ist.

3.3.6 Lichtmikroskopische Auswertung

Die Auswertung der immunhistochemischen Präparate erfolgte am Lichtmikroskop in 40-facher Vergrößerung durch Auszählen der angefärbten Zellen. Um eine Verzerrung zu vermeiden wurden die verblindeten histologischen Präparate von zwei Personen unabhängig

voneinander ausgezählt. Es wurden von jedem Präparat fünf Gesichtsfelder ausgewertet, die höchstens den Abstand von einem high power field (HPF) zum Epithel hatten. Ein HPF entspricht einem Gesichtsfeld in 40-facher Vergrößerung bzw. $\frac{1}{6}$ mm. In jedem HPF wurden die Gesamtzellzahl des Gewebes bestimmt, sowie die Anzahl der markierten Zellen bzw. die Anzahl der doppelt markierten Zellen. Der Mittelwert aus den fünf HPF wurde gebildet, und die markierten Zellen wurden als Prozent der Gesamtzellzahl ausgedrückt.

3.4 Statistik

Soweit nicht anders markiert wurde stets der Mittelwert der Versuchsreihe mit der dazu gehörenden Standardabweichung angegeben. Verwendet wurde der Student t-Test für verbundene und unverbundene Messwerte, das Signifikanzniveau wurde auf 0.05 festgesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Morphologie

4.1.1 Zellpopulationen stellen sich in der Durchflusszytometrie konstant dar

Mit der Durchflusszytometrie lassen sich Zellen anhand ihrer Granularität und Größe unterscheiden, hier sind die Größe auf der x-Achse und die Granularität auf der y-Achse dargestellt. Wenn zusätzliche, charakteristische Oberflächenmoleküle (*lineage marker*) mit Antikörpern markiert werden, lässt sich feststellen, zu welcher Zellpopulation jede einzelne gemessene Zelle gehört (vgl. Methoden). Dieses Verfahren ist zuverlässig, aber aufwändig. Um nicht bei jeder Probe eine Markierung von Zellart-spezifischen Antikörpern vornehmen zu müssen, stellten wir durch eine Messreihe die Bereiche fest, in denen sich Zellpopulationen aufgrund ihrer Größe und Granularität konstant wiederfinden. Diese Bereiche nennt man *gates*. Wir konnten drei *gates* definieren, für die Populationen der Lymphozyten (R1), Granulozyten (R2) und Monozyten (R3). Dazu untersuchten wir Vollblutproben nach Lyse der Erythrozyten von 18 gesunden Probanden.

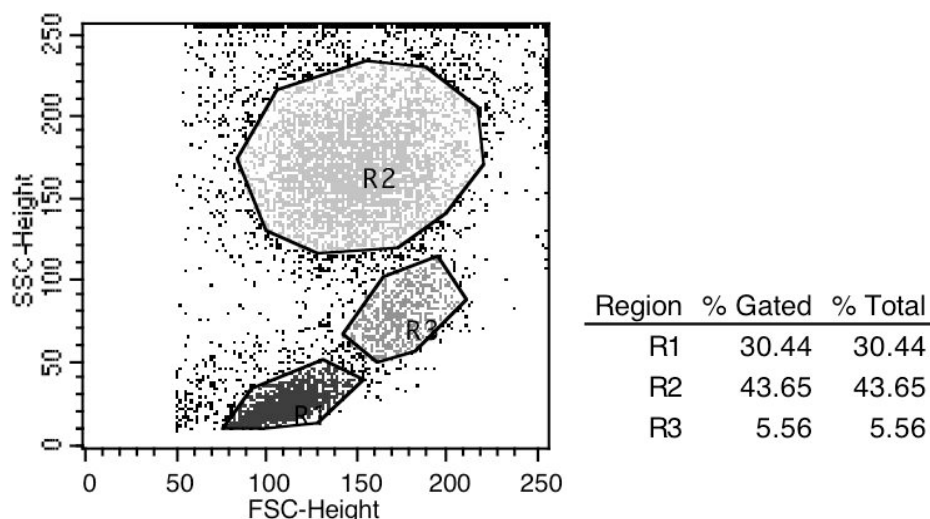
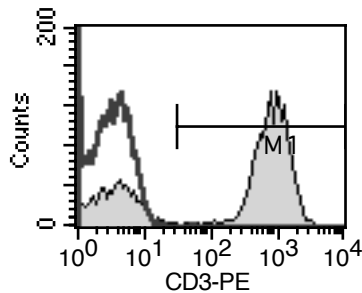


Abbildung 4.1.1: Leukozyten aus dem peripheren Blut sind aufgrund von Größe (FSC-Height) und Granularität (SSC-Height) unterscheidbar. Drei *gates* stellen sich konstant dar, die darin liegenden Zellen konnten wie folgt zugeordnet werden: R1 = Lymphozyten (nachgewiesen mit einem CD3-Antikörper), R2 = Granulozyten (nachgewiesen mit einem CD16b-Antikörper), R3 = Monozyten/Makrophagen (nachgewiesen mit einem CD14-Antikörper). Dargestellt ist eine repräsentative durchflusszytometrische Messung der peripheren Leukozyten eines gesunden Probanden. In R1 liegen 30,4% der Zellen, in R2 liegen 43,7% der Zellen und in R3 liegen 5,6% der Zellen.

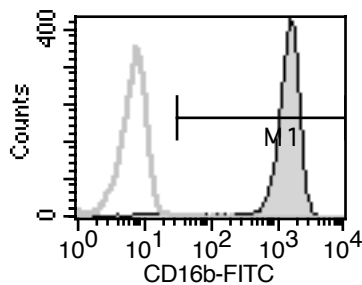
Um die in den *gates* liegenden Zellen zu charakterisieren, wurden Antikörper-Markierungen für CD3, CD16b und CD14 verwendet. Anhand der folgenden Auswertung lässt sich belegen, dass im *gate* R1 die meisten Zellen CD3-positiv und damit T- Zellen sind. CD3 ist Teil des T-Zellrezeptors (TCR) auf allen reifen T-Zellen und für die Erkennung von Antigenen zuständig. Bei den restlichen Zellen in *gate* R1 handelt es sich um CD19-positive B-Lymphozyten und CD56-positive NK-Zellen (Daten nicht gezeigt).



Marker	% Gated	% Total	Mean	Median
All	100.00	30.44	576.59	562.34
M1	68.11	20.73	844.63	777.37

Abbildung 4.1.2: 68% der Zellen in R1 sind CD3-positiv und damit T-Zellen. M1 markiert den Bereich, in dem CD3 nachgewiesen wurde. Die breite graue Linie zeigt die Kontrollmessung an, in diesem Bereich handelt es sich um Autofloreszenz, er wurde deshalb nicht berücksichtigt.

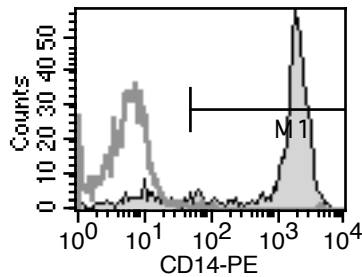
Im *gate* R2 sind fast alle Zellen positiv für CD16b und damit Granulozyten. CD16b ist ein niedrigaffiner Rezeptor für aggregiertes IgG, der charakteristisch ist für neutrophile Granulozyten (Fernandes et al., 2006).



Marker	% Gated	% Total	Mean	Median
All	100.00	41.90	1360.53	1333.52
M1	99.37	41.63	1369.09	1333.52

Abbildung 4.1.3: In R2 sind 99,4% der Zellen CD16b-positiv und damit Granulozyten. Hellgraue Linie: Kontrolle.

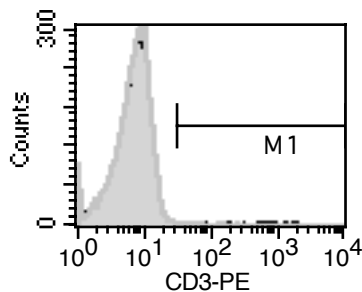
Im *gate* R3 sind 90% der Zellen CD14 positiv und also Monozyten/Makrophagen. CD14 ist der Rezeptor für den Komplex aus Lipopolysaccharid und lipopolysaccharidbindendem Protein, den myelomonozytische Zellen an ihrer Oberfläche tragen. Die physiologische Rolle von CD14 besteht in der Fähigkeit, apoptotische Zellen zu binden (Devitt, 2003; Gregory, 2000).



Marker	% Gated	% Total	Mean	Median
All	100.00	5.94	1550.66	1654.82
M1	90.07	5.35	1720.21	1715.44

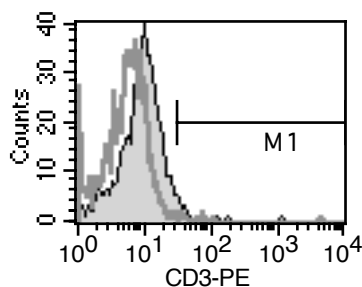
Abbildung 4.1.4: 90% der Zellen in R3 sind CD14-positiv und damit Monozyten/Makrophagen. Breite hellgraue Linie: Kontrolle.

Umgekehrt zeigt sich, dass in den *gates* R2 und R3 praktisch keine T-Zellen vorhanden sind, CD3 ist hier auf weniger als 1% der Zellen nachweisbar. Die T-Zellen liegen vollständig in *gate* R1.



Marker	% Gated	% Total	Mean	Median
All	100.00	45.67	7.46	6.98
M1	0.27	0.12	56.77	40.68

Abbildung 4.1.5: In R2 sind nur 0,27% der Zellen CD3-positiv, in diesem Diagramm liegen sie im Bereich M1.



Marker	% Gated	% Total	Mean	Median
All	100.00	5.78	9.62	5.62
M1	0.95	0.06	367.63	56.23

Abbildung 4.1.6: In R3 sind 0,95% der Zellen CD3-positiv.

Da unsere Untersuchungen im Folgenden auf Tumorpatienten abzielen sollten, mussten wir sicherstellen, dass sich die zuvor beschriebenen *gates* auch für Leukozyten von Patienten mit HNSCC anwenden lassen.

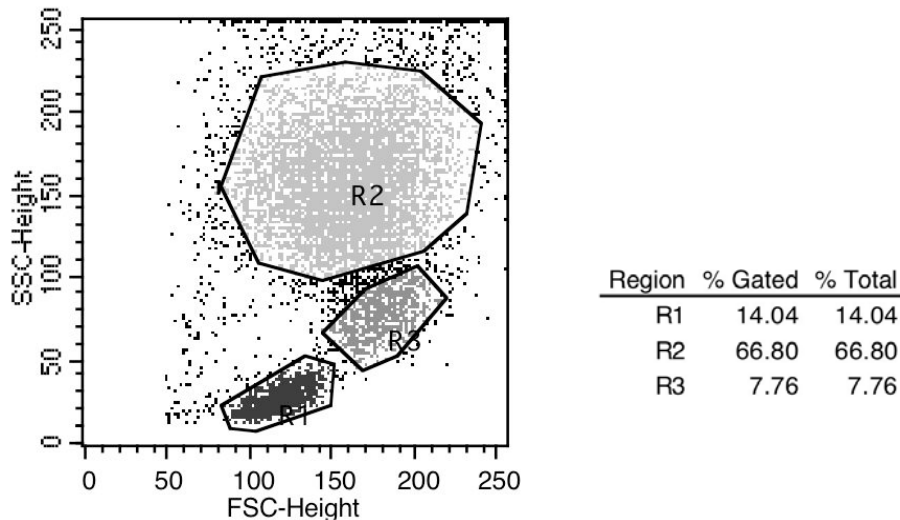


Abbildung 4.1.7: Dargestellt ist eine repräsentative durchflusszytometrische Untersuchung der Leukozyten eines Tumorpatienten. Die Anordnung der *gates* ist identisch. Auffallend ist die Lymphopenie, die typisch ist für HNSCC Patienten. Hier liegen nur 14% aller Zellen im Lymphozyten-*gate* R1 gegenüber durchschnittlich 30% bei gesunden Probanden (siehe oben).

Auch bei Tumorpatienten konnten wir die gleichen *gates* verwenden. Auffallend war allerdings eine unterschiedlich ausgeprägte Lymphopenie, sichtbar im *gate* R1 (siehe Abb. 4.1.7). Unsere Daten zeigen, dass die Einteilung der Leukozyten nur nach FSC/SSC hinreichend spezifisch ist. Diese Möglichkeit, Leukozytensubpopulationen in der Durchflusszytometrie anhand ihrer Größe und Granularität anzusprechen, haben wir im Folgenden genutzt und konnten nun Oberflächenmoleküle auf den einzelnen Zellpopulationen untersuchen, ohne dabei jeweils den Nachweis über die Färbung mit *lineage marker* erbringen zu müssen.

4.1.2 Leukozyten von HNSCC-Patienten zeigen eine andere Expression von Oberflächenmolekülen

Wir untersuchten zusätzlich zu den Blutproben von 18 zufällig ausgesuchten gesunden Probanden auch 21 Blutproben von Tumorpatienten aus der Hals-Nasen-Ohrenklinik des Klinikum Großhadern, mit dem Zweck, Oberflächenmoleküle zu identifizieren, die ein unterschiedliches Expressionsniveau in den beiden Gruppen aufweisen. Oberflächenmoleküle machen die Funktion der Immunzelle aus. Ist ihr Expressionsniveau bei Tumorpatienten reduziert, deutet dies auf eine Fehlfunktion der Zelle hin und könnte damit zur Klärung der Frage beitragen, warum das Immunsystem von Tumorpatienten nur eingeschränkt funktioniert. Im Vergleich zwischen Leukozyten von Tumorpatienten und gesunden Kontrollspendern zeigten sich deutliche Unterschiede in der Rezeptordichte, gemessen im FACS als *mean fluorescence intensity ratio* (mfir). Diese werden hier im Einzelnen näher vorgestellt.

4.1.2.1 Monozyten von HNSCC-Patienten exprimieren weniger CCR5 Chemokinrezeptoren

Monozyten können Tumorzellen identifizieren und unschädlich machen, Voraussetzung ist, dass sie dazu an den Zielort geleitet werden. An den Chemokinrezeptor CCR5 binden die Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES und lösen damit einen chemotaktischen Reiz auf den Monozyten aus (Navenot et al., 2001). Plattenepithelkarzinome können durch die Expression von Cyclooxygenase 2 und damit der Produktion von Prostaglandin E₂ gerade diese Chemotaxis unterdrücken, weil Prostaglandin E₂ die Expression von CCR5 auf Monozyten herunter reguliert (Zeidler et al., 2000). Folglich ist die Chemotaxis der Monozyten zum Tumorgewebe gestört. CCR5 war erstmals durch seine Funktion als Korezeptor für die HIV Infektion bekannt geworden (Deng et al., 1996). Fehlt CCR5, besteht zwar eine Resistenz gegen HIV Infektion und ein gewisser Schutz vor bakterieller Sepsis, jedoch zeigt sich eine deutlich eingeschränkte Funktion der Makrophagen/Monozyten (Zhou et al., 1998). Bei HNSCC-Patienten fanden wir eine deutliche Reduktion von CCR5 auf Monozyten verglichen mit gesunden Probanden (siehe Abb. 4.1.8).

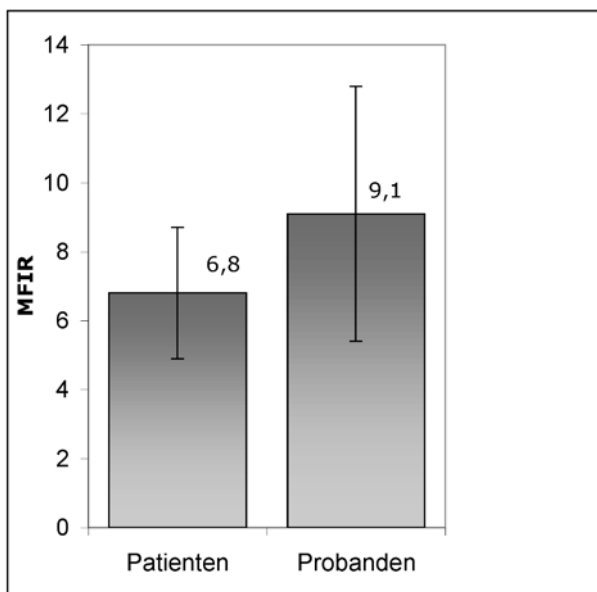


Abbildung 4.1.8: Monozyten von Tumorpatienten exprimieren signifikant weniger CCR5 Rezeptoren als gesunde Probanden ($p = 0,01$). Die durchschnittliche Rezeptordichte, gemessen als mfi (*mean fluorescence intensity ratio*), ist im Vergleich um fast ein Drittel erniedrigt.

4.1.2.2 Monozyten von HNSCC-Patienten exprimieren weniger CD14 Rezeptoren

Das Rezeptorprotein CD14 ist ein Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankertes Protein, das auf Monozyten und Makrophagen stark und auf Granulozyten schwach exprimiert wird. Die physiologische Funktion ist die Bindung und Phagozytose apoptotischer Zellen (Gregory, 2000). Des Weiteren kann CD14 den Komplex aus Lipopolysacchariden (LPS) und Lipopolysaccharidbindendem Protein (LBP) binden. Lipopolysaccharide sind Bestandteile der Bakterienwand von gramnegativen Bakterien. Folge dieser Bindung ist eine Zellaktivierung von Monozyten. Da CD14 keine transmembrane Domäne hat, sind zur Signaltransduktion weitere Moleküle notwendig (Taylor et al., 2005). Toll-like-Rezeptor 4 bindet an den CD14 – LPS – LBP Komplex und löst die Produktion von TNF α aus, das letztlich, mit Hilfe von Kostimulatorischen Molekülen (CD80 und CD86) und gemeinsam mit den präsentierten mikrobiellen Antigenen, eine Aktivierung von CD4 T-Zellen auslöst. Fehlt aufgrund einer Mutation CD14, besteht eine ausgeprägte Disposition zu gramnegativer Sepsis (Hailman et al., 1994). Wir stellten auf den Monozyten von Tumorpatienten eine deutliche Reduktion der Expression von CD14 fest (siehe Abb. 4.1.9).

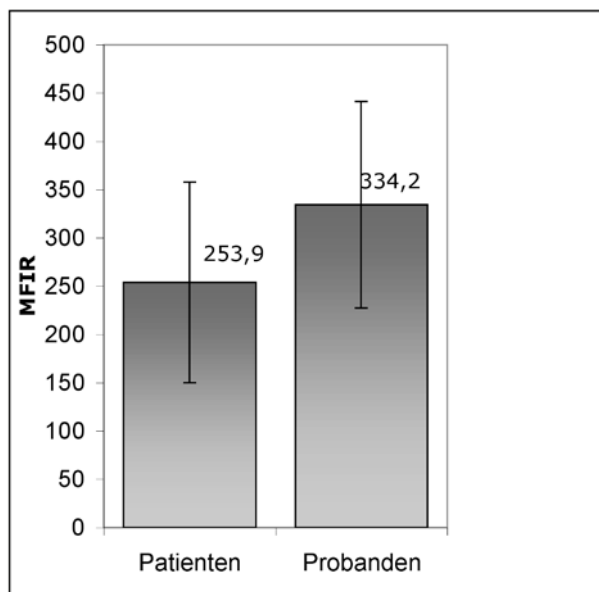


Abbildung 4.1.9: Monozyten von Tumorpatienten weisen weniger CD14 auf als Monozyten von gesunden Kontrollspendern ($p = 0,016$). Die gemessene Rezeptordichte entspricht einer Reduktion um 24% in Bezug auf Monozyten im gesunden Vergleichskollektiv.

4.1.2.3 Granulozyten von HNSCC-Patienten exprimieren weniger CD14

Neben Monozyten/Makrophagen tragen auch Neutrophile Granulozyten CD14 auf ihrer Oberfläche, wenn auch in deutlich geringerer Konzentration. Auf Neutrophilen Granulozyten kommt es als Folge der Bindung zu einer Steigerung der Adhäsionsaktivität durch eine stärkere Expression von CR3(CD11b/CD18) (Taylor et al., 2005). Damit ist der erste Schritt zur Einwanderung in das Zielgewebe, nämlich die Adhäsion am Endothel, möglich. Auf den Granulozyten von HNSCC-Patienten war deutlich weniger CD14 messbar als auf den Granulozyten von gesunden Probanden (siehe Abb. 4.1.10).

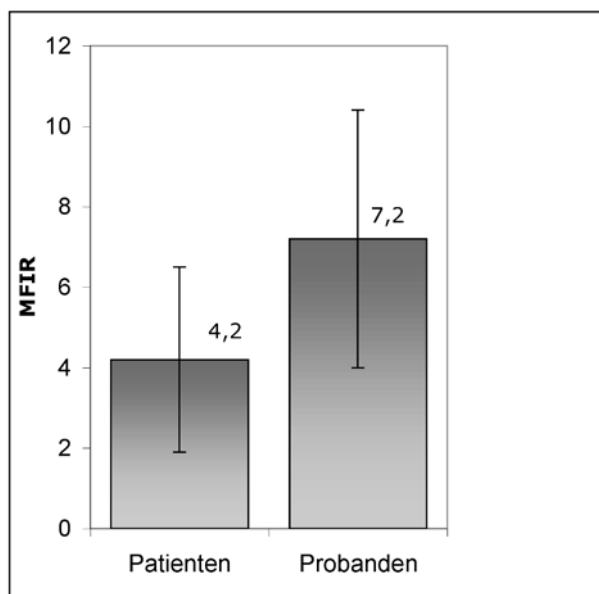


Abbildung 4.1.10: Granulozyten von Tumorpatienten weisen deutlich weniger CD14 auf im Gegensatz zu gesunden Probanden ($p = 0,001$). Die Rezeptordichte von Tumorpatienten gemessen als mfir (*mean fluorescence intensity ratio*) erreicht im Durchschnitt nur 58% des Werts von gesunden Probanden.

4.1.2.4 Granulozyten von HNSCC-Patienten exprimieren weniger CD16

CD16 ist der Fc γ RIII Rezeptor, der Antikörper (IgG) erkennt, die an die Oberfläche einer Zelle gebunden sind, und so eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) auslöst. Diese stellt einen wichtigen Mechanismus des Angriffs auf Tumorzellen dar (Janeway, 2004). CD16 ist ein transmembraner Rezeptor, der auf NK-Zellen (natural killer cell), Makrophagen und Mastzellen vorkommt. Er ist auch auf Neutrophilen Granulozyten, hier allerdings in der GPI-verankerten Form (CD16b).

Auf den Granulozyten von HNSCC-Patienten war auch der CD16 Rezeptor wesentlich weniger stark exprimiert als bei gesunden Probanden (siehe Abb. 4.1.11).

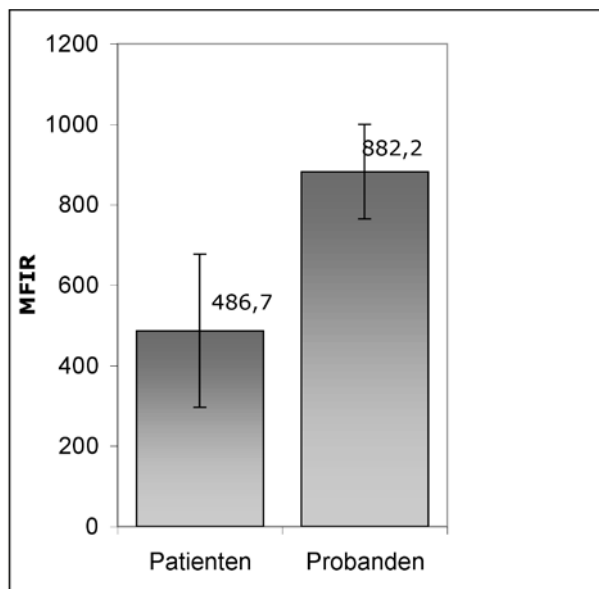


Abbildung 4.1.11: Die Granulozyten von Tumorpatienten tragen auch deutlich weniger CD16 an ihrer Oberfläche als bei gesunden Probanden gemessen wird ($p=0,001$). Der Mittelwert der Rezeptordichte bei Tumorpatienten liegt fast zur Hälfte niedriger (55%) als bei gesunden Probanden.

Auch bei anderen Tumorentitäten wie dem Ovarialkarzinom wurde eine Mindereexpression des Fc γ RIII Rezeptors CD16 als eine Ursache der Immunsuppression beobachtet. Beim Ovarialkarzinom wird das vom Tumor produzierte CA-125 Protein dafür verantwortlich gemacht (Patankar et al., 2005). Auch beim Nierenzellkarzinom wurde eine signifikante Herabregulation von CD16 auf NK-Zellen festgestellt, zudem waren nur wenige CD16+ NK-Zellen im Tumorgewebe (Porta et al., 2007).

4.1.2.5 Granulozyten von Tumorpatienten exprimieren weniger CD16b

CD16b ist spezifisch auf Neutrophilen Granulozyten zu finden (Chesla et al., 2000). Es handelt sich um die GPI-verankerte Form des niedrigaffinen Rezeptors für aggregiertes IgG. Nach Bindung des Liganden kommt es unter Beteiligung der Tec Tyrosinkinase zur intrazellulären Calciumerhöhung und zur Degranulation von Lysozym-haltigen Granulae (zellvermittelte Zytotoxizität) (Fernandes et al., 2005). Mäuse, deren CD16b-Gen gezielt mutiert wurde, sind immunsupprimiert. Beim Menschen wurde beim Krankheitsbild der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie ein Fehlen der GPI-verankerten Form des CD16b und anderer GPI-verankerte Oberflächenmoleküle nachgewiesen. Zusätzlich treten dann vermehrt zirkulierende Immunkomplexe und eine Neigung zu bakteriellen Infektionen auf. Bei HNSCC-Patienten fanden wir eine deutliche Reduktion von CD16b auf Granulozyten im Vergleich mit gesunden Probanden (siehe Abb. 4.1.12).

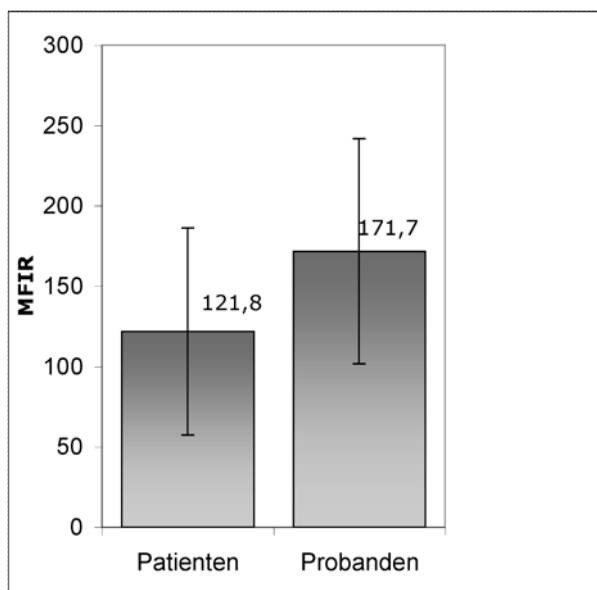


Abbildung 4.1.12: CD16b kommt hauptsächlich auf Neutrophilen Granulozyten vor und ist für die zellvermittelte Zytotoxizität notwendig. Bei Tumorpatienten ist es um rund ein Viertel reduziert im Gegensatz zu gesunden Kontrollspendern ($p=0,026$).

4.1.2.6 T-Lymphozyten von Tumorpatienten exprimieren weniger CD3

CD3 ist Teil des T-Zellrezeptors (TCR) auf reifen T-Zellen, der für die Identifikation von Antigenfragmenten notwendig ist, die der T-Zelle durch antigenpräsentierende Zellen auf Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC) angeboten werden. Als Folge der Bindung wird die T-Zelle aktiviert, was für einen Angriff auf Tumorzellen notwendig ist. Tatsächlich konnten wir eine um 13% verminderte Expression von CD3 auf den Lymphozyten von HNSCC-Patienten im Vergleich mit denen von gesunden Probanden feststellen (siehe Abb. 4.1.13). Dieser Unterschied war aufgrund der geringen Fallzahl in diesem Versuch ($n = 17$) statistisch nicht signifikant. Lymphozyten von Tumorpatienten tragen somit an ihrer Oberfläche eine geringere Menge des TCR, was ihre Funktion vermutlich nachteilig beeinflusst. Auch andere Gruppen konnten bei HNSCC-Patienten eine Verminderung des TCR feststellen, diese ist bei den Lymphozyten im Tumorgewebe noch ausgeprägter als bei den peripheren Lymphozyten, die wir hier untersucht haben (Reichert et al., 2002).

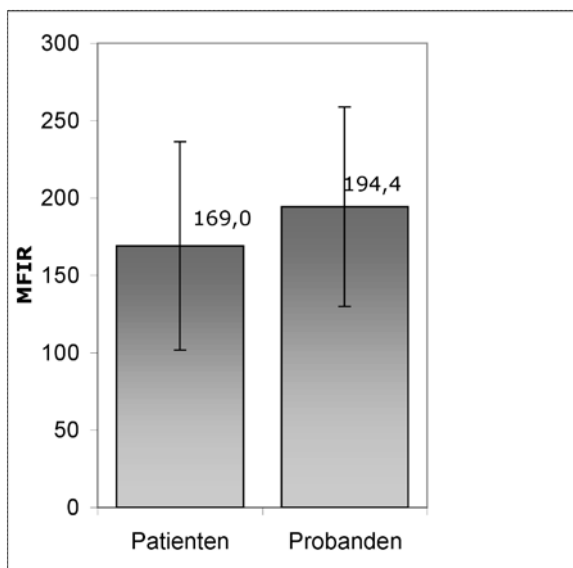


Abbildung 4.1.13 Lymphozyten von Tumorpatienten exprimieren weniger CD3 verglichen mit der gesunden Vergleichsgruppe. Das bedeutet eine geringere Expression des T-Zellrezeptors. Trotz der eindeutigen Tendenz ergibt sich keine statistische Signifikanz ($p = 0,22$).

4.1.2.7 Monozyten von Tumorpatienten exprimieren weniger CD11b, auf

Granulozyten bleibt CD11b unter dem Einfluss eines Karzinoms unverändert

CD11b bildet mit CD18 einen Komplex (Mac-1), der nach Aktivierung der Leukozyten durch Chemokine oder Zytokine für die Adhäsion am Endothel sorgt und damit die Voraussetzung für Diapedese und Migration ins Gewebe schafft (Springer, 1995). Dazu bindet CD11b/CD18 an ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*) auf Endothelzellen. Wenn CD11b z.B. durch den Einfluss von TGF- β (*transforming growth factor*) weniger exprimiert wird, ist nicht nur die Adhäsion sondern auch die nachfolgende Monozytenmigration zumindest *in vitro* nicht möglich (Basoni et al., 2005). CD11b/CD18 wird auch CR3 (*complement receptor type 3*) genannt, da er aktiviertes Komplement auf Zielzellen bindet und damit Phagozytose auslöst. CD11b kommt auf Granulozyten, Monozyten und NK Zellen vor.

Wir konnten eine Verminderung der Expression von CD11b auf Monozyten unter dem Einfluss eines Karzinoms feststellen, auf Granulozyten war in unserem Versuch CD11b in beiden Gruppen gleich stark exprimiert (siehe Abb. 4.1.14).

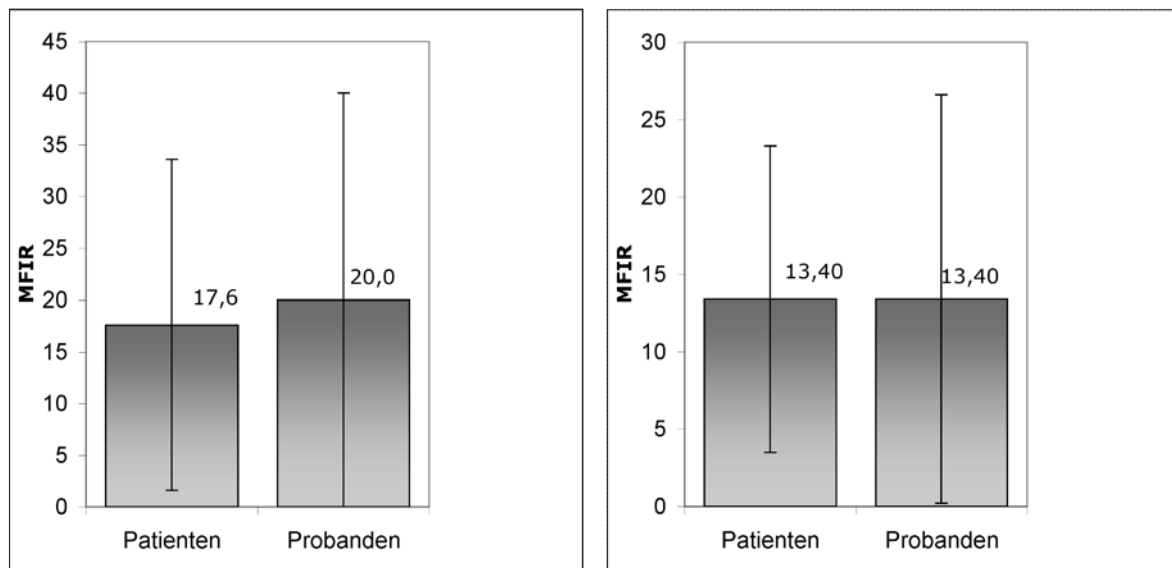


Abbildung 4.1.14 Monozyten von Tumorpatienten exprimieren etwa 12% weniger CD11b als Monozyten von gesunden Probanden, wobei der Unterschied keine statistische Signifikanz erreicht, mitbedingt durch die große Standardabweichung. Granulozyten von Tumorpatienten und von Probanden unterscheiden sich in der Expression von CD11b nicht.

4.1.2.8 Monozyten exprimieren unter Karzinomeinfluss weniger CD25

CD25 ist die α -Kette des IL-2 Rezeptors, der auf aktivierten T- und B-Zellen und Makrophagen vorkommt, somit wird CD25 als Aktivierungsmarker verwendet. CD25 war auf den Monozyten von Tumorpatienten geringer exprimiert ist als bei gesunden Probanden (siehe Abb. 4.1.15).

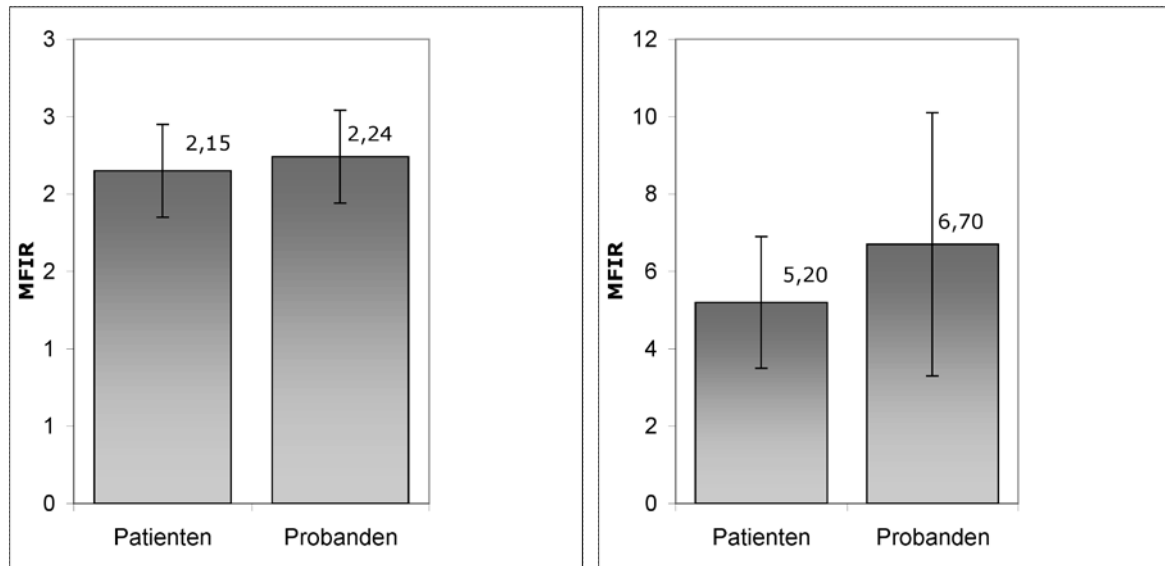


Abbildung 4.1.15: Lymphozyten unter dem Einfluss eines Karzinoms (links) zeigen keine Veränderung in der Expression von CD25. Auf Monozyten von Tumorpatienten (rechts) zeigte sich dagegen eine Verminderung von CD25 um etwa 22%.

4.1.2.9 NK-Zellen von Tumorpatienten exprimieren weniger CD56

Das Adhäsionsmolekül CD56 (*neural cell adhesion molecule*) ist ein transmembran verankertes Glykoprotein auf NK-Zellen und einigen T-Zellen. Es vermittelt die homophile Adhäsion zwischen NK-Zellen, d.h. das CD56 Molekül geht eine Bindung mit einem CD56 Molekül einer anderen Zelle ein, wobei die Funktion letztlich unklar ist. Das CD56 Molekül kommt auch im Gehirn in Kleinhirn und Kortex vor, dort sorgt es für ein gerichtetes Nervenwachstum, außerdem kommt es in der interneuronalen und neuromuskulären Regulation zum Einsatz. Das CD56 Molekül war bei Tumorpatienten eindeutig weniger vorhanden als bei gesunden Probanden (siehe Abb. 4.1.16).

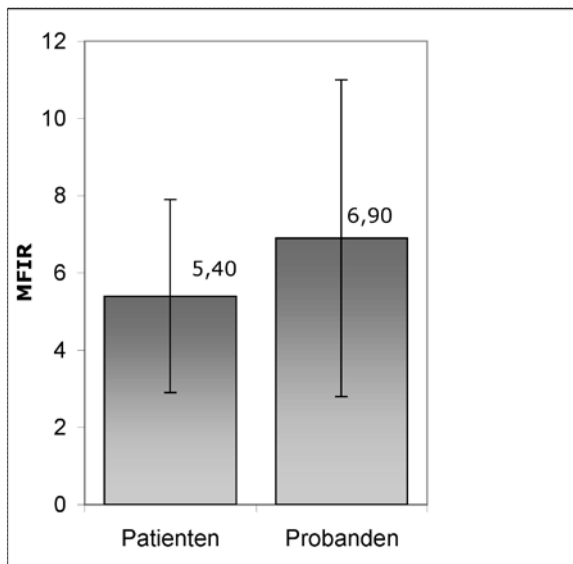


Abbildung 4.1.16 Lymphozyten von Tumorpatienten zeigen eine verminderte Expression CD56 um etwa 22%, eine Signifikanz ergab sich daraus jedoch nicht ($p = 0,204$), was möglicherweise an der großen Standardabweichung in dieser Versuchsreihe liegt..

4.1.3 Weitere Oberflächenmoleküle waren unter dem Einfluss eines Karzinoms in ihrer Expression unverändert

Hier zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den Kollektiven, was auch belegt, dass die Herabregulation bestimmter Oberflächenmoleküle spezifisch zu sein scheint und nicht etwa durch einen mangelhaften Versuchsaufbau verursacht wird.

4.1.3.1 Die CXCR4 Expression auf den Lymphozyten verändert sich unter dem Einfluss eines Karzinoms nicht

CXCR4 ist ein Chemokinrezeptor für SDF-1 (*stromal-derived-factor-1*) und vor allem auf aktivierten T-Zellen zu finden. SDF-1 wirkt auf die Lymphozyten stark chemotaktisch. Eine andere physiologische Funktion des SDF-1 ist, dass unter seinem Einfluss hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark verbleiben. Umgekehrt werden experimentell zur Mobilisation von Stammzellen CXCR4 Rezeptor Blocker eingesetzt. Für verschiedene Tumore wie Prostatakarzinom, Mammakarzinom und Melanom konnte gezeigt werden, dass eine starke Expression von CXCR4 im Tumor mit einer verstärkten Metastasierung und Invasivität in das umliegende Gewebe einhergeht, dieser Effekt konnte im Tierversuch durch CXCR4 Blocker vermindert werden (Darash-Yahana et al., 2004). Wir wollten untersuchen, ob CXCR4 auch beim Plattenepithelkarzinom eine ähnliche Bedeutung zukommt, allerdings fanden wir auf den peripheren Lymphozyten der Patienten eine ähnlich starke Expression von CXCR4 wie in der gesunden Kontrollgruppe (siehe Abb. 4.1.17).

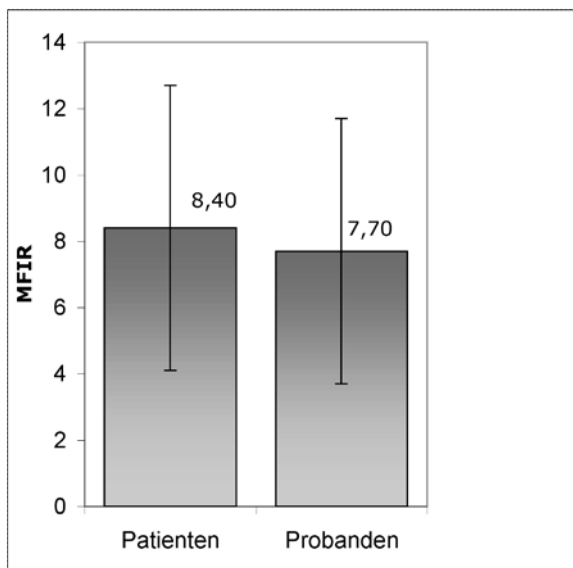


Abbildung 4.1.17: Lymphozyten von Tumorpatienten exprimieren in etwa gleich viel CXCR4 wie Lymphozyten von gesunden Probanden.

4.1.3.2 Die CCR1 Expression auf den Monozyten verändert sich unter dem Einfluss eines HNSCC nicht

Der Chemokinrezeptor CCR1 ist auf Monozyten und auf Lymphozyten, die zuvor durch IL-2 stimuliert wurden. Liganden sind MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein*), RANTES und MCP-3 (*monocyte chemoattractand protein*), durch die Bindung wird zielgerichtete Migration vermittelt (Luster, 1998). CCR1 wurde wie auch CCR5 zuerst bekannt als HIV-Korezeptor. Im Vergleich von Monozyten von Tumorpatienten und Monozyten von Gesunden war der CCR1 Chemokinrezeptor in beiden Gruppen in etwa gleich viel vorhanden (siehe Abb. 4.1.18).

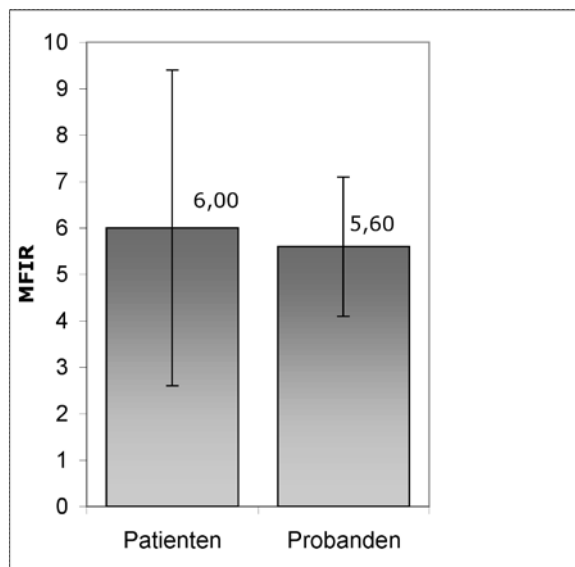


Abbildung 4.1.18: Monozyten von HNSCC-Patienten exprimieren in etwa genauso viel CCR1 wie Monozyten von Probanden.

Hier kann die erste Frage beantwortet werden:

Welche Oberflächenmoleküle sind bei Leukozyten von HNSCC-Patienten vermindert oder verstärkt exprimiert im Gegensatz zu Leukozyten von gesunden Probanden?

Die Antwort ist in folgender Tabelle zusammengefasst:

	Lymphozyten	Granulozyten	Monozyten
CCR5			↓
CD14		↓	↓
CD16		↓	
CD16b		↓	
CD3	↓		
CD11b	=		↓
CD25	=		↓
CD56	↓		
CXCR4	=		
CCR1			=

Tabelle 8: Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten von Tumorpatienten zeigen eine im Vergleich zu Leukozyten von gesunden Probanden weniger (↓) oder in etwa gleich (=) starke Expression der Oberflächenmoleküle.

4.2 Funktion

Bisher hatten wir die Oberflächenmoleküle auf den Zellen nachgewiesen und dabei deutliche Unterschied zwischen den Leukozyten von gesunden Probanden und denen von Tumorpatienten nachgewiesen (siehe Tab. 8). Wir hatten den Phänotyp der Zellen untersucht. Von größerer Bedeutung ist allerdings, ob sich dadurch die Funktion der Zelle verändert. Da wir eine deutlich geringere CCR5-Expression auf den Monozyten von Tumorpatienten gefunden hatten, und dieser Chemokinrezeptor für die Migration der Monozyten ins Gewebe notwendig ist, haben wir die Monozytenmigration von Tumorpatienten im funktionellen Test untersucht.

4.2.1 Monozyten von HNSCC-Patienten sind in der Migration deutlich eingeschränkt

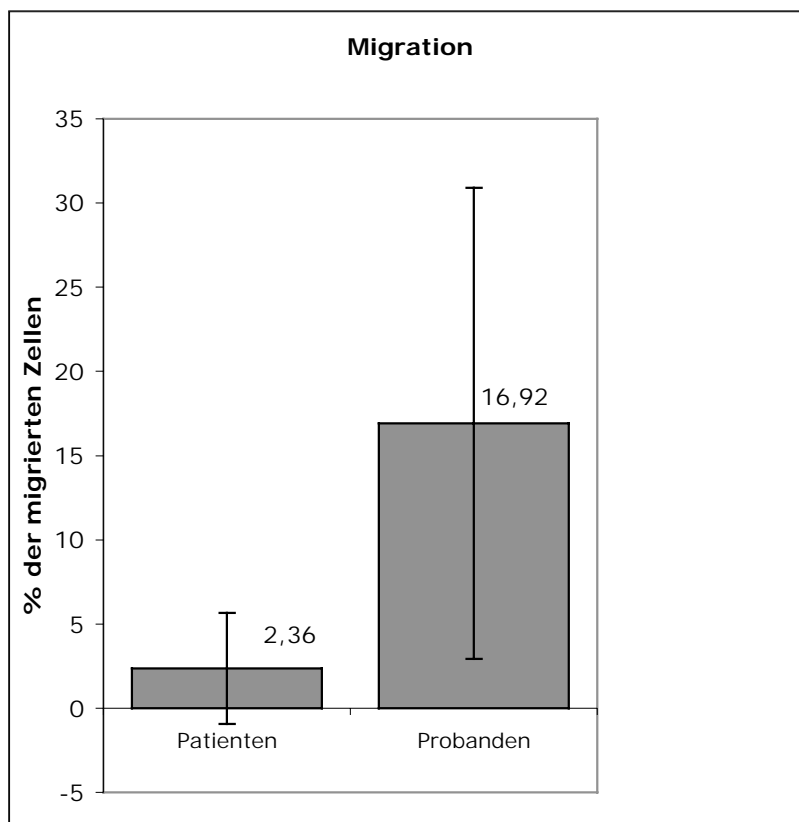


Abbildung 4.2.1 Fast 17% der Monozyten von gesunden Spendern waren zur zielgerichteten Migration fähig. Ein deutlich geringeres Migrationspotential wiesen Monozyten von HNSCC-Patienten auf, nur 2,3% der Monozyten reagierten auf den chemotaktischen Reiz und überwand den Filter. Das entspricht einer Reduktion der normalen zielgerichteten Migration um 86%.

Im funktionellen Test zeigte sich, dass Monozyten von HNSCC-Patienten deutlich weniger auf den chemokinen Reiz MIP-1 β (*macrophage inflammatory protein*), den Liganden für den Chemokinrezeptor CCR5, reagierten (siehe Abb. 4.2.1). Von den 10⁶ eingesetzten Monozyten waren nur 2,3% in der Lage, den Filter zu überwinden. Im Vergleich zeigten nur rund 14% der Monozyten, die bei gesunden Probanden reagieren, eine zielgerichtete Migration. Dieser Unterschied ergab in der statistischen Auswertung eine deutliche Signifikanz, $p = 0,0007$.

4.3 Studie und Studienergebnisse

Im ersten Teil waren sowohl die Leukozyten von gesunden Probanden als auch die Leukozyten von HNSCC-Patienten phänotypisch und auch funktionell untersucht worden. Dabei waren diejenigen Oberflächenmoleküle identifiziert worden, die in diesen beiden Gruppen eine unterschiedliche Expression aufweisen (siehe Tab. 8).

Aufbauend auf die Erkenntnisse unserer Arbeitsgruppe aus *in vitro* Versuchen, die gezeigt hatten, dass die Beeinträchtigung der Monozyten bei Tumorpatienten durch Cyclooxygenase 2 Inhibition reversibel ist, wollten wir durch eine klinische Studie testen, ob das auch *in vivo* zutrifft. Anhand der identifizierten Marker wie CCR5, deren Expressionsniveaus bei Gesunden und Tumorpatienten unterschiedlich waren, sollte der Erfolg der klinischen Studie gemessen werden, wobei als Erfolg die Wiederherstellung des „Normalzustandes,“ also eine Erhöhung von Expressionsniveaus zu werten war. Da in den vergleichenden Studien auch im funktionellen Test gravierende Unterschiede unter dem Einfluss eines Karzinoms aufgefallen war, sollte zusätzlich zur Morphologie auch die Funktion der Immunzellen getestet werden, anhand der Adhäsions- und Migrationsfähigkeit. Um festzustellen, ob die an peripheren Immunzellen und durch funktionelle Tests festgestellten Veränderungen auch tatsächlich im betroffenen Gewebe des Patienten stattfinden, sollten mit Hilfe der Immunhistochemie Gewebeschnitte untersucht werden.

4.3.1 Nach Cyclooxygenase 2-Inhibition *in vivo* zeigen Leukozyten von HNSCC-Patienten Veränderungen in der Expression von Rezeptoren

Wie oben beschrieben, wurden die an der Studie teilnehmenden Patienten in zwei Gruppen randomisiert. Eine Gruppe erhielt drei Wochen lang täglich die Studienmedikation Rofecoxib, die andere Gruppe erhielt keine Medikation. Der Ablauf ist hier noch einmal kurz skizziert.

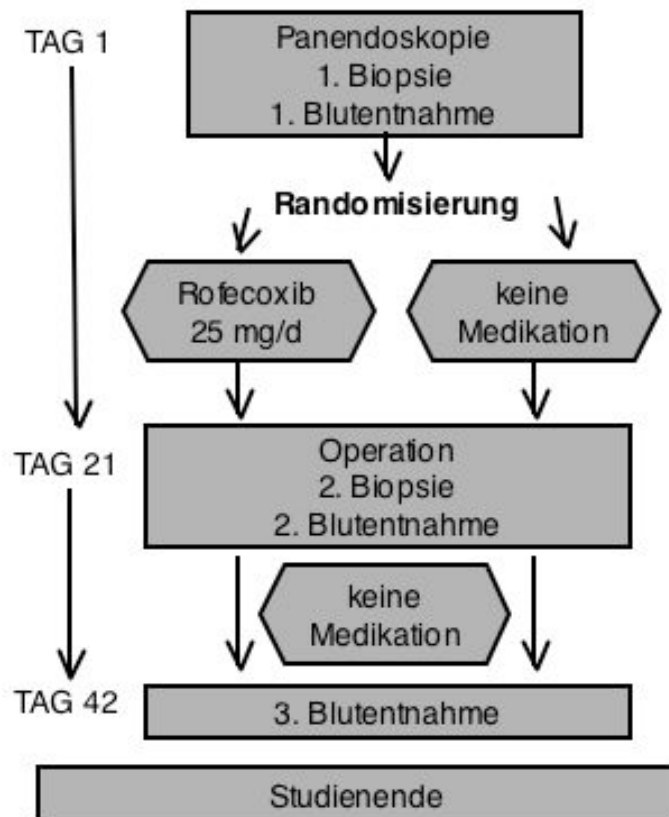


Abbildung 4.3.1: Die Skizze des Studienablaufs zeigt, dass jeweils an Tag 1 und Tag 21 Blutentnahmen stattfanden. Während dieser 3 Wochen wurde die eine Gruppe mit Rofecoxib behandelt und die andere nicht. So konnte der Einfluss der medikamentösen Cyclooxygenase 2-Inhibition auf die Expression von Oberflächenmolekülen *in vivo* gemessen werden.

Zunächst verglichen wir die im FACS bestimmte Expression von Oberflächenmolekülen auf den peripheren Leukozyten an Tag 1, also vor Einnahme der Studienmedikation, mit der an Tag 21, also nach 3-wöchiger Einnahme von Rofecoxib bzw. ohne Studienmedikation in der Kontrollgruppe. Da äußere Einflüsse der beiden Gruppen nur in der Einnahme von Rofecoxib verschieden waren, können Unterschiede im Expressionsniveau von Rezeptoren mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die pharmakologische Cyclooxygenase 2-Inhibition zurückgeführt werden.

4.3.1.1 Normalisierung der Expression von Rezeptoren auf den Monozyten nach Cyclooxygenase 2-Inhibition

In der Gruppe, die Rofecoxib 3 Wochen lang eingenommen hatte, stiegen die im FACS ermittelten Werte für CCR5 deutlich an (siehe Abb. 4.3.2). Der Mittelwert an Tag 21 liegt mit 12 mfiir noch höher, als der zuvor bei gesunden Probanden ermittelte Wert von 9 mfiir (siehe Abb. 4.1.8). In der Gruppe ohne Medikation zeigte sich eine weitere Abnahme der Expression von CCR5 auf peripheren Monozyten innerhalb der drei Wochen.

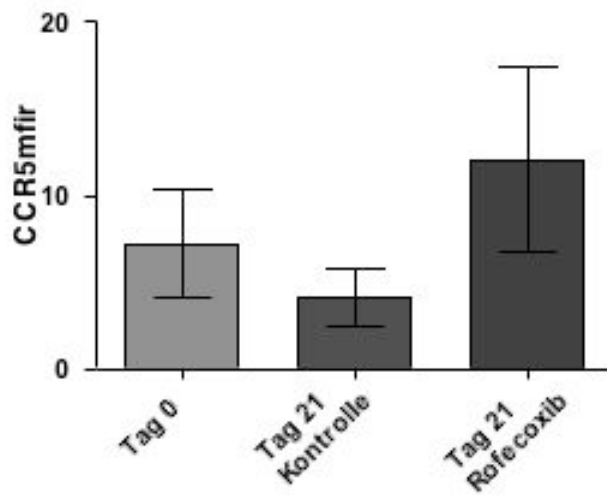


Abbildung 4.3.2 Monozyten von Tumorpatienten exprimieren nach 3-wöchiger in vivo Exposition mit Rofecoxib etwa 42% mehr CCR5 gemessen als mfiir als an Tag 0. Ohne Behandlung ergibt sich nach 3 Wochen hingegen eine Reduktion der CCR5 Expression um etwa 42%. Dieser Unterschied ist auch statistisch signifikant, $p = 0,002$.

Nach 3-wöchiger medikamentöser Cyclooxygenase 2-Inhibition war auf den Monozyten der Studienteilnehmer deutlich mehr CD14 Rezeptor als zuvor nachweisbar (siehe Abb. 4.3.3). In vorangehenden Tests haben wir auf Monozyten von gesunden Probanden durchschnittlich eine CD14 Expression von 334, gemessen als mflr, festgestellt (siehe Abb. 4.1.9). Auf den Monozyten der Studienteilnehmer in der Rofecoxib-Gruppe war an Tag 21 eine CD14 Rezeptordichte von 349 mflr messbar, d.h. ein Wert, der Gesunden entspricht. Somit war die bei Tumorpatienten reduzierte CD14 Expression auf den Monozyten durch Cyclooxygenase 2-Inhibition vollständig wieder herstellbar. In der Kontrollgruppe, die nicht behandelt und nur beobachtet wurde, zeigte sich in diesen 3 Wochen eine weitere Reduktion von CD14 auf den Monozyten, die wir nicht erklären können (siehe Abb. 4.3.3).

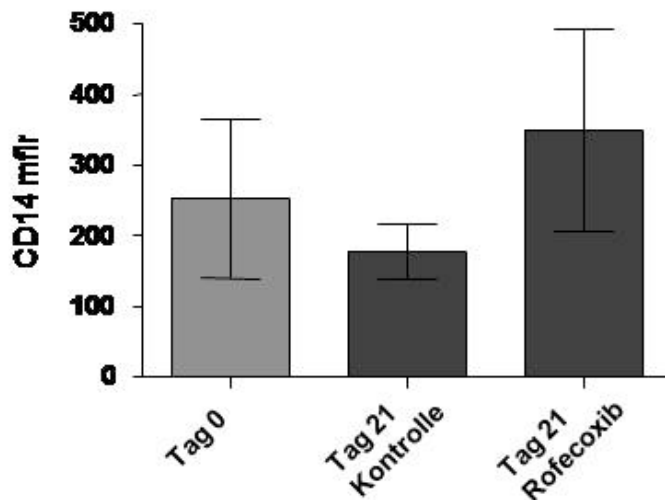


Abbildung 4.3.3 Monozyten von Tumorpatienten CD14 exprimieren nach Rofecoxib Behandlung wieder CD14 in der Menge wie Monozyten von Gesunden. Ohne Behandlung ist nach 3 Wochen noch weniger CD14 auf den Monozyten messbar als zu Beginn der Studie. Der Unterschied zwischen den beiden randomisierten Gruppen an Tag 21 ist statistisch signifikant ($p = 0,006$).

Monozyten von Tumorpatienten exprimieren nach Cyclooxygenase 2-Inhibition rund ein Drittel mehr des Fc γ RIII Rezeptor CD16, der antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) auslöst, als zu Studienbeginn (siehe Abb. 4.3.3). Auch hier sind der Wert an Tag 21 (96 mfi) und der bei Gesunden gemessene Wert für CD16 auf Monozyten (83 mfi) fast gleich, so dass von einer vollständigen Erholung der CD16 Rezeptordichte auf den Monozyten von Tumorpatienten durch den Einsatz des Cyclooxygenase 2-Inhibitors ausgegangen werden kann.

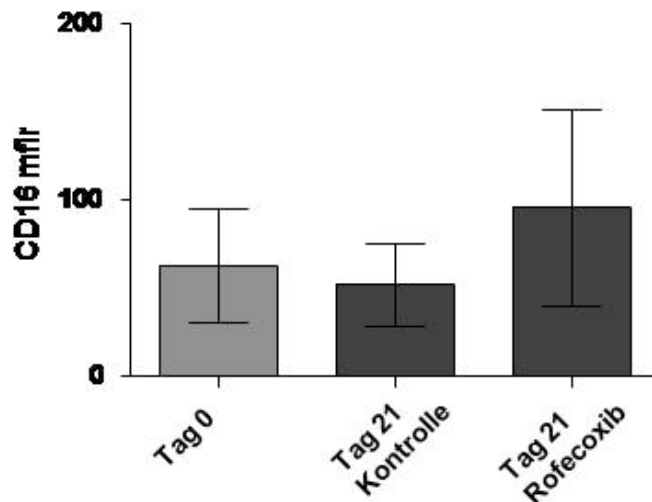


Abbildung 4.3.4 Die Expression von CD16 Rezeptoren auf Monozyten bei Tumorpatienten unterscheidet sich signifikant nachdem eine Gruppe Rofecoxib erhalten hat ($p = 0,01$). In der Rofecoxib-Gruppe wurde der Normalzustand bezüglich der CD16 Expression auf Monozyten wieder vollständig hergestellt, der Wert entspricht dem bei gesunden Probanden gemessenen Wert.

Die Expression des Chemokinrezeptors CCR1 auf Monozyten ist durch Hemmung der Cyclooxygenase 2 praktisch nicht beeinflussbar. In allen 3 untersuchten Gruppen – HNSCC-Patienten, Gesunde und HNSCC-Patienten nach Rofecoxib-Medikation – lag der Messwert zwischen 5 und 6 mfi_r (siehe Abb. 4.1.18 und 4.3.5).

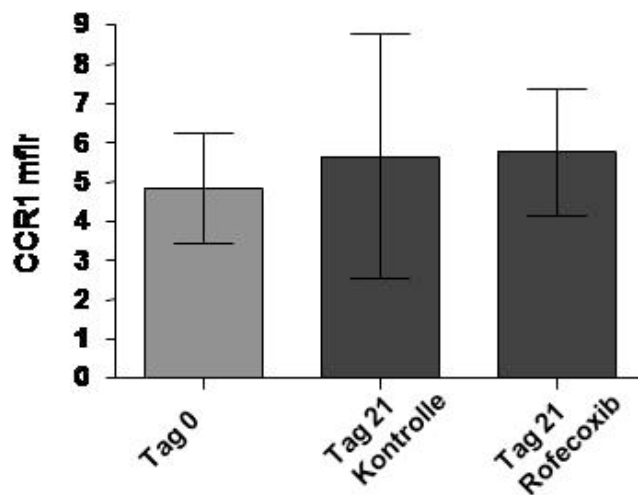


Abbildung 4.3.5 Monozyten von Tumorpatienten zeigen unter Cyclooxygenase 2-Inhibition keine Veränderung der CCR1 Expression (p = 0,5).

4.3.1.2 Verbesserung der Expression von Oberflächenmolekülen auf den Granulozyten durch Cyclooxygenase 2-Inhibition

Granulozyten von HNSCC-Patienten weisen an ihrer Oberfläche nach Cyclooxygenase 2-Inhibition rund ein Drittel mehr des CD16 Oberflächenmoleküls auf als zuvor. Allerdings erreichen sie auch dann im Mittel nicht den bei Gesunden gemessenen Wert (644 mfir in der Rofecoxib-Gruppe *versus* 882 mfir bei gesunden Probanden) (siehe Abb. 4.1.11). Ohne Behandlung kommt es zu einer weiteren Herabregulation des CD16 Rezeptors um rund ein Drittel (siehe Abb. 4.3.6), den wir nicht erklären können. Im Vergleich zur Rofecoxib Behandlung ergibt sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,004$).

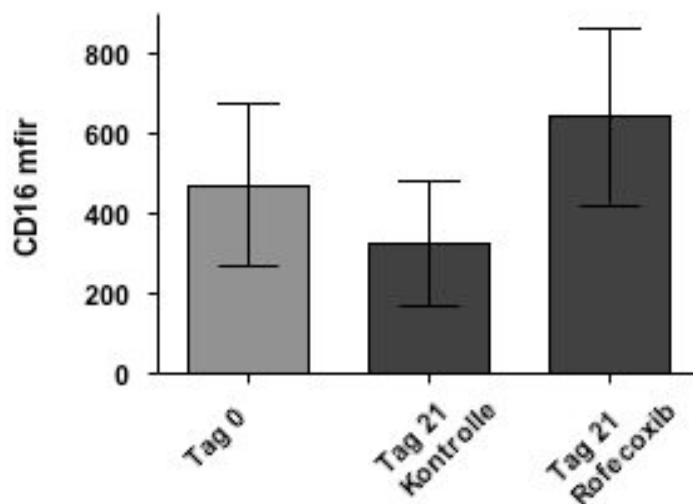


Abbildung 4.3.6 Cyclooxygenase 2-Inhibition wirkt der Herabregulation von CD16 auf Granulozyten von HNSCC-Patienten entgegen. Ohne Medikation ist nach 3 Wochen noch weniger CD16 Rezeptor nachweisbar als zu Beginn der Studie. Der Unterschied nach 3 Wochen ist statistisch signifikant, ($p = 0,004$).

Es ergibt sich ein ähnliches Bild, wenn man CD16b auf neutrophilen Granulozyten untersucht. CD16b ist genau wie CD16 der FC γ III Rezeptor, der auf Zellen gebundenes IgG erkennt, allerdings ist CD16b die GPI-verankerte Form des Rezeptors und nur auf neutrophilen Granulozyten vorhanden. Hier kommt es unter medikamentöser Cyclooxygenase 2-Inhibition zu einer um 10% gesteigerten CD16b Expression, in der Kontrollgruppe hingegen sinkt sie um etwa ein Viertel ab (siehe Abb. 4.3.6). Vollständig wird das Expressionsniveau, das wir bei gesunden Probanden gemessen haben (171 mfir) (siehe Abb. 4.1.12), allerdings auch mit Rofecoxib nicht erreicht (134 mfir).

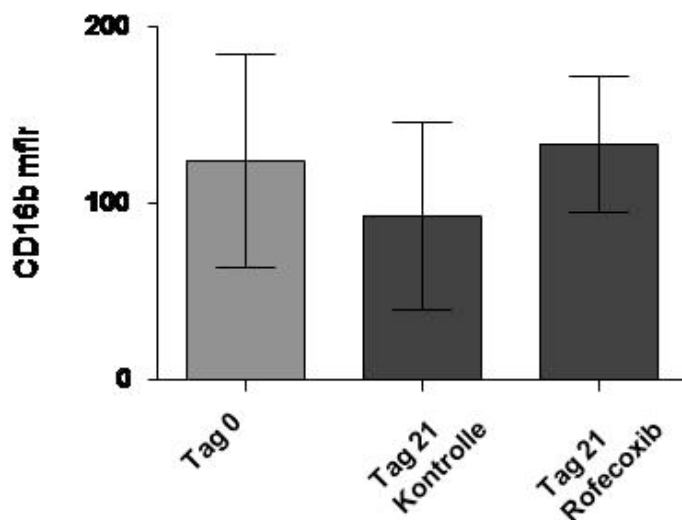


Abbildung 4.3.7 Neutrophile Granulozyten von Tumorpatienten in der Rofecoxib-Gruppe exprimieren nach 3 Wochen rund 10% mehr CD16b als zu Beginn der Studie. Im Gegensatz dazu kommt es in der Kontrollgruppe zu einer weiteren deutlichen Herabregulation von CD16b auf Granulozyten von mehr als einem Viertel des Ausgangswerts. Statistisch ergibt sich hier eine Signifikanz, $p = 0,01$.

4.3.1.3 Lymphozyten von HNSCC-Patienten zeigen in der Expression von Rezeptoren nur eine diskrete Reaktion auf Cyclooxygenase 2-Inhibition

Im Gegensatz zu den Monozyten exprimieren Lymphozyten von Tumorpatienten nach Medikation mit Rofecoxib knapp 10% mehr CCR1 an der Oberfläche, ohne Medikation sinkt die CCR1 Expression weiter um rund 15% ab (siehe Abb. 4.3.8).

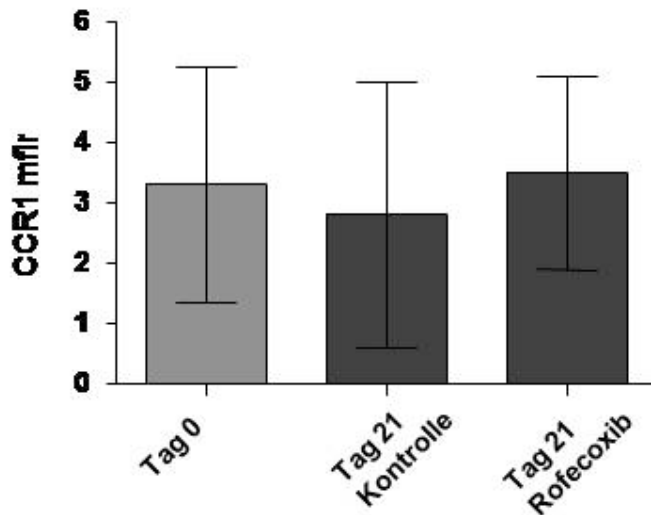


Abbildung 4.3.8: Lymphozyten von Tumorpatienten exprimieren nach Cyclooxygenase 2-Inhibition etwas verstärkt den Chemokinrezeptor CCR1. In der Kontrollgruppe ist CCR1 nach 3 Wochen noch weiter herabreguliert. Dieser Unterschied ist allerdings so gering, dass eine statistische Signifikanz nicht erreicht wird, $p = 0,2$.

An dieser Stelle kann die zweite Frage beantwortet werden:

Ist diese Expression bei HNSCC-Patienten durch medikamentöse Inhibition der Cyclooxygenase 2 *in vivo* beeinflussbar?

Ja. Die Veränderungen unter pharmakologischer Inhibition der Cyclooxygenase 2 sind in der folgenden Tabelle noch einmal zusammengefasst.

	Lymphozyten	Granulozyten	Monozyten
CD14			↑
CD16		↑	↑
CD16b		↑	
CCR1	↑		=
CCR5			↑

Tabelle 9: Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten exprimieren in den meisten Fällen verstärkt (↑) und in einem Fall unverändert (=) den entsprechenden Rezeptor. Diese verstärkte Expression geht wohl auf die Inhibition der Cyclooxygenase 2 zurück, da diese Veränderungen in der Kontrollgruppe nicht auftraten.

4.3.2 Postoperative Rezeptordichte gleicht denen gesunder Probanden

Da wir bei Tumorpatienten von einer Immunsuppression ausgehen, die vom Tumor selbst ausgeht, haben wir die Leukozyten der Studienteilnehmer auch 3 Wochen nach operativer Entfernung des Tumors untersucht. Postoperativ war in beiden Gruppen kein Rofecoxib mehr gegeben worden.

Die Expression von CCR5 auf den Monozyten der Patienten in der Rofecoxib-Gruppe ist unter medikamentöser Cyclooxygenase 2-Inhibition nach 3 Wochen um 38% stärker als an Tag 0 (siehe Abb. 4.3.9). In der Kontrollgruppe zeigt sich in diesem Zeitraum eine Herabregulation von CCR5 auf den Monozyten um 40%. Die 3 Wochen nach Entfernung des Tumors gemessenen Expressionsniveaus beider Gruppen nähern sich dem bei gesunden Probanden gemessenen Normalwert von 9,1 *mfir* an, was für eine Beeinträchtigung durch den Tumor selbst spricht, der inzwischen entfernt wurde. In der Rofecoxib-Gruppe ist zu diesem Zeitpunkt auch ohne medikamentöse Inhibition der Cyclooxygenase 2 der Normalzustand hinsichtlich der Expression des Chemokinrezeptors CCR5 auf den Monozyten bereits erreicht. Auch in der Kontrollgruppe ist dann schon wieder mehr CCR5 auf den Monozyten nachweisbar.

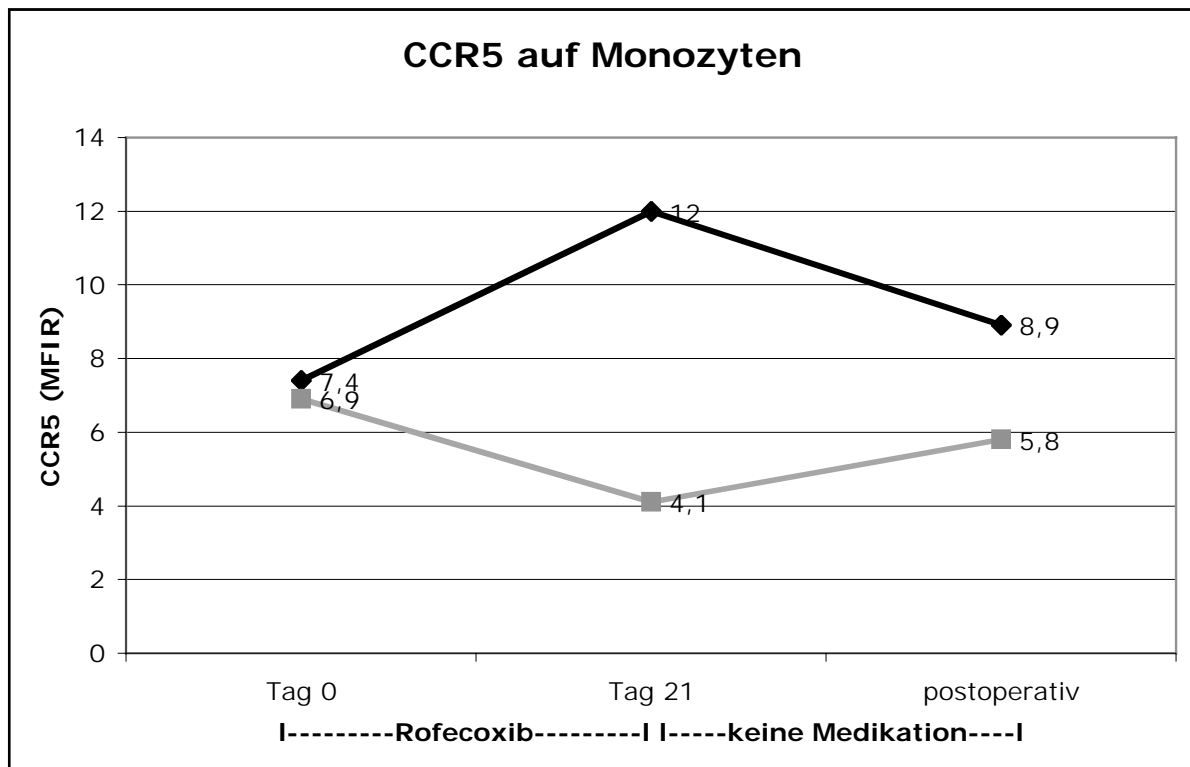


Abbildung 4.3.9: Die Medikation mit Rofecoxib als Inhibitor der Cyclooxygenase 2 führt bei HNSCC-Patienten zu einer deutlich stärkeren CCR5 Expression auf den Monozyten (schwarze Linie). In der Kontrollgruppe (graue Linie), die keine Medikation erhielt, ist der Chemokinrezeptor CCR5 nach 3 Wochen noch weiter herabreguliert als zu Beginn der Studie. Postoperativ ab Tag 21 wurde keine Medikation mehr gegeben. In der Gruppe, die zuvor Rofecoxib erhalten hatte, kommt es zu einem Absinken der Expression von CCR5 auf den Monozyten auf das Normalniveau, das wir bei gesunden Probanden gemessen hatten. In der Kontrollgruppe steigt nach Entfernung des Tumors die CCR5 Expression wieder an.

Wir hatten auf den Granulozyten von gesunden Probanden eine durchschnittliche Expression von CD16b von 172, gemessen als *mfir*, gefunden. Bei Tumorpatienten war die Expression deutlich geringer, nämlich im Mittel 122 *mfir* (siehe Abb. 4.1.12).

In der Studie ergab es sich leider so, dass die Expression von CD16b in den beiden randomisierten Gruppen bereits zu Beginn verschieden war. Wenn man allerdings nicht die absoluten Zahlen sondern die Herauf- bzw. Herabregulation von CD16b betrachtet, ergeben sich interessante Hinweise. Unter der Einnahme von Rofecoxib kommt es zu keiner entscheidenden Veränderung. Auch in der Kontrollgruppe ist die Expression nach 3 Wochen nicht wesentlich anders. Entscheidend scheint die Entfernung des Tumors zu sein. In der

Kontrollgruppe kommt es postoperativ zu einer Heraufregulation von CD16b um circa 50% (siehe Abb. 4.3.10). Das legt eine immunsuppressive Wirkung des Tumors selbst nahe. Die Patienten in der Rofecoxibgruppe erhielten postoperativ keine Medikation mehr. Hier kam es nach Entfernung des Tumors zu einer um circa 15% verminderten Expression von CD16b.

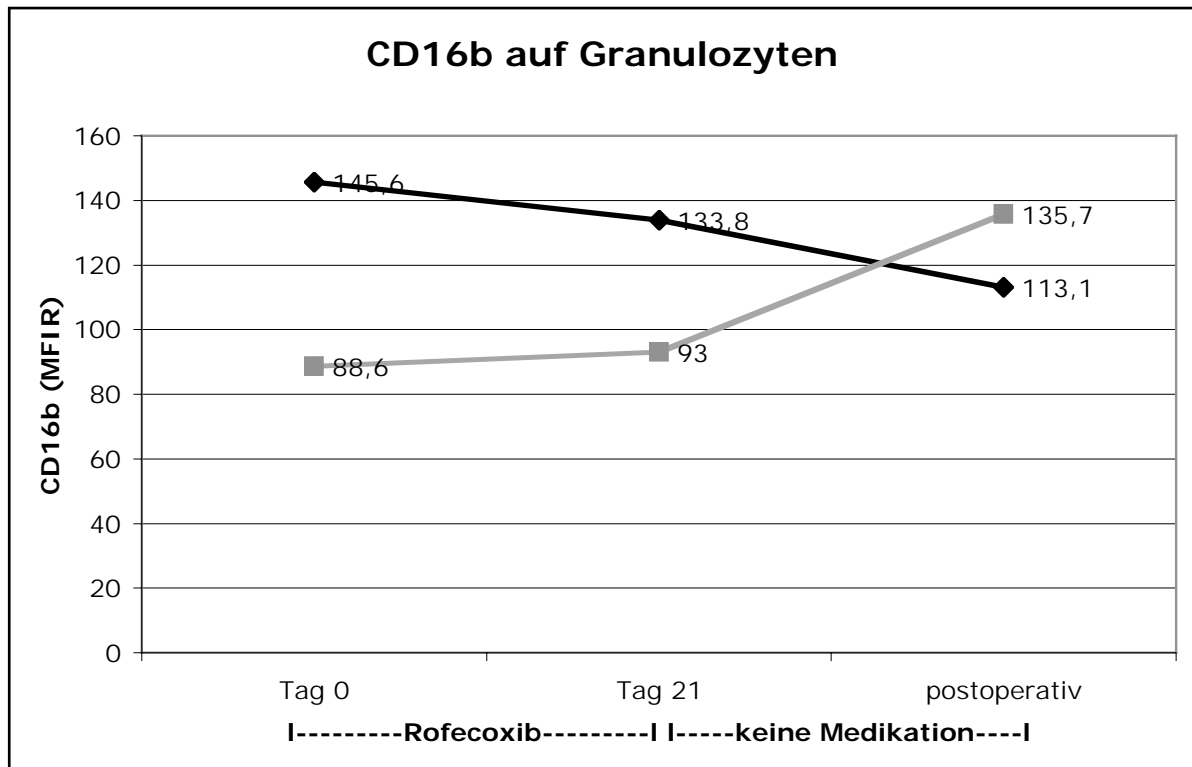


Abbildung 4.3.10: Unter medikamentöser Cyclooxygenase 2-Inhibition (schwarze Linie) kommt es nach 21 Tagen zu einer leicht verminderten Expression von CD16b auf den Granulozyten. Nach Entfernung des Tumors und ohne Medikation nimmt die Expression in dieser Gruppe noch weiter ab. In der Kontrollgruppe (graue Linie) zeigen die Granulozyten nach Entfernung des Tumors eine deutlich höhere Expression von CD16b als zu Beginn der Studie. Problematisch ist in diesem Versuch der Unterschied zwischen Rofecoxib- und Kontrollgruppe zu Beginn der Studie, der trotz Randomisierung aufgetreten ist.

4.3.3 Verbesserte Adhäsionsfähigkeit der Monozyten von HNSCC-Patienten nach Hemmung der Cyclooxygenase 2

Wir hatten eine Beeinflussung der Oberflächenmoleküle, die für die Funktion von Monozyten von Bedeutung sind, durch Inhibition der Cyclooxygenase 2 gefunden (siehe Tab. 8). Nun sollte in zusätzlichen Tests überprüft werden, ob diese Monozyten nach Inhibition der Cyclooxygenase 2 tatsächlich besser funktionieren. Vor der Migration in das Gewebe müssen Monozyten zunächst an der luminalen Seite des Endothels anheften, die Fähigkeit zur Adhäsion ist also Voraussetzung für eine zielgerichtete Migration der Monozyten und somit auch für die Ausreifung zu Makrophagen. Für die Adhäsion am Endothel ist auf den Monozyten CD11b notwendig. Gerade dieses Molekül war bei Tumorpatienten weniger vorhanden, weshalb auch die Adhäsion in einem funktionellen Test untersucht werden sollte. Bestimmt wurde die Adhäsionsfähigkeit der Monozyten an ICAM-1, das *in vivo* auf aktivierten Endothelzellen vorkommt, und in diesem Versuchsaufbau mittel Fusionsprotein an eine Kunststoffoberfläche gebunden werden konnte. Monozyten aus dem peripheren Venenblut wurden durch einen Ficollgradienten separiert und auf die vorbereitete Oberfläche gegeben. Nicht adhärenente Zellen wurden vorsichtig abgewaschen und die adhärenenten Zellen wurden nach Färbung ausgezählt (vgl. Methoden).

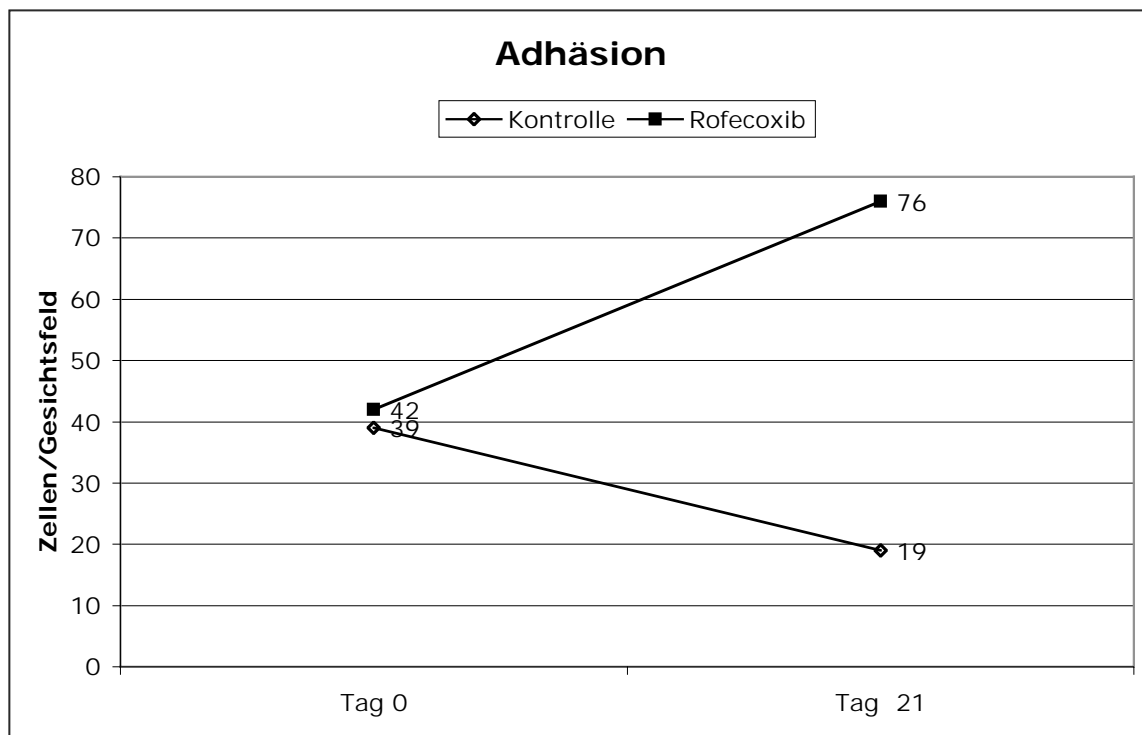


Abbildung 4.3.11: Monozyten von HNSCC-Patienten sind nach 3-wöchiger Cyclooxygenase 2-Inhibition verstärkt zur Adhäsion an ICAM-1 fähig, es handelt sich um eine Steigerung um circa 45% gegenüber dem Ausgangswert. In der Kontrollgruppe vermindert sich diese Fähigkeit innerhalb des Beobachtungszeitraums um rund die Hälfte. Dargestellt sind die Mittelwerte der beiden Kollektive.

Nach dreiwöchiger Behandlung mit Rofecoxib zeigen die Monozyten von HNSCC-Patienten eine deutlich bessere Adhäsion an ICAM-1 (siehe Abb. 4.3.11). Ohne Behandlung ist diese Fähigkeit nach 3 Wochen noch stärker eingeschränkt als bei der ersten Untersuchung, wobei die weitere Abnahme der Adhäsionsfähigkeit kaum durch äußere Einflüsse erklärt werden kann, so dass von einer fortschreitenden Beeinträchtigung der Monozytenfunktion vermutlich durch den Tumor selbst ausgegangen werden kann. Der Unterschied zwischen den beiden Kollektiven ist deutlich, jedoch mit $p = 0,07$ statistisch nicht signifikant.

4.3.4 Normalisierte Migration der Monozyten von HNSCC-Patienten nach Inhibition der Cyclooxygenase 2

Monozyten aus dem peripheren Venenblut wurden mittels Ficollgradient angereichert und auf einen Polycarbonatfilter gegeben, der eine Porengröße hat, die deutlich unter der Größe der Monozyten liegt. Auf der anderen Seite des Filters ist dem Medium das Chemokin MIP1 β zugesetzt, das *in vivo* lokal bei Entzündungsreaktionen gebildet wird und das an den Chemokinrezeptor CCR5 auf Monozyten bindet und damit eine zielgerichtete Migration in das Gewebe steuert. Als Kontrolle diente der gleiche Versuchsaufbau jedoch ohne den Zusatz des Chemokins. So konnte der Anteil an Monozyten bestimmt werden, der zielgerichtet migriert war und nicht zufällig den Filter überwunden hatte.

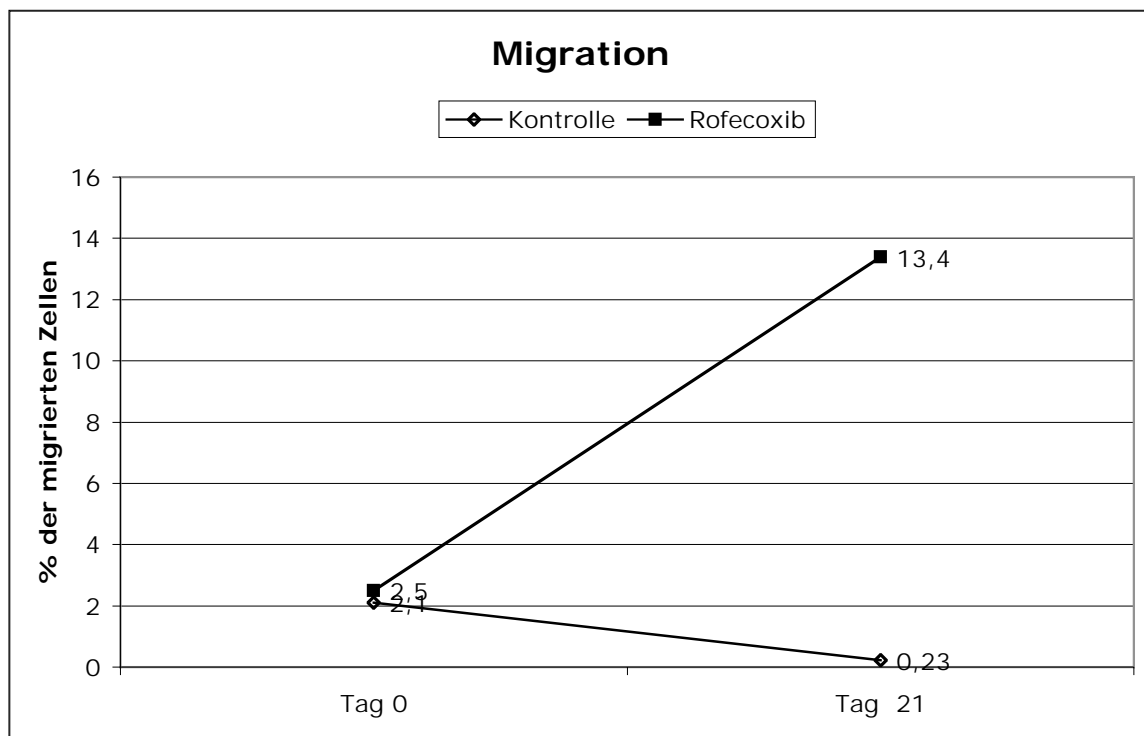


Abbildung 4.3.12 Nach Inhibition der Cyclooxygenase 2 ist die gerichtete Migration der Monozyten von HNSCC-Patienten durch eine Polycarbonatfilter im Gegensatz zum Studienbeginn mehr als 5-fach gesteigert. In der Kontrollgruppe verringert sich die zielgerichtete Migration der Monozyten auf fast ein 10-tel. Dargestellt sind die Mittelwerte der beiden Kollektive. Der Unterschied zwischen Rofecoxib- und Kontrollgruppe ist statistisch signifikant, $p = 0,02$.

Die Migrationfähigkeit der Monozyten von Tumorpatienten durch einen Polycarbonatfilter in Richtung auf das Chemokin MIP-1 β ließ sich durch Inhibition der Cyclooxygenase 2 deutlich steigern (siehe Abb. 4.3.12). Nach 21 Tagen erreicht das Migrationspotential fast den bei

gesunden Probanden gemessenen Wert von 16,9 % der migrierten Zellen (siehe Abb. 4.2.1). Ohne Behandlung zeigt sich die gleiche Tendenz wie im Adhäsionsversuch, es kommt zu einer zunehmenden Einschränkung auch der Migrationsfähigkeit.

Hier kann die dritte Frage beantwortet werden:

Ergibt sich dadurch eine Verbesserung der Funktion der Leukozyten?

Ja. In den zwei funktionellen Tests *ex vivo* konnten nach Inhibition der Cyclooxygenase 2 eine verstärkte Adhäsion und eine vollständig normalisierte Migration der Monozyten festgestellt werden. Die Monozyten sind also durch die Inhibition der Cyclooxygenase 2 wieder in der Lage, in ihr Zielgewebe zu gelangen.

4.3.5 Cyclooxygenase 2-Inhibition verstärkt das Tumoringfiltrat

Wir haben gesehen, dass es nach 3-wöchiger medikamentöser Inhibition der Cyclooxygenase 2 zu einer Wiederherstellung des Migrationvermögens (siehe Abb. 4.3.12) und einer deutlichen Zunahme der Adhäsionsfähigkeit der Monozyten von HNSCC-Patienten gekommen war (siehe Abb. 4.3.11). Nun sollte beurteilt werden, inwieweit die Immunzellen in der Lage sind, tatsächlich *in vivo* in ihr Zielgewebe, den Tumor, einzuwandern. Wie oben beschrieben, wurden bei jedem Studienteilnehmer zu zwei Zeitpunkten Gewebeproben des Tumors entnommen, einmal bei Diagnose des HNSCC, und das zweite Mal nach 3 Wochen Einnahme von Rofecoxib bzw. nach 3 Wochen ohne Medikation in der Kontrollgruppe (siehe Abb. 4.3.1). Mit Hilfe von Immunhistochemie wurden an den feingeweblichen Schnitten verschiedene Oberflächenmoleküle sichtbar gemacht und damit bestimmte Immunzellen identifiziert. Diese wurden ausgezählt und zur Vergleichbarkeit in ein Verhältnis zur Gesamtzellzahl gebracht. Es ergaben sich dabei wesentliche Unterschiede in der Anzahl der Immunzellen im Tumorgewebe in der Rofecoxib- bzw. der Kontrollgruppe. Da Monozyten/Makrophagen, wie zu Beginn beschrieben, eine große Bedeutung in der Elimination von Tumorzellen haben, interessierte uns zunächst, wie viele Zellen im Tumoringfiltrat CD68 exprimieren und so als Monozyten/Makrophagen identifiziert werden können (siehe Abb. 4.3.13).

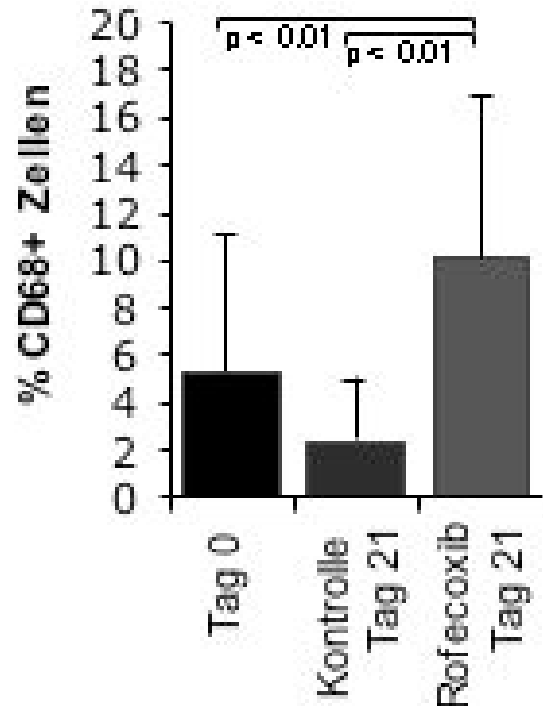


Abbildung 4.3.13 CD68-positive Zellen sind Monozyten/Makrophagen. Cyclooxygenase 2-Inhibition bewirkt nach 21 Tagen eine Verdoppelung der Anzahl der Monozyten/Makrophagen im Tumordinfiltrat. Ohne Therapie kommt es nach 21 Tagen zu einer Reduktion um circa die Hälfte.

CCR5 ist als Chemokinrezeptor für die zielgerichtete Migration von Monozyten zum Einsatzort im Gewebe notwendig. *In vitro* wurde bereits beobachtet, dass durch die vom Tumor ausgehende Prostaglandin E₂ Produktion eine Herabregulation von CCR5 bewirkt wird und dass diese durch Inhibition der Cyclooxygenase 2 vollständig reversibel ist (Zeidler et al., 2000). Das ließ sich nun durch unsere Studie auch *in vivo* bestätigen. Nach Cyclooxygenase 2-Inhibition exprimieren im Tumorgewebe mehr als doppelt so viele Zellen CCR5 wie in der ersten Gewebeprobe zu Beginn der Studie. In der Kontrollgruppe dagegen ist nach 3 Wochen die Anzahl der CCR5 tragenden Zellen halbiert (siehe Abb. 4.3.14). Die statistische Auswertung ergibt einen signifikanten Unterschied der beiden Gruppen.

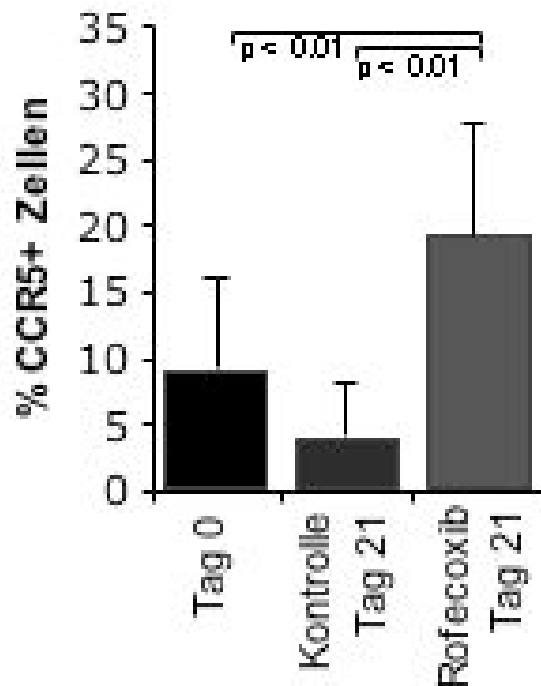


Abbildung 4.3.14 Doppelt so viele Zellen im Tumorgewebe wie zu Beginn der Studie exprimieren nach 3-wöchiger medikamentöser Inhibition der Cyclooxygenase 2 den Chemokinrezeptor CCR5. In der Kontrollgruppe ist dieser Anteil um circa die Hälfte gefallen.

Im Vergleich der beiden vorigen Diagramme (Abb. 4.3.13 und 4.3.14) fällt die Diskrepanz zwischen CD68-positiven (10,4%) und CCR5-positiven Zellen (19,6%) auf. Abgesehen von Monozyten/Makrophagen kommt CCR5 nur noch auf Th 1Helferzellen vor (Loetscher et al., 1998). Daraus ergibt sich, dass durch Cyclooxygenase 2-Inhibition nicht nur die Anzahl von CCR5 exprimierenden Monozyten/Makrophagen gesteigert, sondern auch die Anzahl von Th 1Helferzellen im Tumordinfiltrat von zuvor 4% auf 9% der Zellen mehr als verdoppelt wird.

Den CD4 Rezeptor findet man auf Th 1 und Th 2 Helferzellen und Monozyten/Makrophagen. CD4 ist der Korezeptor für die MHC-II vermittelte Antigen induzierte T-Zell Aktivierung. Dazu müssen antigenpräsentierende Zellen auf ihrem MHC-II Rezeptor fremdes Peptid präsentieren, welches so von der T-Zelle mit Hilfe von TCR und CD4 Rezeptor erkannt werden kann, was die Aktivierung der T-Zelle zur Folge hat. CD4 ist auch der Rezeptor für das inflammatorische Zytokin IL-16.

Nach Inhibition der Cyclooxygenase 2 bei HNSCC-Patienten sind immunhistochemisch nach 3 Wochen doppelt so viele CD4 positive Zellen nachweisbar wie zu Beginn der Studie. Im Gegensatz dazu ergibt sich in der Kontrollgruppe, die keine Medikation erhielt, nur eine sehr geringe Zunahme der CD4 positiven Zellen im Tumorgewebe (siehe Abb. 4.3.15).

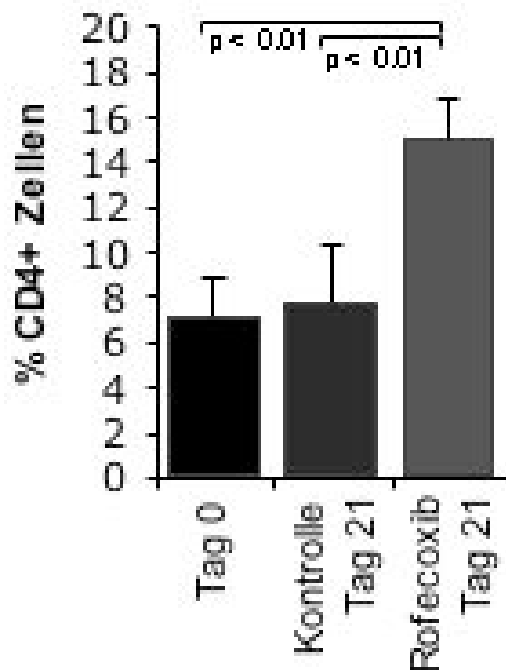


Abbildung 4.3.15 Nach Inhibition der Cyclooxygenase 2 über 21 Tage sind CD4-positive Zellen vermehrt im Tumorgewebe nachweisbar. In der Kontrollgruppe zeigt sich nur eine diskrete Veränderung. Der Unterschied zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe nach drei Wochen ist signifikant.

CD8 ist der Korezeptor auf zytotoxischen T-Zellen, der gemeinsam mit dem TCR MHC-I auf anderen Zellen erkennt. Durch MHC-I wird angezeigt, welche Proteine in dieser Zelle produziert werden. Zytotoxische T-Zellen können so erkennen, ob es sich um körpereigene Peptide handelt, dann erfolgt keine Reaktion, oder ob es sich um virale oder mutierte Peptide - aus Tumorzellen - handelt, diese Zellen werden zerstört. Unter Cyclooxygenase 2-Inhibition exprimieren mehr als doppelt so viele Zellen im Tumorgewebe CD8 wie zu Beginn der Studie, das bedeutet eine Verdoppelung der Anzahl von zytotoxischen T-Zellen im Tumorgewebe. Das ist ohne Behandlung nicht der Fall, hier kommt es nur zu einer diskreten Hochregulation (siehe Abb. 4.3.16). Dieser beobachtete Unterschied ist auch statistisch signifikant.

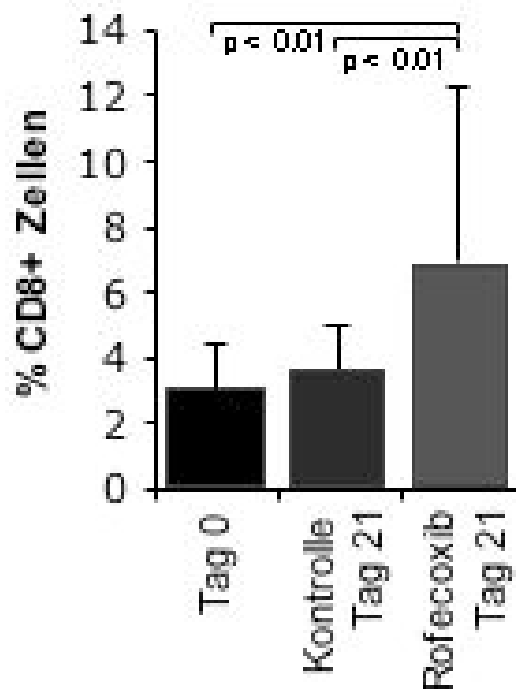


Abbildung 4.3.16 Nach 3 Wochen Behandlung mit Rofecoxib ist die Anzahl der CD8-positive Zellen im Tumorgewebe verdoppelt. Ohne Medikation in der Kontrollgruppe kommt es nur zu einer diskreten Hochregulation von CD25.

CD25 ist die α -Kette des IL-2 Rezeptors, der auf aktivierten T- und B-Zellen und Makrophagen/Monozyten zu finden ist. Da IL-2 eine zentrale Rolle bei der Auslösung einer adaptiven Immunantwort hat, wird CD25 als Teil des IL-2 Rezeptors als Aktivierungsmarker verwendet.

Nach Einnahme von Rofecoxib über 3 Wochen sind im Tumorgewebe rund 40% mehr Zellen CD25-positiv. In der Kontrollgruppe hat sich der Anteil an CD25-exprimierenden Zellen innerhalb der 3 Wochen verringert (siehe Abb. 4.3.17).

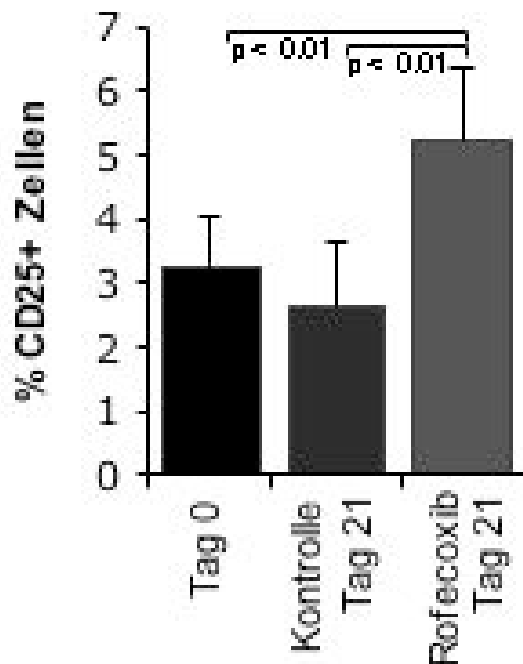


Abbildung 4.3.17 In der Gruppe, in der die Patienten Rofecoxib einnahmen, wies nach 3 Wochen ein deutlich höherer Anteil an Zellen im Tumorgewebe den IL-2 Rezeptor auf. In der Kontrollgruppe kam es dort zu einem weiteren Absinken der CD25-positiven Zellen.

An dieser Stelle kann die vierte Frage beantwortet werden:

Erreichen daraufhin tatsächlich mehr Immunzellen das Tumorgewebe?

Ja. Nach Inhibition der Cyclooxygenase 2 wurden immunhistochemisch mehr Monozyten/Makrophagen nachgewiesen, die auch verstärkt den Chemokinrezeptor CCR5 exprimierten. Es wurden mehr Th 1 Helferzellen, mehr zytotoxische T-Zellen und eine deutliche Steigerung des Aktivierungsmarkers CD25 nachgewiesen.

5 Diskussion

Tumorpatienten haben eine eingeschränkte Immunfunktion, das ist schon lange bekannt (Lundy et al., 1974; Vlock, 1991; Young et al., 1996). Dabei scheint bei vielen Tumorentitäten der Cyclooxygenase 2-Überexpression in den Tumorzellen eine zentrale Rolle in der Immunsuppression zuzukommen (Fosslien, 2000). Aus ihr resultiert eine übermäßige Prostaglandin E₂-Produktion, welche dann an verschiedenen Stellen im Immunsystem angreift. Prostaglandin E₂ behindert die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen, die Proliferation von T-Zellen und vermindert die Aktivität von NK-Zellen und Makrophagen, die für die Elimination von Tumorzellen von besonderer Bedeutung sind (Goodwin and Ceuppens, 1983; Yang et al., 2003). Für viele Tumorentitäten, darunter auch HNSCC wurde eine Cyclooxygenase 2-Überexpression im Tumor als negativer prognostischer Faktor beschrieben (Massano et al., 2006).

In der Literatur ist eine kanzeroprotektive Wirkung der regelmäßigen Einnahme von NSAR (nicht steroidalen Antiphlogistika), die die Cyclooxygenase 1 und 2 hemmen, beschrieben (Funkhouser and Sharp, 1995; Giovannucci et al., 1994; Thun et al., 1993). Um die Hypothese zu untersuchen, dass durch eine Inhibition der Cyclooxygenase 2 der Immunstatus verbessert werden kann (Harris et al., 2005), haben wir molekulare Marker auf der Oberfläche von Immunzellen identifiziert, deren Expressionsniveaus sich bei Tumorpatienten und Gesunden unterscheiden. Dazu eigneten sich beispielsweise der CD14 Rezeptor, der FcγIII Rezeptor CD16, das Adhäsionsmolekül CD11b und der Chemokinrezeptor CCR5; sie alle waren auf den Leukozyten von Tumorpatienten signifikant geringer exprimiert als bei gesunden Probanden. Da durch diese Rezeptoren Adhäsion, Migration, Phagozytose und Zytotoxizität vermittelt werden - wichtige Bausteine der Immunfunktion (Janeway, 2004) – ist die Herabregulation mit großer Wahrscheinlichkeit von tumorimmunologischer Bedeutung.

So sind Monozyten, die vermindert CCR5 exprimieren, in ihrer Funktion eingeschränkt, die Migration und Extravasation sind gestört (Springer, 1995), und die Fähigkeit, eine Infektion einzudämmen ist beeinträchtigt (Huffnagle et al., 1999; Zeidler et al., 2000; Zhou et al., 1998).

Auf neutrophilen Granulozyten hat der Fc γ III Rezeptor CD16 eine große Bedeutung für die zellvermittelte Zytotoxizität (Fossati et al., 2002), die für den Angriff auf Tumorzellen besonders wichtig ist. Eine Hochregulation des Fc γ III Rezeptor CD16 auf Monozyten und neutrophilen Granulozyten wird nachweislich durch bakterielles Antigen erreicht (Skinner et al., 2005), eine starke Expression dieses Rezeptors spricht also für eine Aktivierung und umgekehrt eine Herabregulation für eine Inaktivität dieser Zellen.

Durch Adhäsionsassay konnten wir belegen, dass Monozyten von Tumorpatienten nicht nur weniger CD11b exprimieren, sondern dass sich diese Minderexpression auch negativ auf die Adhäsion der Zellen an ICAM-1 auswirkt. Für den immunologischen Angriff auf den Tumor ist dieser Defekt besonders nachteilig, da aktivierte Monozyten durch ICAM-1 vermittelte Adhäsion gegen Tumore gelenkt werden und die Tumorzellen dadurch angreifbar werden (Bernasconi et al., 1991; Webb et al., 1991).

Um die Hypothese, dass eine Inhibition der Cyclooxygenase 2 den Immunstatus moduliert, *in vivo* „überprüfen“ zu können, haben wir eine klinische Studie durchgeführt. Nachdem HNSCC-Patienten kurzzeitig ein Cyclooxygenase 2-Inhibitor verabreicht wurde, konnte das Resultat dieser Maßnahme erstens an einem veränderten Phänotyp der Leukozyten, d.h. einer verstärkten Expression von Oberflächenmolekülen, zweitens an der Funktion der Leukozyten, die mittels Adhäsions- und Migrationsassay bestimmt wurde, und drittens im histologischen Präparat des Tumors an der Anzahl und Zusammensetzung der Immunzellen gemessen werden.

Wie wir zum Teil erwartet hatten, stellte sich in der Studie heraus, dass durch die pharmakologische Cyclooxygenase 2-Inhibition die zuvor niedrige Expression der ausgewählten Rezeptoren wieder stärker geworden war. Überraschend war, dass die beobachtete Hochregulation in den meisten Fällen das Expressionsniveau erreichte, das wir bei gesunden Probanden gemessen hatten.

Die klinische Studie ergab des Weiteren, dass sich die zuvor nur geringe Adhäsion der Monozyten von HNSCC-Patienten durch Cyclooxygenase 2-Inhibition wesentlich steigern lässt und so für den immunologischen Angriff auf den Tumor günstige Verhältnisse geschaffen werden (Bernasconi et al., 1991; Webb et al., 1991).

In unserer Arbeitsgruppe war bereits anhand der Migration der Monozyten von Tumorpatienten und gesunden Probanden nach Inkubation in allogenen bzw. autologen Serum eine deutliche Einschränkung der Migration durch Serum-Prostaglandin E₂ festgestellt worden, die sich durch Cyclooxygenase-Inhibition mit NSAR *in vitro* beheben ließ (Zeidler et al., 2000).

In der hier vorgestellten Studie wurde dieses Defizit nun durch pharmakologische Inhibition der Cyclooxygenase 2 *in vivo* behoben. Es kam zu einer normalisierten Expression von CCR5 und einer Wiederherstellung der zielgerichteten Migration auf das Niveau eines Gesunden.

Für eine erfolgreiche Immunreaktion gegen den Tumor ist es ohne Zweifel notwendig, dass Immunzellen den Tumor infiltrieren, Tumor-assoziierte Antigene (TAAs) präsentieren und so weitere Immuneffektorzellen aktivieren (Janeway, 2004). In unserer Studie wurde durch die pharmakologische Cyclooxygenase 2-Inhibition das Tumordinfiltrat deutlich verstärkt. Es konnten anschließend signifikant mehr Makrophagen anhand des CD68 Moleküls im Tumorgewebe identifiziert werden als vor dieser Medikation. Beim Melanom weiß man, dass Cyclooxygenase 2-Inhibition die Makrophagenfunktion im Sinne eines immunologischen Angriffs auf den Tumor verbessert (Duff et al., 2003). Die Makrophagen, denen durch die Cyclooxygenase 2-Inhibition die Migration in den Tumor gelungen ist, sind im Gegensatz zu Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs) nicht vom Tumor „umprogrammiert,“ sondern in ihrer Funktion intakt. TAMs werden so vom Tumor beeinflusst, dass sie ihre Funktion verlieren und durch die verminderte Sekretion von IL-12 und eine gesteigerte Sekretion von Prostaglandin E₂, TGF-β und IL-10 selbst immunsuppressiv wirken (Biswas et al., 2006; Elgert et al., 1998; Huang et al., 1998), was zumindest im Fall von Prostaglandin E₂ durch Cyclooxygenase 2-Inhibition aufgehoben werden kann.

Anhand der histologischen Präparate wiesen wir nach Cyclooxygenase 2-Inhibition nicht nur vermehrt Monozyten/Makrophagen sondern auch CD4⁺ T-Helferzellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen im Tumor nach. Die CD4⁺ Zellen waren in der Mehrzahl Th1 Zellen, da sie ebenfalls CCR5⁺ waren (Loetscher et al., 1998). Mehrere Studien haben die Expression von Th1 Zytokinen in Verbindung gebracht mit einem besseren klinischen Verlauf, umgekehrt werden Th 2 Zytokine mit einer schlechteren Prognose assoziiert (De Vita et al., 2000; Elsasser-Beile et al., 1998; Lauerova et al., 2002; Mori et al., 2001; Wittke et al., 1999). Im Mausmodell für das Bronchialkarzinom wurde durch den Einsatz eines Cyclooxygenase 2-

Inhibitors eine verstärkte lymphozytäre Infiltration des Tumors verzeichnet, verbunden mit einer signifikanten Abnahme von IL-10 und einer Wiederherstellung der IL-12 Sekretion durch antigenpräsentierende Zellen (Stolina et al., 2000). Die anti-neoplastische Wirkung von Cyclooxygenase 2-Inhibitoren lässt sich also möglicherweise durch die verstärkte Infiltration von Th1-Helferzellen erklären.

Durch die nach pharmakologischer Cyclooxygenase 2-Inhibition nachgewiesene Steigerung der Infiltration des Tumors mit CD8+ zytotoxischen T-Zellen ist ein tumorimmunologischer Vorteil anzunehmen. Für das Endometriumkarzinom konnte gezeigt werden, dass es durch die Cyclooxygenase 2-Überexpression zu einer Verminderung der Infiltration des Tumors mit CD8+ zytotoxischen T-Zellen kommt, dagegen wurde eine verstärkte Infiltration durch CD8+ Zellen mit einem Überlebensvorteil in Verbindung gebracht (Ohno et al., 2005).

Zusätzlich haben wir nach Cyclooxygenase 2-Inhibition beobachtet, dass die Mehrzahl der T-Lymphozyten im Tumoringfiltrat aktiviert ist, sichtbar an der Expression des Aktivierungsmarkers CD25, einem Teil des IL-2 Rezeptors. Eine starke Aktivität der zellulären Immunreaktion, gemessen an der Anzahl der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten, scheint bei vielen Tumorentitäten ein entscheidender Faktor für einen günstigen Verlauf der Erkrankung zu sein. Für das Mammakarzinom konnte eine lymphozytäre Infiltration des Tumors mit einer günstigen Prognose in Verbindung gebracht werden (Marrogi et al., 1997). Auch beim Kolonkarzinom werden Lymphozyten im Tumoringfiltrat als prognostisch günstig betrachtet (Ropponen et al., 1997). Das Gleiche konnte für das Ösophaguskarzinom nachgewiesen werden (Morita et al., 2001), wobei der vermehrte Nachweis von aktivierten CD8+ zytotoxischen T-Zellen sich als besonders gut erwies (Schumacher et al., 2001). Für das großzellige B-Zell-Lymphom dagegen konnte der Infiltration mit CD4+ T-Helferzellen eine günstige prognostische Bedeutung nachgewiesen werden (Ansell et al., 2001).

Zusammenfassend ist es durch die hier vorgestellte Studie gelungen, einen in verschiedenen Bereichen günstigen Einfluss einer pharmakologischen Inhibition der Cyclooxygenase 2 bei HNSCC-Patienten nachzuweisen. Alle hier untersuchten Zeichen der Tumor-bedingten Immunsuppression wurden vollständig aufgehoben.

Die verminderten Rezeptorexpressionen ließen sich durch Medikation mit einem Cyclooxygenase 2-Inhibitor vollständig beheben, so dass ein „gesundes“ Expressionsniveau erreicht werden konnte. In Adhäsion und Migration wurde ebenso ein „gesundes“ Ausmaß

erreicht.

Bemerkenswert ist, dass so ein Effekt sich bisher erst nach operativer Entfernung des Tumors einstellte (Klapan et al., 1992), wie wir es auch für die Kontrollgruppe in der Studie zeigen konnten (siehe Abb. 4.3.9). Das bedeutet, dass die Immunsuppression, die wir anhand von veränderten Phänotypen und Funktionen gemessen haben, vom Tumor ausgeht. Und es zeigt, dass Cyclooxygenase 2-Inhibition diese Immunsuppression, zumindest partiell, aufheben kann. Tatsächlich attackieren dann mehr Leukozyten in tumorimmunologisch günstiger Konstellation das Tumorgewebe.

Angemerkt werden muss allerdings gerade beim HNSCC, dass mit Sicherheit eine Änderung des Risikoverhaltens bezüglich Rauchen und Alkoholkonsum wünschenswert ist. Der bessere Weg in jeglicher Hinsicht ist nicht eine bessere Behandlung sondern eine Vermeidung der Erkrankung, da bekanntlich die Entstehung von HNSCC ganz erheblich durch die Noxen Tabakrauch und Alkohol begünstigt wird (Hashibe et al., 2007; Talamini et al., 2002). So konnte in der Mundschleimhaut von Rauchern bereits eine verstärkte Expression der Cyclooxygenase 2 nachgewiesen werden (Moraitis et al., 2005). Die Prävention von HNSCC birgt somit noch viel Potential, das aber bekanntermaßen schwer erreichbar ist.

Die Tatsache jedoch, dass Plattenepithelkarzinome an verschiedenen Organen im Körper vorkommen, bekräftigt die Bedeutung eines besseren Verständnisses von HNSCC.

Die Verwendung eines Cyclooxygenase 2-Inhibitors muss wegen seiner kardiovaskulären Risiken kritisch betrachtet werden. Rofecoxib (Vioxx©) wurde in der hier vorgestellten Studie als zugelassenes Präparat verwendet, ohne dass es hier zu Nebenwirkungen oder Schädigungen kam. Inzwischen ist Rofecoxib jedoch wegen einer signifikanten Zunahme von Myokardinfarkten vom Markt genommen worden. Die Ursache der prothrombotischen Wirkung wurde zunächst im moderaten Blutdruckanstieg vermutet, der durch Cyclooxygenase 2-Inhibitoren verursacht wird (Salzberg and Weir, 2007), was allerdings nicht den Unterschied zwischen Rofecoxib und den anderen Cyclooxygenase 2-Inhibitoren erklärt. Inzwischen wurde berichtet, dass Rofecoxib eine Veränderung des LDL (*low density lipoprotein*) hervorruft, so dass dessen atherogene Wirkung noch verstärkt wird (Mason et al., 2006).

In der Medizin kommt es häufig zu der Situation, dass ein bestimmtes Medikament für einen Patienten nicht generell empfohlen werden kann, sondern eine Abwägung von Nutzen und Risiken für den einzelnen Patienten getroffen werden muss. Andere Cyclooxygenase 2-

Inhibitoren als Rofecoxib sind verfügbar, von schwerwiegenden Nebenwirkungen wurde nicht berichtet. In der Abwägung von tumorimmunologischem Nutzen und möglichem kardivaskulärem Schaden sollte meines Erachtens nach sorgfältiger Vorbereitung, die das Erheben eines Risikoprofils bezüglich kardiovaskulärer Erkrankung und gegebenenfalls entsprechende Untersuchungen (diagnostischer Herzkatheter) einschließt, ein Cyclooxygenase 2-Inhibitor für ausgewählte HNSCC-Patienten wirksamer Teil einer Therapie sein. Bei Hochrisikopatienten mit einer ungünstigen Prognose könnte der Einsatz eines Cyclooxygenase 2-Inhibitors trotz eines verbleibenden geringen Risikos für Myokardinfarkt gerechtfertigt sein. Auch ein Einsatz zur Rezidivprophylaxe bei Patienten ohne jegliches kalkulierbare kardiovaskuläre Risiko (Nichtraucher, Sportler, junge Patienten) könnte Vorteile bringen.

Langzeitstudien zu diesem Vorgehen, wie es sie für das Mammakarzinom inzwischen gibt (Arun and Goss, 2004), sind wünschenswert und können beantworten, ob es durch die vom Cyclooxygenase 2-Inhibitor hervorgerufenen immunologisch viel versprechenden Veränderungen auch zu einer verringerten Rezidivrate und schließlich zu einem Überlebensvorteil kommt.

6 Zusammenfassung

Bei Patienten mit HNSCC kommt es durch die Überexpression von Cyclooxygenase 2 in Tumorzellen lokal zu einer hohen Prostaglandin E2 Konzentration, das immunsuppressiv wirkt und so verhindert, dass Tumorzellen vom Immunsystem detektiert und vernichtet werden können. Mit Hilfe einer klinischen Studie sollte die Hypothese überprüft werden, dass sich durch eine pharmakologische Inhibition der Cyclooxygenase 2 der Immunstatus dieser Patienten verbessern lässt. Dazu wurden geeignete molekulare Marker auf der Oberfläche von Leukozyten identifiziert, die bei Tumorpatienten deutlich weniger exprimiert waren als bei Gesunden. Bei Aufnahme in die Studie wurden den Patienten mit HNSCC Venenblut und eine Gewebeprobe des Tumors entnommen. Anschließend nahmen die Patienten drei Wochen lang einen Cyclooxygenase 2-Inhibitor ein. Am Tag der Operation wurden erneut Venenblut und eine zweite Gewebeprobe entnommen. Mittels Durchflusszytometrie konnte nach pharmakologischer Cyclooxygenase 2-Inhibition eine deutliche Zunahme der zuvor herabregulierten Oberflächenmoleküle auf den Leukozyten dokumentiert werden. In den meisten Fällen wurde sogar das Expressionsniveau von Gesunden erreicht; das ist sonst erst nach Entfernung des Tumors der Fall. Auch in den funktionellen Tests konnte der förderliche Effekt der Hemmung der Cyclooxygenase 2 festgestellt werden; die Leukozyten wiesen eine wesentlich verbesserte Adhäsion und eine vollständig normalisierte zielgerichtete Migration auf. In der Kontrollgruppe, die keine Medikation erhalten hatte, blieben diese Veränderungen aus. Mit Hilfe der Immunhistochemie wurden die Tumorgewebe untersucht und die Anzahl und Zusammensetzung der Tumor-infiltrierenden Leukozyten bestimmt. Es konnte eine starke Zunahme des monozytären und des lymphozytären Infiltrats nachgewiesen werden, was für andere Tumorentitäten als prognostisch günstig beschrieben wurde. Außerdem wurde eine für den Angriff auf den Tumor notwendige Verschiebung hin zu einer Th 1 Immunantwort beobachtet. Insgesamt haben sich nachweislich durch die pharmakologische Inhibition der Cyclooxygenase 2 tumorimmunologisch viel versprechende Veränderungen eingestellt. Diese Untersuchungen geben Grund zu der Annahme, dass die Immunsuppression vom Tumor ausgeht und durch Inhibition der Cyclooxygenase 2, zumindest teilweise, die Immunfunktion saniert werden kann.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

- Ansell, S.M., Stenson, M., Habermann, T.M., Jelinek, D.F. and Witzig, T.E. (2001) Cd4+ T-cell immune response to large B-cell non-Hodgkin's lymphoma predicts patient outcome. *J Clin Oncol*, **19**, 720-726.
- Arun, B. and Goss, P. (2004) The role of COX-2 inhibition in breast cancer treatment and prevention. *Semin Oncol*, **31**, 22-29.
- Baggiolini, M. and Loetscher, P. (2000) Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol Today*, **21**, 418-420.
- Basoni, C., Nobles, M., Grimshaw, A., Desgranges, C., Davies, D., Perretti, M., Kramer, I.M. and Genot, E. (2005) Inhibitory control of TGF-beta1 on the activation of Rap1, CD11b, and transendothelial migration of leukocytes. *Faseb J*, **19**, 822-824.
- Bernasconi, S., Peri, G., Sironi, M. and Mantovani, A. (1991) Involvement of leukocyte (beta 2) integrins (CD18/CD11) in human monocyte tumoricidal activity. *Int J Cancer*, **49**, 267-273.
- Biswas, S.K., Gangi, L., Paul, S., Schioppa, T., Saccani, A., Sironi, M., Bottazzi, B., Doni, A., Vincenzo, B., Pasqualini, F., Vago, L., Nebuloni, M., Mantovani, A. and Sica, A. (2006) A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood*, **107**, 2112-2122.
- Boenninghaus, H.-G., Lennarz, T. (2004) *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*, 12. Auflage, Springer Verlag, Berlin.
- Bosetti, C., Gallus, S. and La Vecchia, C. (2002) Aspirin and cancer risk: an update to 2001. *Eur J Cancer Prev*, **11**, 535-542.
- Burnet, F.M. (1971) Immunological surveillance in neoplasia. *Transplant Rev*, **7/1971**.
- Chandrasekharan, N.V., Dai, H., Roos, K.L., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S. and Simmons, D.L. (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 13926-13931.
- Chesla, S.E., Li, P., Nagarajan, S., Selvaraj, P. and Zhu, C. (2000) The membrane anchor influences ligand binding two-dimensional kinetic rates and three-dimensional affinity of FcgammaRIII (CD16). *J Biol Chem*, **275**, 10235-10246.
- Darash-Yahana, M., Pikarsky, E., Abramovitch, R., Zeira, E., Pal, B., Karplus, R., Beider, K., Avniel, S., Kasem, S., Galun, E. and Peled, A. (2004) Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. *Faseb J*, **18**, 1240-1242.
- De Vita, F., Orditura, M., Galizia, G., Romano, C., Lieto, E., Iodice, P., Tuccillo, C. and

- Catalano, G. (2000) Serum interleukin-10 is an independent prognostic factor in advanced solid tumors. *Oncol Rep*, **7**, 357-361.
- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R.E., Hill, C.M., Davis, C.B., Peiper, S.C., Schall, T.J., Littman, D.R. and Landau, N.R. (1996) Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*, **381**, 661-666.
- Desmedt, M., Rottiers, P., Dooms, H., Fiers, W. and Grooten, J. (1998) Macrophages induce cellular immunity by activating Th1 cell responses and suppressing Th2 cell responses. *J Immunol*, **160**, 5300-5308.
- Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, K.-u.H. (1999) Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie: Onkologie des Kopf-Hals-Bereichs. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AMWF).
- Deutsche-Krebsgesellschaft. (2002) Kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien, 3. Auflage: Karzinome des oberen Aerodigestivtrakts. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften.
- Devitt, A. (2003) CD14-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages: the role of phosphatidylserine. *Cell Death Differ*, **10**, 371-382.
- Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., Van De Putte, L.B. and Lipsky, P.E. (1998) Cyclooxygenase in biology and disease. *Faseb J*, **12**, 1063-1073.
- Duff, M., Stapleton, P.P., Mestre, J.R., Maddali, S., Smyth, G.P., Yan, Z., Freeman, T.A. and Daly, J.M. (2003) Cyclooxygenase-2 inhibition improves macrophage function in melanoma and increases the antineoplastic activity of interferon gamma. *Ann Surg Oncol*, **10**, 305-313.
- Edwards, B.K., Brown, M.L., Wingo, P.A., Howe, H.L., Ward, E., Ries, L.A., Schrag, D., Jamison, P.M., Jemal, A., Wu, X.C., Friedman, C., Harlan, L., Warren, J., Anderson, R.N. and Pickle, L.W. (2005) Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*, **97**, 1407-1427.
- Elgert, K.D., Alleva, D.G. and Mullins, D.W. (1998) Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J Leukoc Biol*, **64**, 275-290.
- Elsasser-Beile, U., Kolble, N., Grussenmeyer, T., Schultze-Seemann, W., Wetterauer, U., Gallati, H., Schulte Monting, J. and von Kleist, S. (1998) Th1 and Th2 cytokine response patterns in leukocyte cultures of patients with urinary bladder, renal cell and prostate carcinomas. *Tumour Biol*, **19**, 470-476.
- Facoetti, A., Capelli, E. and Nano, R. (2001) HLA class I molecules expression: evaluation of different immunocytochemical methods in malignant lesions. *Anticancer Res*, **21**, 2435-2440.

- Fernandes, M.J., Lachance, G., Pare, G., Rollet-Labelle, E. and Naccache, P.H. (2005) Signaling through CD16b in human neutrophils involves the Tec family of tyrosine kinases. *J Leukoc Biol*, **78**, 524-532.
- Fernandes, M.J., Rollet-Labelle, E., Pare, G., Marois, S., Tremblay, M.L., Teillaud, J.L. and Naccache, P.H. (2006) CD16b associates with high-density, detergent-resistant membranes in human neutrophils. *Biochem J*, **393**, 351-359.
- Fossati, G., Moots, R.J., Bucknall, R.C. and Edwards, S.W. (2002) Differential role of neutrophil Fc γ receptor IIIB (CD16) in phagocytosis, bacterial killing, and responses to immune complexes. *Arthritis Rheum*, **46**, 1351-1361.
- Fosslien, E. (2000) Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci*, **30**, 3-21.
- Funkhouser, E.M. and Sharp, G.B. (1995) Aspirin and reduced risk of esophageal carcinoma. *Cancer*, **76**, 1116-1119.
- Giovannucci, E., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Ascherio, A. and Willett, W.C. (1994) Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Ann Intern Med*, **121**, 241-246.
- Goodwin, J.S. and Ceuppens, J. (1983) Regulation of the immune response by prostaglandins. *J Clin Immunol*, **3**, 295-315.
- Gregory, C.D. (2000) CD14-dependent clearance of apoptotic cells: relevance to the immune system. *Curr Opin Immunol*, **12**, 27-34.
- Hailman, E., Lichenstein, H.S., Wurfel, M.M., Miller, D.S., Johnson, D.A., Kelley, M., Busse, L.A., Zukowski, M.M. and Wright, S.D. (1994) Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med*, **179**, 269-277.
- Harris, R.E., Beebe-Donk, J., Doss, H. and Burr Doss, D. (2005) Aspirin, ibuprofen, and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention: a critical review of non-selective COX-2 blockade (review). *Oncol Rep*, **13**, 559-583.
- Hashibe, M., Brennan, P., Benhamou, S., Castellsague, X., Chen, C., Curado, M.P., Dal Maso, L., Daudt, A.W., Fabianova, E., Wunsch-Filho, V., Franceschi, S., Hayes, R.B., Herrero, R., Koifman, S., La Vecchia, C., Lazarus, P., Levi, F., Mates, D., Matos, E., Menezes, A., Muscat, J., Eluf-Neto, J., Olshan, A.F., Rudnai, P., Schwartz, S.M., Smith, E., Sturgis, E.M., Szeszenia-Dabrowska, N., Talamini, R., Wei, Q., Winn, D.M., Zaridze, D., Zatonski, W., Zhang, Z.F., Berthiller, J. and Boffetta, P. (2007) Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst*, **99**, 777-789.
- Huang, M., Sharma, S., Mao, J.T. and Dubinett, S.M. (1996) Non-small cell lung cancer-derived soluble mediators and prostaglandin E2 enhance peripheral blood lymphocyte IL-10 transcription and protein production. *J Immunol*, **157**, 5512-5520.
- Huang, M., Stolina, M., Sharma, S., Mao, J.T., Zhu, L., Miller, P.W., Wollman, J.,

- Herschman, H. and Dubinett, S.M. (1998) Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res*, **58**, 1208-1216.
- Huffnagle, G.B., McNeil, L.K., McDonald, R.A., Murphy, J.W., Toews, G.B., Maeda, N. and Kuziel, W.A. (1999) Cutting edge: Role of C-C chemokine receptor 5 in organ-specific and innate immunity to *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol*, **163**, 4642-4646.
- Janeway, C.A.J. (2004) Immunobiology: the immune system in health and disease. Garland Publishing, New York.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C. and Thun, M.J. (2006) Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin*, **56**, 106-130.
- Kastenbauer, E. and Wollenberg, B. (1999) [In search of new treatment methods for head-neck carcinoma]. *Laryngorhinootologie*, **78**, 31-35.
- Klapan, I., Katic, V., Culo, F. and Cuk, V. (1992) Prognostic significance of plasma prostaglandin E concentration in patients with head and neck cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, **118**, 308-313.
- Lauerova, L., Dusek, L., Simickova, M., Kocak, I., Vagundova, M., Zaloudik, J. and Kovarik, J. (2002) Malignant melanoma associates with Th1/Th2 imbalance that coincides with disease progression and immunotherapy response. *Neoplasma*, **49**, 159-166.
- Loetscher, P., Ugucioni, M., Bordoli, L., Baggiolini, M., Moser, B., Chizzolini, C. and Dayer, J.M. (1998) CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature*, **391**, 344-345.
- Lundy, J., Wanebo, H., Pinsky, C., Strong, E. and Oettgen, H. (1974) Delayed hypersensitivity reactions in patients with squamous cell cancer of the head and neck. *Am J Surg*, **128**, 530-533.
- Luster, A.D. (1998) Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*, **338**, 436-445.
- Marrogi, A.J., Munshi, A., Merogi, A.J., Ohadike, Y., El-Habashi, A., Marrogi, O.L. and Freeman, S.M. (1997) Study of tumor infiltrating lymphocytes and transforming growth factor-beta as prognostic factors in breast carcinoma. *Int J Cancer*, **74**, 492-501.
- Mason, R.P., Walter, M.F., McNulty, H.P., Lockwood, S.F., Byun, J., Day, C.A. and Jacob, R.F. (2006) Rofecoxib increases susceptibility of human LDL and membrane lipids to oxidative damage: a mechanism of cardiotoxicity. *J Cardiovasc Pharmacol*, **47 Suppl 1**, S7-14.
- Massano, J., Regateiro, F.S., Januario, G. and Ferreira, A. (2006) Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, **102**, 67-76.

- Moraitis, D., Du, B., De Lorenzo, M.S., Boyle, J.O., Weksler, B.B., Cohen, E.G., Carew, J.F., Altorki, N.K., Kopelovich, L., Subbaramaiah, K. and Dannenberg, A.J. (2005) Levels of cyclooxygenase-2 are increased in the oral mucosa of smokers: evidence for the role of epidermal growth factor receptor and its ligands. *Cancer Res*, **65**, 664-670.
- Mori, T., Takada, R., Watanabe, R., Okamoto, S. and Ikeda, Y. (2001) T-helper (Th)1/Th2 imbalance in patients with previously untreated B-cell diffuse large cell lymphoma. *Cancer Immunol Immunother*, **50**, 566-568.
- Morita, M., Kuwano, H., Araki, K., Egashira, A., Kawaguchi, H., Saeki, H., Kitamura, K., Ohno, S. and Sugimachi, K. (2001) Prognostic significance of lymphocyte infiltration following preoperative chemoradiotherapy and hyperthermia for esophageal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **49**, 1259-1266.
- Navenot, J.M., Wang, Z.X., Trent, J.O., Murray, J.L., Hu, Q.X., DeLeeuw, L., Moore, P.S., Chang, Y. and Peiper, S.C. (2001) Molecular anatomy of CCR5 engagement by physiologic and viral chemokines and HIV-1 envelope glycoproteins: differences in primary structural requirements for RANTES, MIP-1 alpha, and vMIP-II Binding. *J Mol Biol*, **313**, 1181-1193.
- Ohno, Y., Ohno, S., Suzuki, N., Kamei, T., Inagawa, H., Soma, G. and Inoue, M. (2005) Role of cyclooxygenase-2 in immunomodulation and prognosis of endometrial carcinoma. *Int J Cancer*, **114**, 696-701.
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J. and Pisani, P. (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, **55**, 74-108.
- Patankar, M.S., Jing, Y., Morrison, J.C., Belisle, J.A., Lattanzio, F.A., Deng, Y., Wong, N.K., Morris, H.R., Dell, A. and Clark, G.F. (2005) Potent suppression of natural killer cell response mediated by the ovarian tumor marker CA125. *Gynecol Oncol*, **99**, 704-713.
- Porta, C., Bonomi, L., Lillaz, B., Paglino, C., Rovati, B., Imarisio, I., Morbini, P., Villa, C., Danova, M., Mensi, M. and Rovereto, B. (2007) Renal cell carcinoma-induced immunosuppression: an immunophenotypic study of lymphocyte subpopulations and circulating dendritic cells. *Anticancer Res*, **27**, 165-173.
- Reichert, T.E., Strauss, L., Wagner, E.M., Gooding, W. and Whiteside, T.L. (2002) Signaling abnormalities, apoptosis, and reduced proliferation of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma. *Clin Cancer Res*, **8**, 3137-3145.
- Ropponen, K.M., Eskelinen, M.J., Lipponen, P.K., Alhava, E. and Kosma, V.M. (1997) Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *J Pathol*, **182**, 318-324.
- Salzberg, D.J. and Weir, M.R. (2007) COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. *Subcell Biochem*, **42**, 159-174.
- Schumacher, K., Haensch, W., Roefzaad, C. and Schlag, P.M. (2001) Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res*, **61**, 3932-3936.

- Shibuya, K., Mathers, C.D., Boschi-Pinto, C., Lopez, A.D. and Murray, C.J. (2002) Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. Results for the global burden of disease 2000. *BMC Cancer*, **2**, 37.
- Skinner, N.A., MacIsaac, C.M., Hamilton, J.A. and Visvanathan, K. (2005) Regulation of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 on CD14dimCD16+ monocytes in response to sepsis-related antigens. *Clin Exp Immunol*, **141**, 270-278.
- Springer, T.A. (1995) Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol*, **57**, 827-872.
- Stolina, M., Sharma, S., Lin, Y., Dohadwala, M., Gardner, B., Luo, J., Zhu, L., Kronenberg, M., Miller, P.W., Portanova, J., Lee, J.C. and Dubinett, S.M. (2000) Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. *J Immunol*, **164**, 361-370.
- Strutz, J., Mann, W. (2001) *Praxis der HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie*, Thieme Verlag, Stuttgart
- Talamini, R., Bosetti, C., La Vecchia, C., Dal Maso, L., Levi, F., Bidoli, E., Negri, E., Pasche, C., Vaccarella, S., Barzan, L. and Franceschi, S. (2002) Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer Causes Control*, **13**, 957-964.
- Taylor, P.R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H.H., Brown, G.D. and Gordon, S. (2005) Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol*, **23**, 901-944.
- Thun, M.J., Namboodiri, M.M., Calle, E.E., Flanders, W.D. and Heath, C.W., Jr. (1993) Aspirin use and risk of fatal cancer. *Cancer Res*, **53**, 1322-1327.
- Ulrich, C.M., Bigler, J. and Potter, J.D. (2006) Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics. *Nat Rev Cancer*, **6**, 130-140.
- Vlock, D.R. (1991) Immunobiologic aspects of head and neck cancer. Clinical and laboratory correlates. *Hematol Oncol Clin North Am*, **5**, 797-820.
- Webb, D.S., Mostowski, H.S. and Gerrard, T.L. (1991) Cytokine-induced enhancement of ICAM-1 expression results in increased vulnerability of tumor cells to monocyte-mediated lysis. *J Immunol*, **146**, 3682-3686.
- Wittke, F., Hoffmann, R., Buer, J., Dallmann, I., Oevermann, K., Sel, S., Wandert, T., Ganser, A. and Atzpodien, J. (1999) Interleukin 10 (IL-10): an immunosuppressive factor and independent predictor in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer*, **79**, 1182-1184.
- Wollenberg, B., Walz, A., Kolbow, K., Pauli, C., Chaubal, S. and Andratschke, M. (2004) Clinical relevance of circulating tumour cells in the bone marrow of patients with SCCHN. *Onkologie*, **27**, 358-362.

- Yang, L., Yamagata, N., Yadav, R., Brandon, S., Courtney, R.L., Morrow, J.D., Shyr, Y., Boothby, M., Joyce, S., Carbone, D.P. and Breyer, R.M. (2003) Cancer-associated immunodeficiency and dendritic cell abnormalities mediated by the prostaglandin EP2 receptor. *J Clin Invest*, **111**, 727-735.
- Young, M.R., Wright, M.A., Lozano, Y., Matthews, J.P., Benefield, J. and Prechel, M.M. (1996) Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: influence on the immune infiltrate of the cancer. *Int J Cancer*, **67**, 333-338.
- Zeidler, R., Csanady, M., Gires, O., Lang, S., Schmitt, B. and Wollenberg, B. (2000) Tumor cell-derived prostaglandin E2 inhibits monocyte function by interfering with CCR5 and Mac-1. *Faseb J*, **14**, 661-668.
- Zhou, Y., Kurihara, T., Ryseck, R.P., Yang, Y., Ryan, C., Loy, J., Warr, G. and Bravo, R. (1998) Impaired macrophage function and enhanced T cell-dependent immune response in mice lacking CCR5, the mouse homologue of the major HIV-1 coreceptor. *J Immunol*, **160**, 4018-4025.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
APC	antigenpräsentierende Zelle
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CCR	Chemokinrezeptor
CD	cluster of differentiation
COX	Cyclooxygenase
CR3	complement receptor type 3
CXCR	Chemokinrezeptor
FACS	fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FcγIII Rezeptor	niedrigaffiner Rezeptor für gebundenes IgG
FITC	Flourescein-Isothiocyanat
FSC	forward scatter
FSC	Fötales Kälberserum
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HE	Hämatoxilin Eosin Färbung
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma
HPF	high power field
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
IFN α	Interferon α
IgG	Immunglobulin G
IL-2	Interleukin 2
LBP	Lipopolysaccharidbindendes Protein
LDL	low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
Mac-1	Leukozytenintegrin (CD11b:CD18)
MCP-3	monocyte chemoattractand protein
mfir	mean fluorescence intensity ratio
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
MIP-1 α	macrophage inflammatory protein α
MIP-1 β	macrophage inflammatory protein β
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NSAR	nicht-steroidale Antiphlogistika
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
RANTES	regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted
SDF-1	stromal derived factor 1
SSC	sideward scatter
TAMs	Tumor-assoziierte Makrophagen
TCR	T-Zellrezeptor
TGF- β	transforming growth factor β
Th 1 Zelle	T-Helferzelle 1
Th 2 Zelle	T-Helferzelle 2
TNF α	tumor necrosis factor α

7.3 Publikationen

Forschungsergebnisse, die im Rahmen dieser Dissertation entstanden sind, wurden mit Genehmigung von Herrn Professor Dr. P. C. Weber in folgenden Fachzeitschriften veröffentlicht:

1: FASEB J. 2003 Feb;17(2):286-8.

Impaired monocyte function in cancer patients: restoration with a cyclooxygenase-2 inhibitor.

Lang S, Lauffer L, Clausen C, Lohr I, Schmitt B, Holzel D, Wollenberg B, Gires O, Kastenbauer E, Zeidler R.

2: Cancer Immunol Immunother. 2007 Oct;56(10):1645-52.

Immune restoration in head and neck cancer patients after in vivo COX-2 inhibition.

Lang S, Tiwari S, Andratschke M, Loehr I, Lauffer L, Bergmann C, Mack B, Lebeau A, Moosmann A, Whiteside TL, Zeidler R.

7.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Reinhard Zeidler, der durch seine Kompetenz und sein Engagement ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Ich bedanke mich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, viele anregende Diskussionen und die Begutachtung meiner Arbeit.

Ein ehrendes Andenken gilt Herrn Professor Dr. med. Ernst Kastenbauer, damaliger Direktor der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, dem die Forschung in seiner Abteilung ein wichtiges Anliegen war, das er stets mit Interesse begleitet und gefördert hat.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Professor Dr. med. Stephan Lang bedanken, der die klinische Studie mit großem persönlichem Einsatz geleitet und mich in der Patientenbetreuung angeleitet hat.

Frau Bärbel Schmitt war mir während des experimentellen Teils im Labor eine große Stütze, ich danke ihr für ihre kompetente Einweisung in die verschiedenen Labortechniken.

Frau Brigitte Mack gilt mein Dank für ihre hingebungsvolle Hilfe bei der Anfertigung der immunhistochemischen Präparate, die ohne ihre große Erfahrung und Begeisterung nicht in dieser Qualität entstanden wären.

Allen Mitarbeitern der HNO-Forschungsabteilung möchte ich Dank sagen für die angenehme Zusammenarbeit, ihre freundliche Aufnahme und ihre Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. med. Roman Iakoubov danke ich für die technische Unterstützung bei den Grafiken und Diagrammen.

Tiefe Dankbarkeit empfinde ich für meine liebe Familie, die mich stets in jeglicher Hinsicht unterstützt hat.

7.5 Lebenslauf

Name: Lina Magdalene Lauffer
Eltern: Renate Lauffer und Dr. Peter Lauffer

Schule:

Gymnasium: **1988 - 1997** BMV-Schule in Essen
1994 - 1995 Leighton Park School in Reading,
Großbritannien
Abschluss: **06/1997** Abitur

Studium der Medizin:

Vorklinik: **1997 – 2000** Universität Essen
Klinik: **2000 – 2004** Ludwig-Maximilians-Universität München
Praktisches Jahr: I. Tertial: Medizinische Klinik der LMU – Innenstadt,
München
II. Tertial: Department of Radiology, Brigham and
Women’s Hospital, Boston, USA
III. Tertial: Chirurgische Klinik, Krankenhaus
Harlaching, München
Abschluss: **05/2004** Staatsexamen
10/2004 Approbation als Ärztin

Beruf:

07/2004 – 09/2004 Ärztin im Praktikum, Frauenklinik
der Universität zu Köln
10/2004 – 04/2005 Assistenzärztin, Frauenklinik der
Universität zu Köln
07/2005 – 04/2007 Assistenzärztin, Medizinische Klinik
I, Krankenhaus Merheim, Kliniken der Stadt Köln
08/2007 - Postdoctoral Fellow, Department of
Physiology, University of Toronto, Kanada

Stipendien:

Begabtenförderung der
Hanns-Seidel Stiftung, München **2001 - 2004**
Albert-Renold Fellowship,
European Foundation for the
Study of Diabetes, Düsseldorf **2007**