

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

Supprimierter Immunstatus durch strukturelle und funktionelle immunologische Defizite bei Patienten mit Karzinomen aus dem Kopf- und Halsbereich

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

vorgelegt von
Christoph Clausen
aus München
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. rer. nat. Reinhard Zeidler
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Judith Johnson, Ph.D.

1. Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Eberhard Uhl
2. Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Ralph Mocikat

Mitbetreuung durch: Prof. Dr. med. Stephan Lang

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 2004

meinen liebenden Eltern Ursula und Dieter

- - -

*„Prefiero morir de pie que vivir arrodillado“
(Emiliano Zapata, 1879-1919)*

ABSTRACT:

Epidemiologische Daten und Tiermodelle geben Hinweise auf eine verschlechterte Immunabwehr bei Karzinomen des Kopf- und Halsbereiches, wobei die genauen Wirkmechanismen bisher nicht aufgeschlüsselt werden konnten. In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Karzinome im Kopf- und Halsbereich mit erhöhten Konzentrationen an Prostaglandinen im Serum einhergehen, ein anderer Autor wies eine verminderte Expression des Chemokinrezeptors CCR5 auf Monozyten nach Behandlung mit Prostaglandin nach. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig aufgezeigt werden, dass es im Rahmen einer Karzinomerkrankung im Hals- und Kopfbereich zu strukturellen und funktionellen Defiziten der Monozytenfunktion kommt. Hierbei finden sich erniedrigte Expressionsraten an CCR5, CCR2 und des Adhäsionsmoleküls CD11b des β -Integrins Mac-1 sowie eine verminderte Adhäsionsfähigkeit der Monozyten an das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass nach Inkubation der Monozyten in Serum gesunder Spender die verminderte Immunfunktion wieder verbessert wird. Parallel dazu zeigte sich, dass die oben beschriebenen Immundefekte auf Monozyten gesunder Spender durch Inkubation in Serum von Tumorpatienten künstlich herbeigeführt werden können. Dies legt den Schluss nahe, dass im Rahmen einer Karzinomerkrankung Metaboliten im Serum gelöst sind, die eine immunologische Tumorabwehr erschweren. Diese Erkenntnisse sind ein weiterer Schritt zum Verständnis der Tumorummunologie und könnten dazu hilfreich sein, immunologische Therapieverfahren voranzubringen.

STICHWÖRTER:

Immunsuppression, Karzinom, Monozyten, SCCHN, Chemokinrezeptor, Chemotaxis, CCR-5, CCR-2, CD11b, Mac-1, Adhäsion.

INHALTSVERZEICHNIS:

1	EINFÜHRUNG	9
1.1	EPIDEMIOLOGIE UND PROGNOSE / BEHANDLUNG DER HNO-KARZINOME ..	9
1.1.1	Epidemiologische Daten	9
1.1.2	Prognostische Faktoren	9
1.1.3	TNM-Klassifikationen, UICC-Stadieneinteilung	11
1.1.4	Therapeutische Verfahren	13
1.1.5	Therapiefolgen	15
1.2	DAS IMMUNSYSTEM	16
1.2.1	Immunabwehr	16
1.2.2	Zellen des Immunsystems	16
1.2.2.1	Granulozyten	16
1.2.2.2	Mononukleäre Phagozyten	17
1.2.2.3	Antigen präsentierende Zellen	18
1.2.2.4	Lymphozyten	19
1.2.2.4.1	T-Lymphozyten	19
1.2.2.4.1.1	Co-stimulatorische Moleküle der B7-Familie	19
1.2.2.4.1.2	Apoptose-Induktion durch zytotoxische T-Zellen	20
1.2.2.4.2	B-Lymphozyten	21
1.2.2.4.3	Natürliche Killerzellen	24
1.2.3	Zytokine	24
1.3	SUPPRIMIERTER IMMUNSTATUS BEI PATIENTEN MIT PLATTENEPITHELKARZINOMEN DES KOPFES UND HALSES	26
1.4	ÜBERBLICK IMMUNREAKTION: ZELLADHÄSION, TRANSMIGRATION UND MIGRATION	28
1.5	CHEMOKINE UND CHEMOKINREZEPTOREN CCR-2 UND CCR-5	31
1.5.1	Chemokine	31
1.5.2	Chemokinrezeptoren	33
1.5.2.1	Chemokinrezeptor CCR-5	33
1.5.2.1.1	Prostaglandin E-2 und COX-2-Hemmer	33
1.5.2.2	Chemokinrezeptor CCR-2	34

1.6	DAS β -INTEGRIN MAC-1 (CD11B/CD18).....	35
1.7	CD28 UND CTLA-4 (CD152)	35
1.8	TCR-ZETA	37
1.9	AUFGABENSTELLUNG, ZIELGABE	38
2	MATERIAL UND METHODEN	39
2.1	PROBANDEN UND KONTROLLGRUPPE	39
2.2	ZELLEN UND ZELLKULTUR	40
2.2.1	Monozyten	40
2.2.2	Lymphozyten.....	41
2.3	FACS-ANALYSE.....	43
2.3.1	Monozyten	43
2.3.2	Lymphozyten.....	43
2.4	MONOZYTEN-ADHÄSIONSSASSAY.....	44
2.5	STATISTISCHE ANALYSE	45
3	ERGEBNISSE.....	47
3.1	ANALYSE VON ANTITUMORAL BEDEUTSAMEN OBERFLÄCHENMOLEKÜLEN AUF IMMUNABWEHRZELLEN – MONOZYTENANALYSEN.....	47
3.1.1	CCR5	47
3.1.1.1	Vergleich Tumorpatienten - gesunde Probanden	47
3.1.1.2	Monozyten von Tumorpatienten	49
3.1.1.2.1	Gesamtdaten	49
3.1.1.2.2	Vergleich zwischen TumorgroÙe	50
3.1.1.2.3	Vergleich im Lymphknotenbefall	52
3.1.1.2.4	Vergleich im Tumorigradung.....	54
3.1.1.3	Monozyten der gesunden Kontrollgruppe	57
3.1.1.3.1	Gesamtdaten	57
3.1.1.3.2	Vergleich zwischen TumorigroÙe	58
3.1.1.3.3	Vergleich im Lymphknotenbefall	60
3.1.1.3.4	Vergleich im Tumorigradung.....	62
3.1.1.4	Kontrolluntersuchungen.....	62
3.1.1.5	Zusammenfassung Ergebnisse CCR5	64

3.1.2 CCR2	65
3.1.2.1 Vergleich Tumorpatienten - gesunde Probanden	65
3.1.2.2 Monozyten von Tumorpatienten	66
3.1.2.2.1 Gesamtdaten	66
3.1.2.2.2 Vergleich zwischen TumorgroÙe	67
3.1.2.2.3 Vergleich im Lymphknotenbefall	68
3.1.2.2.4 Untergruppe T3/4 mit LK+.....	69
3.1.2.2.5 Vergleich im Tumorigrating.....	71
3.1.2.3 Monozyten der gesunden Kontrollgruppe	72
3.1.2.3.1 Gesamtdaten	72
3.1.2.3.2 Vergleich zwischen TumorgroÙe	73
3.1.2.3.3 Vergleich im Lymphknotenbefall	73
3.1.2.3.4 Vergleich im Tumorigrating.....	74
3.1.2.4 Zusammenfassung Ergebnisse CCR2	74
3.1.3 CD11b (Mac-1)	75
3.1.3.1 Vergleich Tumorpatienten - gesunde Probanden	75
3.1.3.2 Monozyten von Tumorpatienten	76
3.1.3.2.1 Gesamtdaten	76
3.1.3.2.2 Vergleich zwischen TumorgroÙe	77
3.1.3.2.3 Vergleich im Lymphknotenbefall	77
3.1.3.2.4 Vergleich im Tumorigrating.....	77
3.1.3.3 Monozyten der gesunden Kontrollgruppe	78
3.1.3.3.1 Gesamtdaten	78
3.1.3.3.2 Vergleich zwischen TumorgroÙe	78
3.1.3.3.3 Vergleich im Lymphknotenbefall	78
3.1.3.3.4 Vergleich im Tumorigrating.....	79
3.1.3.4 Zusammenfassung Ergebnisse CD11b (Mac-1).....	79
3.2 LYMPHOZYTENANALYSEN.....	80
3.2.1 CTLA-4.....	80
3.2.2 CD28 / TCR-zeta	82
3.2.3 Lymphozyten in Überstand einer FaDu-Karzinomzelllinie	84
3.2.4 Zusammenfassung Lymphozytenanalysen.....	84

3.3	FUNKTIONELLE ANALYSE DER MONOZYTENADHÄSION	85
3.3.1	Konzentrationen an gelöstem ICAM-1	85
3.3.2	Vergleich Tumorpatienten - gesunde Probanden	86
3.3.3	Monozyten von Tumorpatienten	87
3.3.4	Monozyten gesunder Probanden	90
3.3.5	Zusammenfassung	90
3.4	POSTOPERATIVE RESTAURATION DER SUPPRIMIERTEN MONOZYTENFUNKTION	91
4	DISKUSSION	93
4.1	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	93
4.2	HINTERGRUND DER UNTERSUCHUNGEN	94
4.3	BEDEUTUNG DER OBERFLÄCHENMOLEKÜLE.....	96
4.4	KRITISCHE BEURTEILUNG DER ERGEBNISSE UND MÖGLICHE KLINISCHE RELEVANZ.....	97
4.5	RÜCKBLICK UND AUSBLICK	99
5	ZUSAMMENFASSUNG	104
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	106
7	ANHANG	120
7.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	120
7.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	125
8	DANKSAGUNG	127
9	TABELLARISCHER LEBENS LAUF	128
10	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	129

1 Einführung

1.1 *Epidemiologie und Prognose / Behandlung der HNO-Karzinome*

1.1.1 Epidemiologische Daten

In Europa wird jährlich bei etwa 2,6 Millionen Menschen erstmalig eine bösartige Tumorerkrankung festgestellt. Die Tendenz ist weiter steigend. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen an Krebs in Deutschland wird auf ca. 168.500 Fälle bei Männern und ca. 179.000 bei Frauen geschätzt. 1998 waren von 852.382 Todesfällen 212.748 auf bösartige Neubildungen zurückzuführen (Statistisches Bundesamt). Die Inzidenz von Malignomen im Kopf- und Halsbereich liegt bei Männern auf Platz 4 und bei Frauen auf Platz 8 der Krebsstatistik. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei vergleichsweise niedrigen 58, für Frauen bei 63 Jahren. Mit Hauptmanifestationen im Bereich der Mundhöhle, des Pharynx, Larynx und der Nase bzw. Nasennebenhöhlen wurden die Erkrankungen histologisch mehrheitlich als Plattenepithelkarzinome klassifiziert (Berrino 1995).

1.1.2 Prognostische Faktoren

Während für eine steigende Zahl an Malignomen sich durch neue Behandlungsverfahren die Situation für die betroffenen Patienten bessert, ist die Prognose bei Hals- und Kopfkrebs trotz verbesserter chirurgischer Techniken, der Einführung neuer Bestrahlungsverfahren und des Einsatzes adjuvanter Chemotherapeutika in den letzten 30 Jahren unverändert schlecht (Dimery 1993). So beträgt die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate eines an einem Plattenepithelkarzinom des Hypopharynx erkrankten Patienten nur ungefähr 31,4% (Hoffmann 1998). Bei Erstdiagnose weisen mehr als 60% der Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches (SCCHN = squamous cell carcinoma of the head and neck) die fortgeschrittenen

Krankheitsstadien III und IV auf (Lang 2002), die 5-Jahresüberlebensrate liegt für das Stadium IV bei lediglich 15% (von Hoff 1994).

Wichtig ist die anatomische Lokalisation des Tumors. Die besten Heilungsaussichten bestehen bei Patienten mit Karzinomen der Glottis, gefolgt von Patienten mit Tumoren der Supraglottis, der Mundhöhle, des Nasopharynx und des Oropharynx. Am schlechtesten ist die Prognose der Hypopharynxkarzinome (Grau 1997). Für viele Tumore ist die Prognose klar mit dem Stadium der Erkrankung korreliert. Der entscheidende Prognosefaktor ist das Vorliegen von Hals-Lymphknotenmetastasen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. In circa 50% der Fälle sind bereits bei Diagnosestellung lokoregionäre Metastasen vorhanden (Ortega 1987, Schuller 1980).

Darüber hinaus liegen in 5-25% der Fälle zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits klinisch nachweisbare Fernmetastasen vor. Die Inzidenz im Verlauf der Erkrankung dürfte sogar noch deutlich höher liegen, da Autopsiestudien in 40-57% der Fälle Fernmetastasen nachweisen. Experimentell lassen sich in frühen, insbesondere jedoch in späten Stadien Tumorzellen im peripheren Blut und Knochenmark detektieren, die beweisend für eine systemische Karzinomdissemination sind (Kastenbauer 1999). Das lokoregionäre Rezidiv nach abgeschlossener erster Behandlung hat verständlicherweise ebenfalls eine sehr schlechte Prognose. Wie aus den Daten des Tumorzentrums München hervorgeht, liegen hier die Fünf-Jahres-Überlebensraten zwischen 6 und 31%. Aus dem Gesagten wird deutlich, dass SCCHN, obwohl sie lange Zeit regionär wachsen, im fortgeschrittenen Stadium eine systemische Erkrankung darstellen. Dies erfordert die Entwicklung neuer Therapieverfahren, die eine lokale, vor allem aber systemische Interaktion zwischen dem Tumor und seinem Wirt berücksichtigen (Cummings 1996).

1.1.3 TNM-Klassifikationen, UICC-Stadieneinteilung

Um einheitliche Behandlungsstrategien durchzusetzen, wurde das TNM-System zur Klassifikation von bösartigen Tumoren entwickelt, nachfolgend die Klassifikationen verabschiedet von der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie vom Juni 1999:

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

Abbildung 1-1: T-Klassifikation Pharynxkarzinom

T1	Tumor auf Stimmband (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 breitet sich auf andere Gewebe außerhalb des Larynx, z.B. Trachea, Weichteile des Halses, Schilddrüse oder Pharynx, aus

Abbildung 1-2: 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 breitet sich auf andere Gewebe außerhalb des Larynx, z. B. Trachea, Weichteile des Halses, Schilddrüse oder Ösophagus aus

Abbildung 1-3: T-Klassifikation subglottischer Larynx-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	<p><i>Lippe:</i> Tumor infiltriert Nachbarstrukturen, z.B. kortikalen Knochen, N. alveolaris inferior, Mundboden oder Gesichtshaut</p> <p><i>Mundhöhle:</i> Tumor infiltriert Nachbarstrukturen, z. B. kortikalen Knochen, Außen-(Skelett)-muskel der Zunge, Kieferhöhle oder Haut (eine nur oberflächliche Erosion des Knochens oder einer Zahnalveole berechtigt nicht zur Einordnung eines Tumors als T4)</p>

Abbildung 1-4: T-Klassifikation Lippen- und 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, Außen-(Skelett)muskel der Zunge, Larynx

Abbildung 1-5: T-Klassifikation Oropharynx-Karzinome

NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
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

Abbildung 1-6: N-Klassifikation aller Kopf-Hals-Tumoren außer denen des Nasopharynx und der Schilddrüse

1.1.4 Therapeutische Verfahren

Von der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) wurde eine Einteilung in verschiedene Erkrankungsstadien unternommen:

Stadium 0	Tis N0
Stadium 1	T1 N0
Stadium 2	T2 N0
Stadium 3	T3 N0 oder T1/2/3 N1
Stadium 4a	T4 N0/1 oder T1/2/3/4 N2
Stadium 4b	T1/2/3/4 N3
Stadium 4c	Fernmetastasen M1

Abbildung 1-7: UICC-Einteilung zur Festlegung des Tumorstadiums

Nachfolgend eine schematische Übersicht über die bestehenden therapeutische Möglichkeiten und Verfahrensweisen am Beispiel des Hypopharynxkarzinoms:

CHIRURGISCHE THERAPIE:*Mögliche Tumorresektionsverfahren*

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 evtl. 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 evtl. 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.

Lymphknotenresektion

N0	SND, evtl. Beobachtung. Bei postoperativ geplanter Radiotherapie kann auf eine elektive Neck-dissection verzichtet werden
N1	SND oder MRND
N2	SND oder MRND, in besonderen Fällen RND
N3	RND, evtl. MRND oder ERND

RADIODTHERAPIE

<i>Primäre Radiotherapie</i>	<p>Alternativ zur Operation (bei Vorliegen von Kontraindikationen gegen die Operation) kann für das Stadium I (T1 N0) eine primäre alleinige Radiotherapie erwogen werden sowie im Rahmen einer Palliativsituation (z.B. bei Vorliegen von Fernmetastasen)</p> <p>Ist eine Laryngektomie indiziert, kann alternativ eine primäre Radiochemotherapie mit der Option der Laryngektomie als Rettungschirurgie erwogen werden.</p>
<i>Postoperative Radiotherapie</i>	<p>Tumor non in sano reseziert (R1, R2), wenn eine Nachresektion nicht möglich ist</p> <p>Hypopharynxkarzinome pT3–4 pN0 und pT1–4 pN1–3</p> <p>Fakultativ: pT2 pN0 und bei Vorliegen einer Lymphgefäßinvasion am Primärtumor (nur begrenzt als Indikationsparameter geeignet)</p> <p>Lymphknotenkapselruptur</p> <p>Lymphangiosis carcinomatosa</p>

Abbildung 1-8: Therapieschema Kopf- und Halskarzinom

Eine (neo-)adjuvante Chemotherapie besteht in der Gabe Zytostatika von Alkylanzien (z.B. Cisplatin), Antimetaboliten (z.B. 5-Floururacil) und zytostatisch wirksamen Antibiotika (z.B. Streptomycin) sowie Alkaloiden (z.B. Vincristin) oder Taxanen (z.B. Docetaxel). Die Chemotherapie hat jedoch nur palliativen Charakter und ist mit entsprechenden starken Nebenwirkungen äußerst belastend (Argiris 2002, Khattab 1999). Des Weiteren kann eine chemotherapeutisch bedingte Immunsuppression selbst zur Entwicklung bösartiger Tumoren führen (Burnet 1971, Kersey 1973).

1.1.5 Therapiefolgen

Neben der primär schlechten Prognose erfährt der Patient eine weitere Beeinträchtigung seiner Lebensqualität durch ausgedehnte chirurgische Resektionen mit konsekutiven Deformitäten und Behinderungen des Schluck- und Sprechaktes sowie der Atmung. Im Rahmen der Bestrahlung werden Knorpel- und Knochennekrosen, Mundtrockenheit, Schleimhautentzündungen und Gewebefibrosierung beobachtet; Chemotherapeutika können zu einer Knochenmarksdepression oder Beeinträchtigung der Nieren- und Magenfunktion führen (Lang 2001, Larson 1983).

Aus den beschriebenen Sachverhalten ergibt sich die Notwendigkeit neuer Therapieverfahren in der Behandlung von bösartigen Neubildungen im Kopf- und Halsbereich. In dieser Arbeit soll nun untersucht werden, inwiefern Immundefekte bei SCCHN-Patienten bestehen, welche Ansätze weiterer Untersuchungen bedürfen, bzw. ob sich der Einsatz immunstimulatorischer Substanzen als therapeutischer Ansatz auch für SCCHN-Erkrankungen anbietet. Nachfolgende Kapitel sollen einen Einblick in die neuesten Erkenntnisse der immunologischen Betrachtung von Tumorerkrankungen sowie einen kurzen Überblick über die Tumorummunologie geben.

1.2 Das Immunsystem

1.2.1 Immunabwehr

Immunabwehr kann als die Fähigkeit eines Organismus definiert werden, von außen eingedrungene oder im Körper entstandene und als fremd erkannte Strukturen zu eliminieren (Roitt 2001). Dabei bedient sich der menschliche Organismus zweier wesentlicher Effektormechanismen:

1. *der unspezifischen, angeborenen Immunabwehr*
2. *der spezifischen, erworbenen Immunabwehr.*

Der wesentliche Unterschied zwischen beiden Systemen besteht darin, dass das unspezifische Immunsystem relativ stereotyp, die spezifische Abwehr hingegen abgestuft reagiert und durch die Ausbildung von Gedächtniszellen charakterisiert ist (Roitt 2001). Zwischen beiden Systemen gibt es enge funktionelle Beziehungen, die durch verschiedene Zellpopulationen sowie deren Botenstoffe, so genannte „Zytokine“, vermittelt werden. Da die Analyse von Immuneffektorzellen bzw. deren Interaktion mit Tumorzellen und die regulatorische Wirkung von Zytokinen zentraler Bestandteil dieser Arbeit waren, wird hierauf im Nachfolgenden näher eingegangen.

1.2.2 Zellen des Immunsystems

1.2.2.1 Granulozyten

Granulozyten, die sich unter dem Einfluss von GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor = die Kolonienbildung von Granulozyten und Makrophagen stimulierender Faktor) in die Subpopulationen Neutrophile, Eosinophile und Basophile differenzieren, weisen keinerlei Antigen-Spezifität auf, verfügen jedoch aufgrund ihrer Fähigkeit zur Phagozytose über einen wirkungsvollen Mechanismus zur Elimination von im Organismus vorhandenen Fremdstoffen. Über die Sekretion von Zytokinen wie z.B. IL-1, IL-6 und

Tumornekrosefaktor (TNF) α können weitere Immuneffektorzellen angezogen und im Rahmen der zellvermittelten Immunantwort aktiviert werden (Janeway 2001).

1.2.2.2 Mononukleäre Phagozyten

Die Vorläuferzellen reifen im Knochenmark heran und gelangen als zirkulierende **Monozyten** ins Blut bzw. finden sich als sessile Makrophagen im Gewebe (Elsbach 1980). Ubiquitär verbreitet sind mononukleäre Phagozyten (MNP) wesentliche Effektorzellen der unspezifischen Immunabwehr. So können Mikroorganismen oder abnorme Körperzellen (z. B. Tumorzellen) aktiv phagozytiert werden (Roitt 2001). MNP verfügen über spezifische Oberflächenrezeptoren, z.B. für GM-CSF, IL-2, Interferon (IFN)- α , β , γ , LFA-1, MHC-Klasse-II. Die von ihnen sezernierten Zytokine (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- α , TNF- α , GM-CSF) tragen zur Differenzierung und Aktivierung weiterer Zelltypen bei. Darüber hinaus spielen MNP als Antigen präsentierende Zellen eine wichtige Rolle bei der Steuerung spezifischer Immunreaktionen (Janeway 2001).

Zur Tumorabwehr müssen im Blut zirkulierende Monozyten das Gefäßsystem verlassen und in Richtung Malignom migrieren. Sie adhären dazu zunächst an Endothelzellen, welche die Innenwand von Gefäßen bilden.

Dieser Adhäsionsprozess wird durch verschiedene Adhäsionsmoleküle vermittelt. Eine wichtige Rolle spielen hierbei die monozytären β 2-Integrine, welche drei Heterodimere umfassen: Mac-1, bestehend aus den Ketten CD11b und CD18, welches auf Monozyten und Granulozyten exprimiert wird; LFA-1, bestehend aus CD11a und CD18 (auf Leukozyten) und CR4 (CD11c und CD18, auf Monozyten, Granulozyten und bestimmten Leukozyten (Carlos 1994)).

Nach Passage des Endothels wandern die Monozyten schließlich in Richtung des jeweiligen Immunprozesses. Diese zielgerichtete Migration wird durch

Chemokine (chemotaktische Zytokine) mediiert, welche lokal bei Immunreaktionen produziert werden und eine chemotaktische Wirkung auf bestimmte Immunzellen, wie z.B. die Monozyten ausüben. Die Wirkung wird durch Bindung an spezifische Chemokinrezeptoren vermittelt, wobei CCR5 für die Funktion von Monozyten von besonderer Bedeutung ist und die Chemokine RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β bindet (Raport 1996). Erst die suffiziente Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren erlaubt eine gerichtete Tumorzellelimination (Zeidler 2000).

1.2.2.3 Antigen präsentierende Zellen

Die T-Zell-vermittelte Immunantwort spielt eine Schlüsselrolle bei der Eliminierung maligner Zellen (Greenberg 1991) und erfordert eine intakte Antigen-Präsentation durch hierfür spezialisierte Zellen, da Antigene T-Lymphozyten als Effektorzellen mit Hilfe von Antigen präsentierenden Zellen (APC) stimulieren. Neben den erwähnten MNP, aber auch B-Lymphozyten, sind es Dendritische Zellen (DC), die als Population mit der höchsten Kapazität zur Antigen-Präsentation bekannt sind. Gekennzeichnet durch lange zytoplasmatische Fortsätze, finden sich diese Zellen bevorzugt an den möglichen Eintrittspforten von Krankheitserregern wie z.B. Haut, Lunge und Darm, aber auch in Lymphknoten und in der Milz. DC sind in der Lage, Antigene zu internalisieren, modifizieren und im Kontext mit MHC-Klasse-I- und -II-Molekülen T-Zellen zu präsentieren (Grabbe 1995). Es wird angenommen, dass dendritische Zellen die wichtigsten APC bei der primären Immunantwort sind, weil sie die T-Zell-Proliferation wirksam anregen. Diese Zellproliferation ist ein Schlüsselereignis, da es die Anzahl der Antigen-spezifischen T-Zellen und somit das antitumorale Potential vergrößert (Roitt 2001).

1.2.2.4 Lymphozyten

Das spezifische Immunsystem ermöglicht eine Antigen-spezifische Abwehrreaktion und wird durch B-Zellen, die für die humorale Immunantwort zuständig sind, sowie T-Zellen, welche im Rahmen der zellvermittelten Immunität reagieren, repräsentiert (Singer 1983).

1.2.2.4.1 T-Lymphozyten

Gerade die durch T-Zellen vermittelte spezifische zelluläre Immunität ist ein wesentlicher Abwehrmechanismus gegenüber Tumorzellen (Baskar 1993). Tumorantigene werden von APC aufgenommen, modifiziert und gemeinsam mit MHC-Molekülen präsentiert, wobei Peptide mittels des T-Zell-Rezeptors (TCR) durch CD8⁺-zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) in Anwesenheit von MHC-Klasse-I-Molekülen erkannt werden, während dies bei CD4⁺-T-Helferzellen im Kontext mit MHC-Klasse-II-Molekülen geschieht (Julius 1993, Miceli 1993). Diese Selektivität der Aktivierung des T-Zell-Systems wird als MHC-Restriktion bezeichnet. CD4⁺-Zellen proliferieren und differenzieren unter dem Einfluss von Zytokinen zu Effektorzellen aus und induzieren mittels Lymphokin-Signalen, insbesondere IL-2, die Ausreifung von CD8⁺-zytotoxischen T-Lymphozyten (Greenberg 1991, Guerder 1989). Der wesentliche Effektormechanismus bei der Abwehr von Tumorzellen beruht auf der Aktivierung dieser CD8⁺-Zellen. Diese sind jedoch zur Expansion auf exogenes, d.h. von CD4⁺-T-Helferzellen synthetisiertes IL-2 angewiesen.

1.2.2.4.1.1 Co-stimulatorische Moleküle der B7-Familie

Den co-stimulatorischen Molekülen der B7-Familie kommt dabei eine entscheidende Bedeutung bei der Generierung und Amplifizierung dieser Antigen-spezifischen antitumoralen Immunantwort zu (Schwartz 1992). Die Darbietung von Tumor-Antigenen im Kontext mit MHC-Klasse-II-Molekülen sowie co-stimulatorischen B7-Molekülen auf der Zelloberfläche Antigen präsentierender Zellen bewirkt bei CD4⁺-T-Zellen die Produktion von IL-2 via

TCR/MHC- und B7/CD28-Interaktion. Über diesen Zytokin-Stimulus werden die CD8⁺-zytotoxischen Zellen IL-2-abhängig aktiviert. Bei fehlender B7-Expression auf Tumorzellen wie dem malignen Melanom (Denfeld 1995) ist diese Aktivierung eingeschränkt bzw. nicht möglich (Guinan 1994, Schwartz 1992). Eine alleinige antigene Herausforderung der CD8⁺-zytotoxischen T-Lymphozyten ohne B7-co-stimulatorisch getriggerte CD4-abhängige IL-2-Syntheseindikation bedeutet eine Nicht-Aktivierung dieser Zellpopulation und damit die Unfähigkeit zu einer erfolgreichen Tumorabwehr (Chen 1993).

1.2.2.4.1.2 Apoptose-Induktion durch zytotoxische T-Zellen

Zellen können auf verschiedene Arten sterben. Bei einer schweren Schädigung durch physikalische oder chemische Verletzungen, wie z.B. Sauerstoffmangel, kommt es zum Zellzerfall durch Nekrose. Dieser Prozess ist durch den frühen Verlust der Integrität der Zellmembran charakterisiert und durch Freisetzung von Zellinhaltsstoffen oftmals von entzündlichen Reaktionen begleitet (Janeway 2001). Daneben gibt es die Apoptose, welche als sog. „programmierter Zelltod“ für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase, z.B. bei Zellproliferation, -differenzierung und Immunantwort entscheidend ist (Janeway 2001, Simon 1997). Sie ist gekennzeichnet durch Pyknose und Fragmentierung des Zellkerns sowie eine Kondensation des Zytoplasmas bei erhaltener Zellmembran (Dibbert 1997). Über spezielle Oberflächenrezeptoren wird die Apoptose reguliert. Eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung des Zelltodes spielt der Fas-Rezeptor (=APO-1, CD95), der auf nahezu allen Zellen nachweisbar ist (Dibbert 1997). Weitere Zelltod vermittelnde Rezeptoren wie z.B. TRAIL-R oder TNF-R1, TNF-R2 wurden ebenfalls beschrieben (Lang 2000b, Lin 1997).

Zytotoxische T-Zellen sind in der Lage, ihre Zielzellen zu zerstören, indem sie diese für die Apoptose programmieren (Janeway 2001). Dies erfolgt zum einen durch sog. Zytotoxine, wie z.B. Perforin1, Lymphotoxin oder Gran-Enzyme, zum anderen über die oben genannte Aktivierung von Fas, einem Rezeptor der

TNF-Familie in der Zellmembran. Ligation der Rezeptoren durch Antigene führt bei antigenreaktiven T-Zellen zu Proliferation bzw. Differenzierung in Effektorzellen oder Anergie bzw. Zelltod. Welcher Mechanismus aktiviert wird, hängt wahrscheinlich u.a. von einer B7.1/CD28-medierten Co-Stimulation ab (Guinan 1994).

1.2.2.4.2 *B-Lymphozyten*

B-Lymphozyten tragen auf ihrer Oberfläche Immunglobuline und entwickeln sich bei Kontakt mit einem bestimmten Antigen entweder zu Antikörper (Immunglobuline) produzierenden Plasmazellen (Plasmazellreaktion) oder zu „Gedächtnis-“, = „Memory-Zellen“; letztere werden bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen – unter Mitwirkung von T-Helfer-Zellen (CD4⁺) und Makrophagen (Antigen-präsentierende Zellen) – wieder aktiv, geben die gespeicherte Information an die B-Zell-Reihe weiter (Keimzentrumsreaktion) und führen rasch zu Antikörper (v.a. IgG) produzierenden Plasmazellen. Man unterscheidet 5 Klassen von Immunglobulinen, die sich nach ihrem Wirkungsort und nach ihrer Funktion einteilen lassen:

Immunglobulin M	IgM	kommt praktisch nur im Blutplasma vor; ist das erste Immunglobulin, das die Antikörper bildende Zelle produziert.
Immunglobulin G, Gammaglobulin	IgG	vorherrschender Antikörper im Serum
Immunglobulin A	IgA	Hauptantikörper in äußeren Sekreten (Speichel, Tränenflüssigkeit,...), erste Verteidigungslinie gegen bakterielle und virale Antigene
Immunglobulin D	IgD	die Funktion ist derzeit noch ungeklärt
Immunglobulin E	IgE	wichtig bei Parasitenabwehr, beteiligt am Entstehen von Allergien

Abbildung 1-9: Übersicht über die Immunglobulinklassen

Die Zahl der verschiedenen Antikörper, die vom Organismus gebildet werden können, wird auf 10^{10} geschätzt. In der sog. Klonselektionstheorie wird die Vielzahl der verschiedenen Antikörper erklärt. Alle immunkompetenten Zellen, die spezifische Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen entwickeln, gehören

zu einem Klon, d.h. stammen von einer einzigen Zelle ab. Das Antigen löst durch Selektion und Stimulation eines spezifischen B-Lymphozyten eine Immunantwort durch dessen klonale Expansion aus. Aus einem B-Lymphozyten entwickeln sich so in der Milz durch Mitose viele Plasmazellen, die in das Knochenmark wandern und dort Antikörper herstellen (monoklonale Antikörper). Da ein Antigen meist über mehrere Determinanten verfügt, aktiviert es jedoch eine Anzahl von B-Lymphozyten, die der Anzahl der Determinanten entsprechen (polyklonale Antikörper) (Roitt 2001, Abbas 2003, Janeway 2001).

Somit sind B-Lymphozyten die entscheidenden Mediatoren der erworbenen, spezifischen Immunabwehr; hierauf näher einzugehen würde den Umfang der Arbeit sprengen. Eine kurze Übersicht soll die Entstehung der Lymphozyten im menschlichen Körper skizzieren:

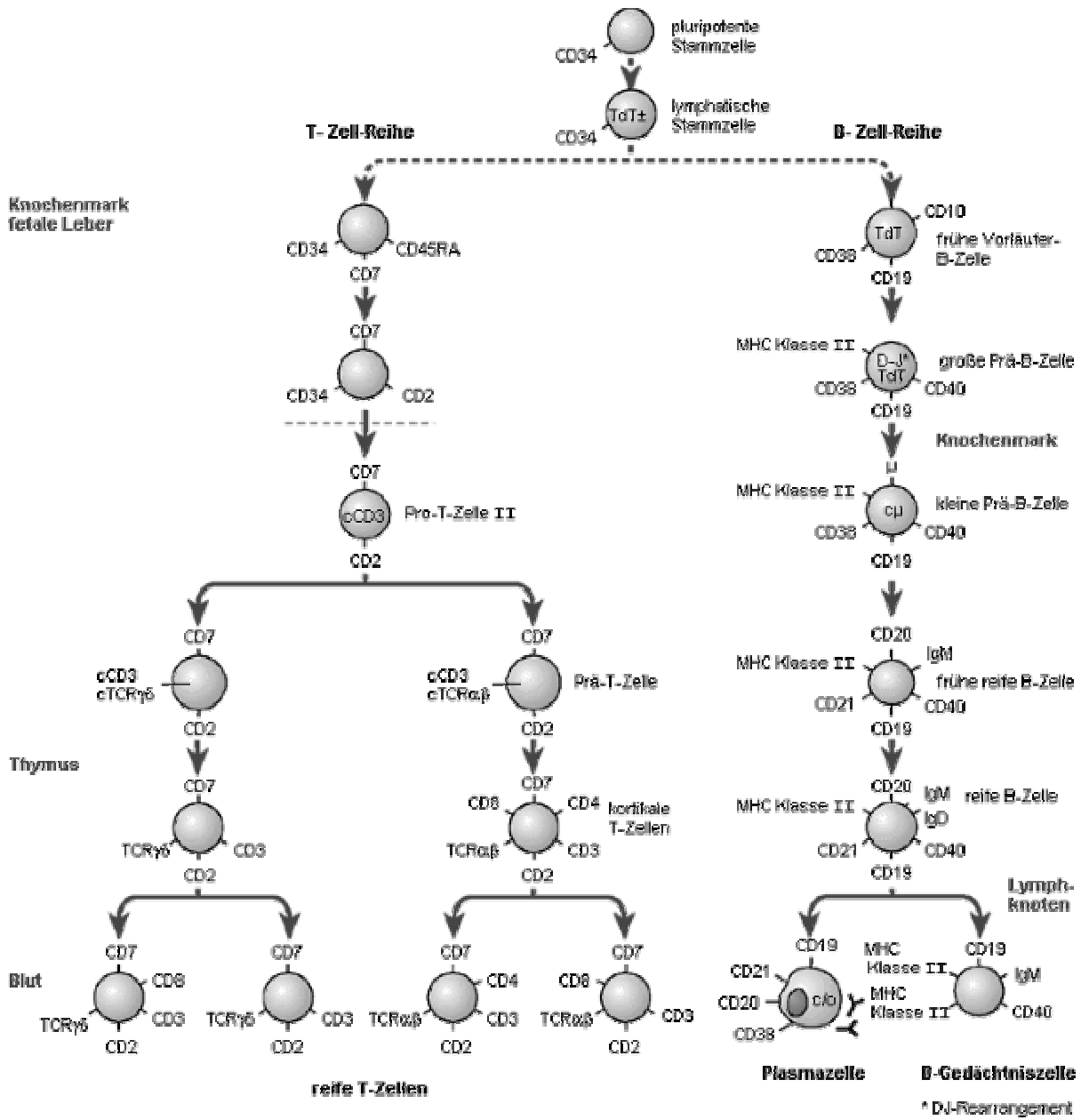


Abbildung 1-10: Überblick über die Lymphozytose

1.2.2.4.3 Natürliche Killerzellen

Eine dritte Lymphozyten-Gruppe, die sog. „natürlichen Killerzellen“ (NK) tragen keine Antigen-Rezeptoren und zeigen typischerweise den $CD3^-CD16^+CD56^+$ Phänotyp (Vujanovic 1993). Ruhende NK-Zellen exprimieren IL-2-Rezeptoren und entwickeln sich in Gegenwart von IL-2 zu Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK), die – im Vergleich zu ruhenden NK-Zellen – ein weites Spektrum von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* eliminieren können (Roitt 2001). NK-Zellen können nicht nur Tumorzellen lysieren, sondern über den CD16-Fc γ -III-Rezeptor IgG-beladene Zielzellen im Rahmen der Antikörper abhängigen zellulären Zytotoxizität töten. Da NK-Zellen keinen T-Zell-Rezeptor und kein Immunglobulin tragen, werden sie auch als Null-Zellen bezeichnet und sind in der Lage, ohne vorherige Sensibilisierung und ohne MHC-Restriktion zytotoxisch zu wirken (Vujanovic 1993, Janeway 2001).

1.2.3 Zytokine

Die Kommunikation der oben genannten Zellen untereinander und mit anderen Zelltypen im Rahmen der antitumoralen Immunabwehr erfolgt einerseits durch direkten Kontakt – wobei die co-stimulatorisch wirksamen B7-Moleküle, wie bereits erwähnt, eine entscheidende Rolle im Rahmen der Aktivierung einer antitumoralen Immunantwort einnehmen -, andererseits über sezernierte Mediatoren, die Zytokine. Im hochkomplexen Netzwerk der Immunantwort wurde eine Fülle von Zytokinen beschrieben, die aufzuzählen und zu beschreiben nicht Anliegen der vorliegenden Studie ist. Stellvertretend soll lediglich auf Interleukin 2, welches oben mehrfach erwähnt wurde, kurz eingegangen werden:

IL-2 nimmt eine zentrale Stellung in der Aktivierung der zellvermittelten Immunantwort ein (Mizel 1989). IL-2 ist ein Polypeptid aus 133 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 15.000 Dalton (Morgan 1976). Als positiv – regulatorisches Signal fördert es auto- und parakrin die Proliferation und Differenzierung der T-Zell-Subpopulationen. Es aktiviert außerdem NK-Zellen

bzw. die Differenzierung zu LAK-Zellen und stellt einen Wachstumsfaktor für B-Lymphozyten dar. Notwendig für die IL-2-Wirkung ist das Vorhandensein von IL-2-Rezeptoren auf den Zielzellen. Zwingende Voraussetzung für die Produktion von IL-2 in T-Helfer-Lymphozyten ist die Aktivierung durch APC, da ruhende T-Zellen kein IL-2 produzieren (Mizel 1989). IL-2 war eines der ersten im Rahmen der Genterapie zur Krebsbekämpfung eingesetzten Zytokine. Der Einsatz dieses Zytokins, welches für einen geordneten Ablauf der Immunantwort sorgt, an deren Ende die Vernichtung des Antigens bzw. der Tumorzelle steht, ist auch für zukünftige genterapeutische Ansätze interessant (Lang 2000).

1.3 *Supprimierter Immunstatus bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses*

Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches weisen eine defekte Immunfunktion auf. So berichteten Lundy et al bereits 1974 in diesem Zusammenhang über eine supprimierte zelluläre Immunreaktion in Form verzögerter Überempfindlichkeitsreaktion und belegten eine Korrelation zwischen negativem Hauttest und verkürzter Überlebenszeit (Lundy 1974). Bis heute wurde in einer Vielzahl von Studien bei dieser Malignomform eine beeinträchtigte zellvermittelte Immunität mit supprimierter T-Zell-Aktivierung nachgewiesen (Vlock 1991). So konnte eine eingeschränkte Stimulierbarkeit von T-Zellen auf Mitogene (Wanebo 1975) und eine reduzierte Zahl von im Blut zirkulierenden Lymphozyten im Vergleich zu gesunden Probanden belegt werden (Wolf 1986). Gerade die in unmittelbarer Auseinandersetzung mit der Neoplasie stehenden Tumor infiltrierenden Lymphozyten weisen eine eingeschränkte anti-tumorale Effizienz auf (Whiteside 1996). In histopathologischen Studien wurde gezeigt, dass SCCHN im Allgemeinen durch ein ausgeprägtes entzündliches Infiltrat gekennzeichnet sind (Barnes 1989). Derartige mononukleäre Phagozyten spielen aufgrund ihrer Fähigkeit zur Tumorantigen-Aufnahme und -Präsentation eine entscheidende Rolle im Rahmen der antitumoralen Immunantwort. So konnte eine Korrelation zwischen geringer Fernmetastasierung und hoher Phagozytenzahl im Tumor belegt werden (Eccles 1974).

Für Patienten mit SCCHN wurde jedoch sowohl eine verminderte Chemotaxis dieser Zellpopulation, als auch eine reduzierte HLA-DR-Expression im Sinne einer eingeschränkten Zellfunktion nachgewiesen (Balm 1984, Garoud 1988). Neben einer Beeinträchtigung der antitumoralen Funktion von T-Lymphozyten und mononukleären Phagozyten wurde bei SCCHN darüber hinaus auch über eine supprimierte Immunfunktion von NK-Zellen und eine damit verbundene erhöhte Inzidenz von lokoregionären Rezidiven oder Fernmetastasen, verbunden mit einer verringerten Überlebensrate, berichtet (Mickel 1988,

Schantz 1991). Als mögliche Mechanismen dieser zellulären Immunsuppression kommen einerseits lösliche Faktoren, die antitumoral wirksame Effektorpopulationen inhibieren, in Betracht; so konnten Young et al in Kulturen von SCCHN-Biopsien eine signifikante Sekretion von TGF- β (transforming growth factor β) und IL-10 beobachten (Young 1996), Mediatoren, denen eine immuninhibitorische Funktion zugeschrieben wird (Alleva 1995, Maeda 1993). Darüber hinaus wurde auch eine hohe Konzentration von immunsuppressiv wirksamen Prostaglandinen intratumoral und im Serum von SCCHN-Patienten nachgewiesen, deren negativer Einfluss auf das Immunsystem in zahlreichen Publikationen erörtert wurde (Berlinger 1984, Kaplan 1992, Young 1996).

Die beschriebenen Beeinträchtigungen des Immunsystems bei Vorliegen von SCCHN-Neoplasien sind eng verbunden mit den nutritiv-toxischen Faktoren, denen sich die betreffende Patientengruppe aussetzt. So ist der negative Einfluss von Alkohol- und Zigarettenkonsum unbestritten: neben einer direkten Schädigung der Mukosa, z.B. durch Acetaldehyd, aromatische Amine oder Nitrosamine, führt auch die im Gefolge chronischen Missbrauches beobachtete Reduktion von Speichelproduktion und speziell von IgA zu einer erhöhten Schleimhaut-Vulnerabilität gegenüber den genannten Noxen (Luce 1988, Maier 1988). Zusätzlich wird der Immunstatus durch die oftmals in diesem Zusammenhang beobachtete Mangelernährung im Sinne einer zu geringen Protein-, Kalorien- und Vitamin- bzw. Spurenelement-Aufnahme beeinträchtigt (Wustrow 1996).

1.4 Überblick Immunreaktion: Zelladhäsion, Transmigration und Migration

Die Wanderung der Leukozyten wird durch zwei entscheidende Schritte geregelt. Zum einen die Bindung und feste Adhäsion der im Blutsystem zirkulierenden Zellen an die endotheliale Oberfläche und zum Zweiten die Migration durch das Endothel in das Interstitium und von dort zu den weiteren Regionen.

Beim Auftreten lokaler Entzündungen chronischen oder akuten Ursprungs invadieren zur Phagozytose befähigte Leukozyten zur Vermittlung ihrer zellulären Immunabwehrfunktion aus dem Blutstrom in das betroffene Gewebe. Diese Extravasation findet als ein hochregulativer Prozess hauptsächlich in den kleinsten venösen Blutgefäßen, den postkapillaren Venolen statt. Voraussetzung für die Extravasation der Leukozyten ist deren rezeptorvermittelte Adhäsion an der Gefäßwand, welche durch die ineinander greifenden Bindungsschritte als Adhäsionskaskade bezeichnet wird (Springer 1995). Eingeleitet wird dieser Prozess durch die Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren wie z.B. Histamin oder Thrombin in dem betroffenen Gewebe. Diese bewirken die typischen Entzündungssymptome, die sich auch durch Vasodilatation und Exsudation verlangsamernd auf die Blutflusscharakteristik im Entzündungsgebiet auswirken.

Weiterhin vermitteln insbesondere freigesetzte Zytokine wie z.B. IL-1 oder TNF- α , dass die Endothelzellen spezifische Adhäsionsrezeptoren ausbilden, die somit die Endothelzellen in einen „pro-adhäsiven Zustand“ versetzen. Die Adhäsionskaskade der Leukozyten wird daraufhin durch erste transiente Kontakte der fließenden Zellen im kapillaren Blutstrom (ca. 2 mm/s) mit den Endothelzellen eingeleitet. Diese initiale Kontaktaufnahme, bei der die Bindungsereignisse durch Abschnitte noch freier Zellströmung unterbrochen werden, wird als Tethering bezeichnet. Aufbauend auf dem Tethering erhöht sich die Anzahl schwachaffiner Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen, was im

Scherstrom der Gefäße zu einer rollenden Bewegung und Verlangsamung der Leukozyten (ca. 20 $\mu\text{m/s}$) entlang des Gefäßendothels führt. Obwohl das Phänomen der Leukozytenakkumulation und Rollbewegung am Endothel im Entzündungsgebiet bereits vor über 100 Jahren mittels intravitalmikroskopischer Untersuchungen erkannt wurde (Cohnheim 1889), konnte erst zu Beginn der 90er Jahre durch die Entdeckung und Klonierung der Rezeptoren der Selektinfamilie die molekulare Grundlage dieser Prozesse vollständig aufgeklärt werden.

Selektine sind Kohlenhydrat-bindende Membranproteine, die entsprechend ihres Ursprungs in L-(Leukozyten), E-(Endothel) und P-Selektin (Plättchen und Endothel) eingeteilt werden. Durch die transiente und schwach affine Bindung ihrer korrespondierenden Liganden vermitteln sie das Leukozyten-„tethering“ und -„rolling“. Die dadurch lokal konzentrierten Leukozyten können nun ihrerseits durch endothelialfreigesetzte Mediatoren wie z.B. Chemokine oder den plättchenaggregierenden Faktor (PAF) in einen aktivierten Zustand gebracht werden (Baggiolini 1997, Zimmermann 1997). Als Ergebnis dieser Aktivierung exprimieren die Leukozyten Rezeptoren der Integrinfamilie, die dann durch Bindung ihrer korrespondierenden Liganden aus der Immunglobulin-Superfamilie die nachfolgende feste Adhäsion der Leukozyten am Endothel und deren Emigration durch interzelluläre Zwischenräume in das entzündete Gewebe vermitteln.

Mittlerweile wurde klar, dass Chemokine von wesentlicher Bedeutung für diese beiden Schritte sind (Sallusto 1998). Die Bindung der Leukozyten an das Endothel beruht auf einer Selektin-vermittelten Kontaktverbindung, gefolgt von einer durch Integrine vermittelten festen Adhäsion. Selektine sind eine Familie transmembranöser Moleküle, die auf der Oberfläche von Leukozyten und aktivierten Endothelzellen zu finden sind. Im Rahmen der Entzündungsreaktion kommt es zu reversiblen transienten Bindungen zwischen Leukozyt und Endothel, wodurch die Fließgeschwindigkeit des Leukozyten wesentlich

abgebremst wird (sog. „rolling“). Schließlich kommt es zu einer festen Bindung der Blutzelle an das Endothel u.a. durch Bindung von leukozytären Integrinen an ICAM - interzelluläre Adhäsionsmoleküle (Gahmberg 1997).

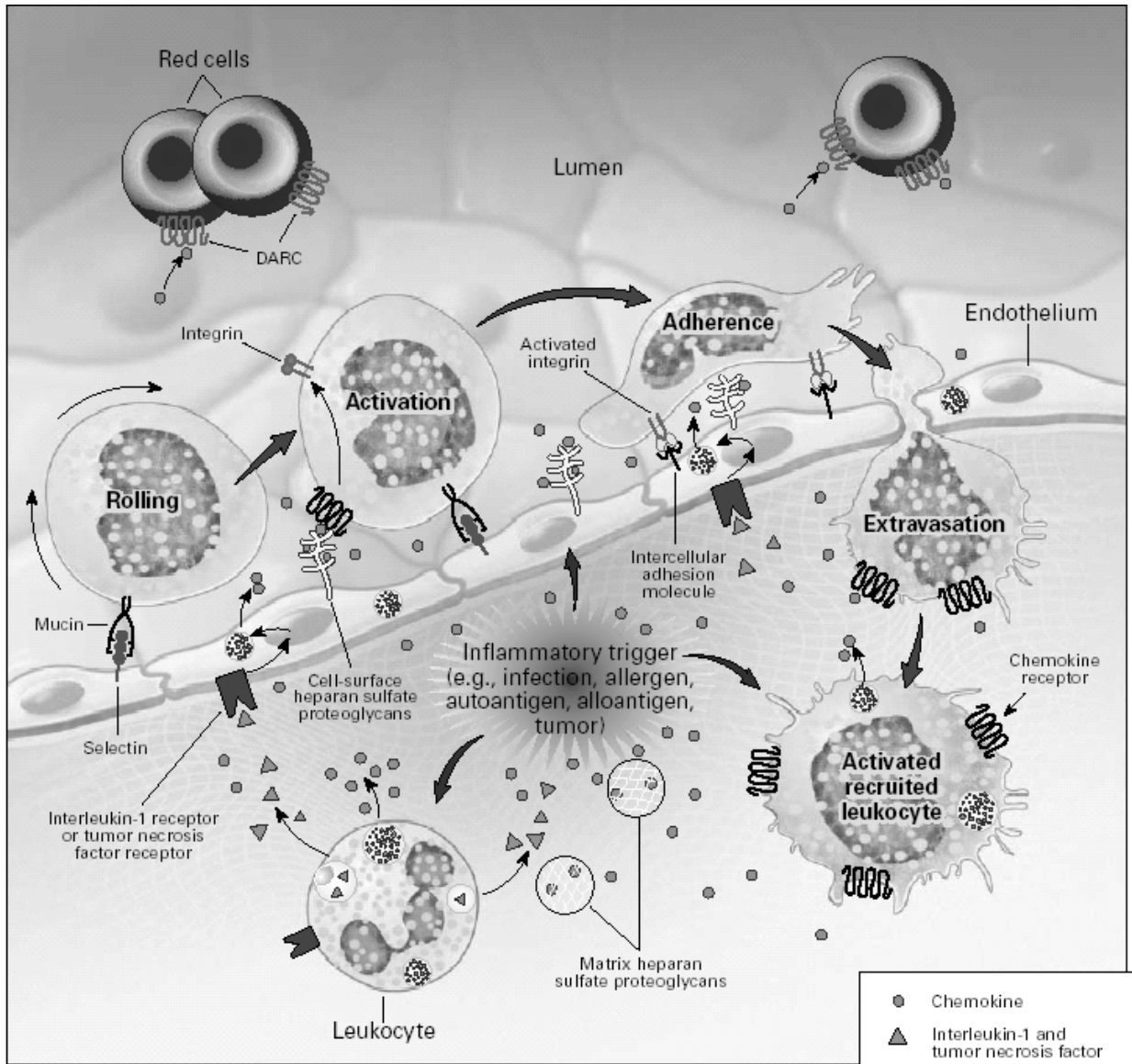


Abbildung 1-11: Der leukozytäre Migrationsprozess (aus LUSTER AD: Chemokines - chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Engl J Med 338, 436-445, 1998)

Es sind Chemokine, die auf der Oberfläche der Endothelzellen exprimiert sind, welche mit den entsprechenden Chemokinrezeptoren auf den Leukozyten interagieren und eine Aktivierung des Integrins bedingen, welche schließlich zu einer festen Bindung an die Endothelzellen führt (Picker 1992, Springer 1994).

Weiterhin wird die Migration der Leukozyten durch das Gewebe zum Zielort ebenso durch Chemokine bedingt, welche von einer Vielzahl von Gewebszellen produziert werden können.

Durch die Expression von verschiedenen Kombinationen von Selektinen, Chemokinrezeptoren and Integrin-Proteinen verfügt ein Leukozyt somit über einen bestimmten „Adresscode“, um an bestimmten Körperzellen die Blutbahn zu verlassen und zu bestimmten Körperstellen vordringen zu können (Foxman 1997).

1.5 Chemokine und Chemokinrezeptoren CCR-2 und CCR-5

1.5.1 Chemokine

Wie bereits oben erwähnt, ist das Anlocken von Leukozyten zu Geweben besonders wichtig in Entzündungsprozessen und der entsprechenden Immunantwort des Wirtes. Dieser Vorgang wird kontrolliert von Chemokinen, welche chemotaktische Zytokine darstellen (Rollins 1997). Über 40 verschiedene Chemokine konnten bis heute identifiziert werden, sie werden anhand der relativen Position ihrer Cystein-Reste unterteilt (Baggiolini 1997). Die Sekretion von Chemokinen konnte bei einer Vielzahl von Erkrankungen festgestellt werden, vor allem bei Entzündungsreaktionen. Jede Tumorerkrankung bedingt auch eine lokale Entzündungsreaktion, jedoch konnte auch eine vermehrte Produktion von Chemokinen durch Tumorgewebe selbst nachgewiesen werden (Strieter 1995, Luster 1998). Funktionell scheinen Chemokine die Möglichkeit zu besitzen, die Migration und Bewegung der Leukozyten relativ genau zu steuern. (Luster 1998, Baggiolini 1997).


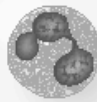

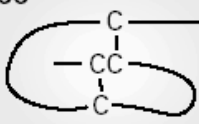




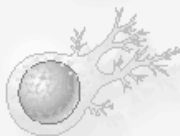


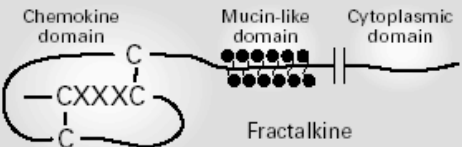
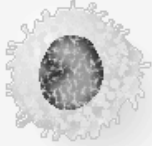
	Chemokine	Receptor	Cell Type
			
	MCP-3, -4; MIP-1 α ; RANTES MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES	CCR1 CCR3	Eosinophil 
	MCP-1, -2, -3, -4, -5 MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES	CCR2 CCR3	Basophil 
CC 	MCP-3, -4; MIP-1 α ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES I-309 MDC, HCC-1, TECK	CCR1 CCR2 CCR5 CCR8 ?	Monocyte 
	Fractalkine	CX ₃ CR1	
	SDF-1	CXCR4	
	MCP-3, -4; MIP-1 α ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 TARC MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES MIP-3 β (ELC) PARC, SLC, 6CKine (Exodus-2)	CCR1 CCR2 CCR4 CCR5 CCR7 ?	Activated T cell 
Fractalkine	CX ₃ CR1		
IP-10, MIG, I-TAC	CXCR3		
C 	PARC, DC-CK1 Lymphotactin	? ?	Resting T cell 
	SDF-1	CXCR4	
	MCP-3, -4; MIP-1 α ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES TARC MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES MIP-3 α (LARC, Exodus-1) MDC, TECK	CCR1 CCR2 CCR3 CCR4 CCR5 CCR6 ?	Dendritic cell 
SDF-1	CXCR4		
CXC 	Interleukin-8, GCP-2 Interleukin-8, GCP-2; GRO- α , - β , - γ ; ENA-78; NAP-2; LIX	CXCR1 CXCR2	Neutrophil 
	Glutamic acid-leucine-arginine		
CXXXC 	MCP-1, -2, -3, -4, -5 MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES	CCR2 CCR5	Natural killer cell 
	Fractalkine	CX ₃ CR1	
	IP-10, MIG, I-TAC	CXCR3	

Abbildung 1-12: Übersicht über die Chemokinrezeptoren (aus LUSTER AD: Chemokines - chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Engl J Med 338, 436-445, 1998)

1.5.2 Chemokinrezeptoren

Entsprechend der Vielzahl an Chemokinen existiert auch eine große Zahl an Chemokinrezeptoren, wobei sich zeigte, dass ein Rezeptor mit einer verschiedenen Zahl an Chemokinen reagieren kann. Nachfolgend wird nur auf die Rezeptoren eingegangen, welche Bestandteil dieser Arbeit waren.

1.5.2.1 Chemokinrezeptor CCR-5

Der Chemokinrezeptor CCR-5 befindet sich auf einer Vielzahl an der Immunreaktion beteiligter hämatopoetischer Zellen, darunter Monozyten, aktivierten T-Lymphozyten, dendritischen Zellen und NK-Zellen. In dieser Arbeit wurde der CCR-5-Rezeptor auf Monozyten untersucht, dessen Liganden MIP (macrophage inflammatory protein)-1 α , MIP-1 β und RANTES auf Monozyten stark chemotaktisch wirken.

Der CCR-5-Chemokinrezeptor hat ein großes Interesse auf sich gezogen, nachdem er als Co-Faktor für die Infektion mit dem humanen Immundefizienz-Virus-1 (HIV-1) identifiziert werden konnte (Choe 1996). Seine physiologische Rolle in der Aktivierung und Migration von Monozyten ist jedoch noch nicht detailliert untersucht worden. Zeidler et al konnten zeigen, dass von Tumoren produziertes Prostaglandin E2 die Monozytenfunktion durch Hemmung der CCR-5-Expression auf Monozyten beeinflusst (Zeidler 2000). Nachdem die Adhäsion und Migration wesentliche Schritte in der Rekrutierung von Effektorzellen in das Tumorstroma und die nachfolgende Bekämpfung der Tumorzellen sind, ist ihre Hemmung für die Tumorentwicklung von Bedeutung (Morisaki 1991).

1.5.2.1.1 Prostaglandin E-2 und COX-2-Hemmer

Wie oben bereits erwähnt, ist ein gut untersuchter, von Tumoren produzierter, immunsuppressiver Mediator das Prostaglandin E2 (Berlinger 1984, Klapan 1991, Mann 1994, Milanovich 1995). So wurde entdeckt, dass in den ersten Wochen nach chirurgischer Entfernung des SCCHN die Konzentration an

PGE-2 im Plasma sich wieder auf niedrigerem Niveau normalisiert (Klapan 1992). Ebenso zeigte sich, dass die Rezeptordichte auf Monozyten nach Inkubation mit PGE-2 ebenso reduziert war wie die Fähigkeit zur Chemotaxis mittels MIP-1b (Thivierge 1998).

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten nunmehr zeigen, dass die Karzinomentstehung durch Inhibierung der Prostaglandinsynthese verzögert oder gar vollständig gehemmt werden kann (Tsuji 1998, Gardiello 1995, Ara 1996, Funkhouser 1995, Steinbach 2000). Dies konnte bisher vor allem für die Entstehung des kolorektalen Karzinoms sowie für das Ösophaguskarzinom nachgewiesen werden, verschiedene, vor allem COX-2-spezifische Substanzen werden derzeit in ihrer Wirkung und vor allem auf ihre Nebenwirkungen untersucht, jedoch ist der genaue tumorprotektive Mechanismus der NSAIDs noch zu bestimmen (Shiff 1999, Taketo 1998).

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, inwiefern Tumor und Tumorstadium einen Einfluss auf die CCR-5-Expression haben.

1.5.2.2 Chemokinrezeptor CCR-2

Der Chemokinrezeptor CCR-2 wird auf Monozyten, Basophilen, aktivierten T-Zellen, NK-Zellen und dendritischen Zellen gefunden. Die Liganden sind MCP-1, -2, -3, -4 und -5 (monocyte chemoattractant protein). MCP wirken ebenfalls chemotaktisch auf Monozyten und induzieren die Expression von Integrinen, welche für die Chemotaxis nötig sind (Jiang 1992, Vaddi 1994). Hier soll nun untersucht werden, inwiefern durch das Vorhandensein eines Malignoms die Expression des CCR-2-Rezeptors beeinflusst wird.

1.6 Mac-1 (CD11b/CD18)

Die Adhäsion der Leukozyten an das Endothel wird über Selektine, Integrine und Endothelrezeptoren gesteuert. Das heterodimere Integrin MAC-1 (auf Monozyten und Granulozyten exprimierbar) mit den Komponenten CD11b und CD18 vermittelt durch Bindung an den Endothelzellrezeptor ICAM-1 die Adhäsion der jeweiligen Leukozyten an das Endothel und die Transmigration der Phagozyten zum Entzündungsherd (Makgoba 1988). Durch Bindung an MAC-1 werden die Zellen am Ort der Entzündungsreaktion gehalten und aktiviert (Burns 1994). Andere Domänen von MAC-1 sind an der Phagozytose opsonierter Partikel durch iC3b-Bindung und an chemotaktischen Prozessen beteiligt Graham (1989). Nach Stimulation der Monozyten, z.B. im Rahmen inflammatorischer oder tumoröser Prozesse, kann sich die Expression von CD11b/CD18 innerhalb kurzer Zeit durch Translokation intrazellulärer Depots auf der Zelloberfläche vervielfachen (Arnaout 1990). Sowohl GCSF als auch GMCSF steigern die Expression von CD11b (de Haas 1994, Socinski 1988).

1.7 CD28 und CTLA-4 (CD152)

Die meisten Immunreaktionen des spezifischen Immunsystems sind abhängig von einer T-Zell-Aktivierung. Dabei erfordert jegliche Aktivierung dieser Zellen notwendig mindestens zwei Signale, die von der antigenpräsentierenden Zelle übermittelt werden müssen. Das erste erfolgt über die Bindung des auf einem MHC-Molekül präsentierten Antigens an einen spezifischen T-Zell-Rezeptor. Das zweite (die so genannte Kostimulation) resultiert aus einer zweiten Kontaktaufnahme der beiden beteiligten Zellen über das B7-Molekül auf der antigenpräsentierenden Zelle und CD28 (einem B7-Rezeptor) auf der T-Zelle.

CTLA-4 ist ebenfalls ein B7-Rezeptormolekül und gleichzeitig ein direkter Gegenspieler zu CD28. Es ist ein für die Lymphozyten spezifischer Marker, der durch Aktivierung der Zelle auf der Oberfläche exprimiert und intrazellulär

akkumuliert wird (Fallarino 1998). Durch die 20fach höhere Affinität zu B7 – verglichen mit CD28 – verhindert es größtenteils die absolut notwendige Kostimulation. Insgesamt werden die Zellen so weniger empfänglich für die Stimulation der antigenpräsentierenden Zellen, produzieren weniger IL-2 („Lymphozytenwachstumsfaktor“) und verharren in einer Art anergischem Zustand. Es lässt sich eine direkte Korrelation zwischen der Höhe der CTLA-4-Produktion von Lymphozyten und ihrer Unempfindlichkeit für die Antigenstimulation aufzeigen (Fallarino 1998).

Die „Master Switch“-Funktion von CTLA-4 (Bluestone 1997) in der Steuerung der Immunantwort (Hyperergie – Normergie – Anergie) wird in unterschiedlichen Fachgebieten der Medizin bereits erforscht. Eine vielzitierte Beobachtung ist zum Beispiel, dass Mäuse ohne genetische Information für das CTLA-4 sehr rasch eine lymphoproliferative Erkrankung entwickeln (Waterhouse 1995). Es gibt auch deutliche Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem Verlauf von Infektionskrankheiten und der Expression von CTLA-4 (Kirman 1999). Nicht zuletzt wird auch die HIV-Infektion durch CTLA-4 beeinflusst. So ist bekannt, dass insbesondere die CD4+ Zellen von HIV-Patienten eine erhöhte Expression von CTLA-4 aufweisen (Steiner 1999). Daneben besteht auch ein deutlicher Zusammenhang mit der Chemokinrezeptorexpression (d. h. der Co-Rezeptoren beim Eindringen von HIV in die CD4-Zellen) und damit der Ausbreitung der Infektion im Organismus (Carroll 1998). Eine kürzlich präsentierte Arbeit (Lang 2001) zeigte bei 93 HIV+ Probanden eine signifikante negative Korrelation zwischen CTLA-4-Expression und CD4-Zellzahl – darüber hinaus interessanterweise aber auch dem Anstieg der CD4-Zellzahl unter antiretroviraler Therapie.

In verschiedenen Arbeiten wird die Ko-Stimulation von CD28 als ein wesentlicher Schritt zur Tumorbekämpfung beschrieben, so berichten z.B. Hombach et al darüber, dass eine Kostimulation des CD28 nötig ist für eine IL-2-Produktion zur weiteren Aktivierung der T-Zell-Reaktionen ebenso wie es

durch eine Steigerung der Interferon-Sekretion tumordefensive Wirkmechanismen in Gang bringt (Hombach 2001).

1.8 TCR-zeta

Über den T-Zell-Rezeptor (TZR) interagieren T-Zellen mit Peptid-MHC-Komplexen. Es ist das Molekül, über das das zelluläre Immunsystem Antigen wahrnimmt. Er liegt in zwei Heterodimeren vor: $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -Rezeptoren. Eine Zelle besitzt normalerweise nur einen TZR einer Klasse. $\alpha\beta$ -TZRs erkennen Antigen nur in Form kurzer Peptide, die von MHC Klasse I- oder MHC Klasse II-Molekülen präsentiert werden. $\gamma\delta$ -TZRs erkennen demgegenüber auch freies Antigen und sind nicht auf Proteine beschränkt. Die Monomere, alle vier sind Teile der Immunglobulin-Superfamilie, sind untereinander mit Disulphidbrücken verknüpft. Sie sind außerdem mit dem CD3-Komplex assoziiert, der aus fünf verschiedenen invarianten Polypeptiden besteht (γ , δ , ϵ , ζ (=zeta) und η) und der die Signalübertragung gewährleistet (Weiss 1994, Paul 1999).

Hierbei erkennt der eigentliche T-Zellrezeptor (alpha- und beta-Kette) das Antigen, der CD3-Komplex vermittelt eine transmembranäre Signalübertragung in die Zelle (Paul 1999). Die zeta-Kette konnte als eine Schlüsseleinheit für den T-Zell-Rezeptorkomplex identifiziert werden, sie nimmt eine zentrale Rolle für die Aktivierung von T-Zellen und NK-Zellen ein (Frydecka 2001). Verschiedene Forschergruppen konnten eine Beziehung der zeta-Kette des TCR im Rahmen von Tumorerkrankungen zeigen: Mulder et al beschreiben eine Verbindung zwischen der Tumor induzierten Immunsuppression bei Mäusen mit der verminderten Expression von TCR-zeta (Mulder 1997), Choi et al berichten über eine Korrelation der Reduktion von TCR-zeta mit fortschreitender Lymphknotenmetastasierung beim Kolonkarzinom (Choi 1998). Isomaki et al konnten zeigen, dass eine durch eine Tumorerkrankung bedingte „Belastung“ des Organismus mit TNF- α mit einer verminderten Expression von TCR-zeta einhergeht (Isomaki 2001). Sikora berichtet von einer verminderten TCR-zeta Expression im Rahmen von Pleuramalignomen (Sikora 2001).

1.9 Aufgabenstellung, Zielgabe

Ein wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, inwiefern Immunzellen (Monozyten, Lymphozyten) von Patienten mit HNO-Karzinomen im Vergleich zu Normalspendern eine Beeinträchtigung ihrer antitumoralen Effizienz aufweisen. Dies erfolgte auf Monozyten zum einen durch eine quantitative Analyse der Rezeptordichte der an der Migration essentiell beteiligten Chemokinrezeptoren CCR5 und CCR2 sowie des Integrins Mac-1. Parallel dazu wurde ein Funktionstest zur Adhäsionsfähigkeit durchgeführt. Die lymphozytäre Funktionseinschränkung durch Tumorbelastung wurde anhand der beschriebenen Rezeptoren CD28/CTLA-4 sowie der zeta-Kette des T-Zell-Rezeptors untersucht.

Der Einfluss auf den Immunstatus und die Fähigkeit des Immunsystems zur adäquaten Reaktion auf ein Tumorgeschehen sollte im Vergleich zwischen einer gesunden Population mit einer Gruppe von an Karzinomen des Kopf- und Halsbereiches Erkrankter untersucht werden. Hierbei sollten vor allem die Unterschiede bezüglich der Tumorstadien sowie die Möglichkeit der Restauration einer supprimierten Immunfunktion dargestellt werden. Weiterhin erfolgte eine Überprüfung, ob sich diese nachgewiesenen Immundefekte nach erfolgter kompletter Tumorsektion entsprechend zurückgebildet hatten.

Außerdem erfolgte die Untersuchung, ob auf Immunzellen gesunder Spender durch Inkubation in Serum von Tumorpatienten Veränderungen der immunologischen Funktionalität hervorgerufen werden können, womit ein Verdacht auf im Serum gelöste immunsuppressive Metaboliten erhärtet würde.

2 Material und Methoden

2.1 Probanden und Kontrollgruppe

Die Blutproben wurden von Patienten der HNO-Klinik des Klinikums Großhadern der LMU München genommen, die mit dem Verdacht auf ein Karzinom im Kopf- und Halsbereich stationär behandelt wurden. Für die Monozytenanalysen wurden insgesamt 57 nicht-vorbehandelte Patienten mit einem histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches untersucht. Die klinischen Daten der Patienten sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Alter	Geschlecht	Tumorlokalisation	T-Stadium	N-Stadium
Ø = 55J (37-88J)	m = 51 w = 6	Mundhöhle = 18	pT1 = 11	pN0 = 27
		Oropharynx = 5	pT2 = 14	pN1 = 6
		Hypopharynx = 17	pT3 = 11	pN2 = 20
		Larynx = 17	pT4 = 21	pN3 = 4

Abbildung 2-1: Überblick der den Monozytenanalysen zugrunde liegenden Patientendaten

Die Kontrollgruppe bestand aus 24 freiwilligen, gesunden Probanden, die aufgrund ihres erhöhten Nikotinkonsums ausgewählt wurden, und 17 Patienten der Klinik, welche nicht wegen einer Tumorerkrankung in Behandlung waren und auch an sonst keiner schweren systemischen Erkrankung litten.

Alter	Geschlecht	Nikotinabusus
Ø = 47J (29-71J)	m = 33	Nein = 17
	w = 8	Ja = 24

Abbildung 2-2: Zusammensetzung der Kontrollgruppe

2.2 Zellen und Zellkultur

2.2.1 Monozyten

Pro Proband wurden 40 ml venöses Vollblut aus der Kubitalvene in heparinisierten Spritzen abgenommen, das Blut anschließend bei 270g für 10 min zentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde abpipettiert und zur weiteren Verwendung tiefgekühlt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zur Präparation peripherer mononuklearer Blutzellen (PBMC) wurden die gewonnenen Blutzellen in PBS (Phosphatpufferlösung) übertragen und in 50 ml Falcon-Röhrchen auf eine 15 ml - Säule FiColl-Lösung mit einem Dichtegradienten von 1,077 g/ml (Biochrom KG, Berlin) aufgeschichtet. Nach Zentrifugation für 25 min bei 770g $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und Auslauf ohne Bremse konnte die mit mononuklearen Zellen angereicherte Schicht sorgfältig abpipettiert und in ein frisches 50 ml Röhrchen, das 5 ml kaltes PBS enthielt, überführt und auf 50 ml mit dieser Lösung aufgefüllt werden. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 270g für 10 min. Dieser Waschschrift wurde zweimal durchgeführt. Das so entstandene Pellet wurde in 10 ml DMEM – Medium (Seromed Biochrom KG, Berlin), supplementiert mit 1 mM/ml Natrium-Pyruvat Lösung, 20 mM/ml HEPES-Puffer, 1mM/ml nichtessentiellen Aminosäuren – Lösung und 100 U/ μg /ml Streptomycin-Penicillin (alle von PAA Laboratories GmbH, Linz), bei 5% fetalem Kälberserum FCS (seromed Biochrom KG, Berlin) auf eine Zellkulturschale (Nunclon von Nunc, Dänemark) gegeben und 1 Stunde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in befeuchteter Atmosphäre bei 5% CO_2 in Luft im Brutschank inkubiert. Nach 1 Stunde wurde der Überstand abgenommen und die Kulturschale zweimal mit PBS gewaschen. Die auf der Plastikoberfläche verbliebenen Zellen stellten die Monozytenpopulation dar. Durch dieses Verfahren gelang es, eine Monozytenpopulation mit bis zu 60% Reinheit zu gewinnen (Kontrolle durch FACS-Analyse). Anschließend wurden jeweils 10^5 Monozyten in DMEM in zwei verschiedenen Kulturschalen mit 10% Serum über 2 Tage bei o.a. Bedingungen nach folgendem Schema inkubiert:

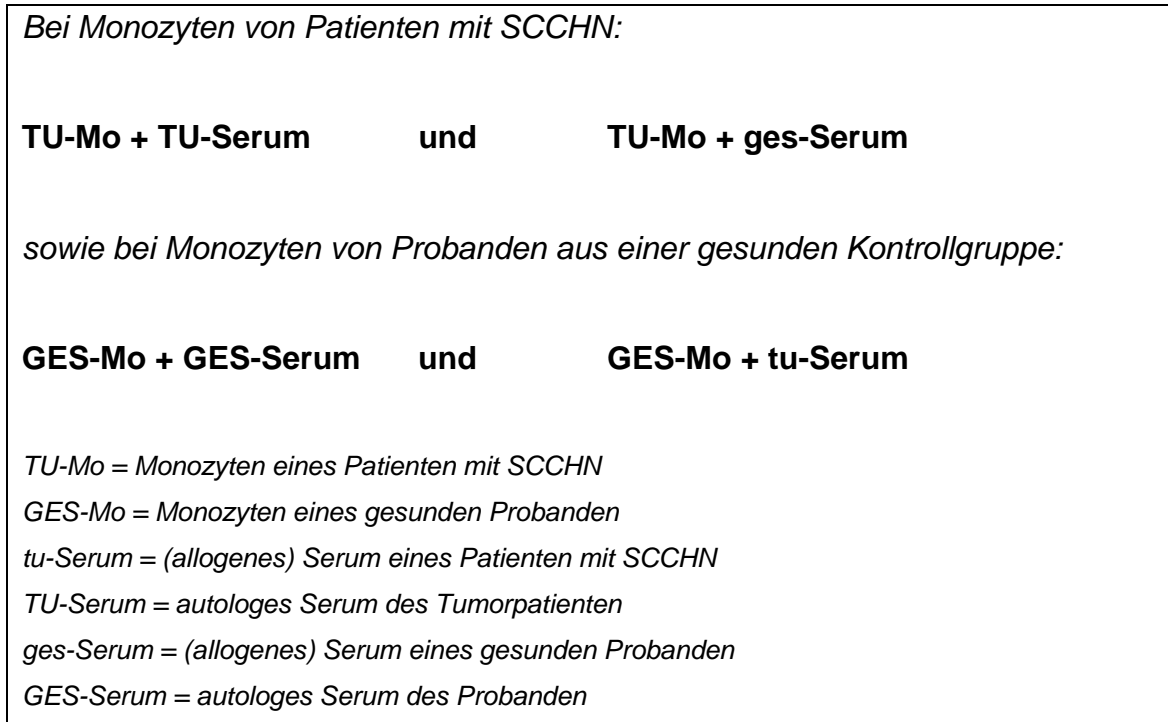


Abbildung 2-3: Inkubationsschema Monozyten

Nach 2 Tagen wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Plastikoberfläche abgeschabt und in PBS zweimal gewaschen, anschließend gezählt mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer.

2.2.2 Lymphozyten

Die Lymphozyten wurden nach demselben Verfahren wie die Monozyten gewonnen. Es wurde der Überstand nach der einstündigen Inkubation, also die nichtadhärenten Zellen als Lymphozytenpopulation betrachtet, Analysen erbrachten einen hohen Reinheitsgrad von über 95%.

Bei Lymphozyten von Patienten mit SCCHN:

TU-Ly + TU-Serum	und	TU-Ly + ges-Serum
-------------------------	------------	--------------------------

sowie bei Lymphozyten von Probanden aus einer gesunden Kontrollgruppe:

GES-Ly + GES-Serum	und	GES-Ly + tu-Serum
---------------------------	------------	--------------------------

TU-Ly = Monozyten eines Patienten mit SCCHN
GES-Ly = Monozyten eines gesunden Probanden
tu-Serum = (allogenes) Serum eines Patienten mit SCCHN
TU-Serum = autologes Serum des Tumorpatienten
ges-Serum = (allogenes) Serum eines gesunden Probanden
GES-Serum = autologes Serum des Probanden

Abbildung 2-3: Inkubationsschema Lymphozyten

Außerdem wurden folgende Ansätze versucht:

a)

TU-Ly + PCI-1-SN	und	TU-Ly + 10% FCS
ges-Ly + 10% FCS	und	ges-Ly + PCI-1-SN

TU-Ly = Monozyten eines Patienten mit SCCHN
ges-Ly = Monozyten eines gesunden Probanden
PCI-1-SN = Überstand einer im eigenen Labor etablierten Tumor-Zelllinie (10% FCS)
FCS = fetales Kälberserum

Abbildung 2-4: Inkubation in Tumorzell-Überstand

b)

TU-Ly + FADU-SN	und	TU-Ly + 10% FCS
ges-Ly + 10% FCS	und	ges-Ly + FaDU-SN

TU-Ly = Monozyten eines Patienten mit SCCHN
ges-Ly = Monozyten eines gesunden Probanden
FaDu-SN = Überstand einer im eigenen Labor etablierten Tumor-Zelllinie (10% FCS)
FCS = fetales Kälberserum

Abbildung 2-5: Inkubationsschema Lymphozyten mit Überstand einer FaDU-Zelllinie

2.3 FACS-Analyse

2.3.1 Monozyten

Die wie unter 2.1.1 beschrieben behandelten Monozyten wurden gezählt, je 1×10^6 Zellen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und einmal gewaschen und in 50 μ l FACS-Puffer (= PBS + 10% FCS) resuspendiert. Die Markierung der Monozyten wurde wie in den Anleitungen beschrieben durchgeführt unter Verwendung folgender m-AK (monoklonaler Antikörper): anti-CCR-5 (fluorescein isothiocyanate (FITC)-konjugiert, Maus-IgG2a, Pharmingen, San Diego CA) in Verdünnung 1:50, anti-CD11b (FITC-konj., Maus-IgG1, Cymbus Biotechnology Ltd, Chandlers Ford, UK) in Verdünnung 1:25, anti-CCR-2 (unkonjugiert, Maus-IgG2b, R&D Systems, Wiesbaden) in Verdünnung 1:50 wurde benutzt in Verbindung mit einem sekundären FITC-konjugierten goat anti-mouse AK (Jackson Immuno Research, West Grove, PA), Verdünnung hier ebenfalls 1:50. FITC-konjugierte IgG1 Isotyp-Kontrollen (Coulter Immunotech, Marseille) wurden in allen Experimenten benutzt, jeweils in Verdünnung 1:50. Die Zellen wurden für 20 min mit den m-AK bei 4°C inkubiert und danach gewaschen (bei CCR-2 nochmaliges Inkubieren mit dem sekundären AK und anschließendes Waschen). Die Immun-Markierung wurde anschließend mittels Durchflußzytometrie (FACS) gemessen, wobei ein FACScan und die CellQuest Software verwendet wurde (beides von Becton Dickinson, San José, CA). Um eine möglichst reine Monozytenpopulation zu messen, wurde auf Monozyten mittels forward scatter vs side scatter ge-gated.

2.3.2 Lymphozyten

Die Durchflußzytometrie wurde ebenso an aktivierten Lymphozyten durchgeführt. Die Aktivierung gelang durch Inkubation mit 1 μ g/ml Phytohemagglutinin (PHA, von seromed Biochrom KG, Berlin), gleichzeitig mit den Seren. Die Lymphozyten wurden zunächst mit Hilfe einer 5,5%igen Formalinlösung fixiert, anschließend mit einer saponinhaltigen Lösung

permeabilisiert (beide aus dem IntraPrep Permeabilisierungs- Kit von Coulter Immunotech, Marseille) und in Verdünnung 1:10 mit anti-CTLA-4 (Pharmingen, San Diego, CA), respektive 1:10 verdünnt anti-TCR-zeta (Coulter Immunotech) markiert. Diese Behandlung war nötig, da diese beiden Strukturen intrazellulär liegen. Für die oberflächliche Markierung mittels anti-CD28 (Coulter-Immunotech, Maus IgG1 Verdünnung 1:10) war die Fixierung und Permeabilisierung nicht notwendig. Auch hierbei wurden o.g. IgG1-Isotyp Kontrollen mit analysiert.

2.4 Monozyten-Adhäsionsassay

Zunächst zur Herstellung eines rekombinanten ICAM-1/Fc-Fusionsproteins wurden 5×10^6 HEK293-Zellen per Elektroporation mit einem Expressionsplasmid (dankenswerterweise erhalten von Prof. Dr. W. Kolanus, München) transfiziert. Der Überstand dieser Zellen wurde nach 4 Tagen abgenommen und bei frisch verwendet. Für die Adhäsionsversuche wurden zunächst 96-Loch-Zellkulturplatten mit einem monoklonalen murinen Antikörper beschichtet, der spezifisch humane Immunglobuline der Subklasse IgG bindet (0.1 mg/ml in 0,1M Tris-HCl, pH 9,5; für 3 Stunden bei 4°C). Nach dreimaligem Waschen zur Entfernung nicht-gebundener Antikörper wurden die Zellkulturplatten über Nacht bei +4°C mit dem Überstand der transfizierten 293-Zellen inkubiert. Als Kontrolle wurden Platten verwendet, die nur mit dem murinen Antikörper beschichtet waren. Danach wurden Monozyten auf die ICAM-präsentierende Oberfläche der wells gegeben.

Pro Probe wurden 3 „wells“ präpariert, zu jedem dieser „wells“ wurden 6×10^4 Zellen in 250 µl DMEM gegeben, die Platte anschließend über 60 min im Brutschank inkubiert und danach wurde die Zahl der eingesetzten Zellen überprüft. Dies erfolgte mikroskopisch durch zufällige Wahl von 5 Gesichtsfeldern bei 50-facher Vergrößerung. Die erhaltenen 15 Werte (drei mal fünf) wurden gemittelt. Dies galt als Ausgangswert der Zellzahl. Nun konnten die „wells“ dekantiert und mit PBS aufgefüllt werden. Dieser

Waschschritt wurde zweimal durchgeführt. Anschließend wurde die Zahl der adhärennten Zellen wieder nach o.g. Methode mikroskopisch bestimmt.

Zusätzlich zur mikroskopischen Auswertung wurde zur Kontrolle auch folgendes Verfahren angewandt: Die nach der Magnetseparation gewonnenen Monozyten wurden in 10 ml DMEM gegeben und für 15 min im Brutschank mit 2 μ l des 1M Fluoresceinfarbstoffes CMFDA (Molecular Probes, Eugene, OR) inkubiert. So konnten zusätzlich zur Mikroskopie der Zellen auch die jeweiligen Grade der Fluoreszenz mit einem Wallac Victor2 – Reader bestimmt werden.

Zuvor war aus PBMC nach dem Verfahren der Säulenpräparation mit dem Mini Macs-System eine über 75% reine Monozytenpopulation gewonnen worden. Das System beruht auf Magnetseparation (MACS-System, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach). Die Zellen werden hierzu nach dem letzten Waschgang der Ficoll-Präparation mit einem an magnetische „beads“ gekoppelten anti CD14 mAK für 15 min im Kühlschrank inkubiert, mit 1 ml MACS-Puffer gewaschen und die CD14 positiven Zellen über magnetische Chromatographiesäulen angereichert.

2.5 Statistische Analyse

Die Resultate werden als Mittelwert oder Mittelwert \pm Standardabweichung vom Mittelwert angegeben. Die Unterschiede der Ergebnisse wurden für die Adhäsionsassays und die ICAM-1-Konzentrationsbestimmung mit dem student-t-test auf Signifikanzniveau überprüft. Für die Monozytenanalysen wurde der Wilcoxon-Test verwendet, die Unterschiede innerhalb der Parameter Tumorgröße, Lymphknotenbefall und Tumorgrading wurden mit Hilfe des Mann-Whitney u-tests berechnet. Die Ergebnisse wurden jeweils bei $p < 0,05$ als signifikant angenommen. Die Anzahl der im selben Ansatz durchgeführten Versuche wird jeweils als n angegeben.

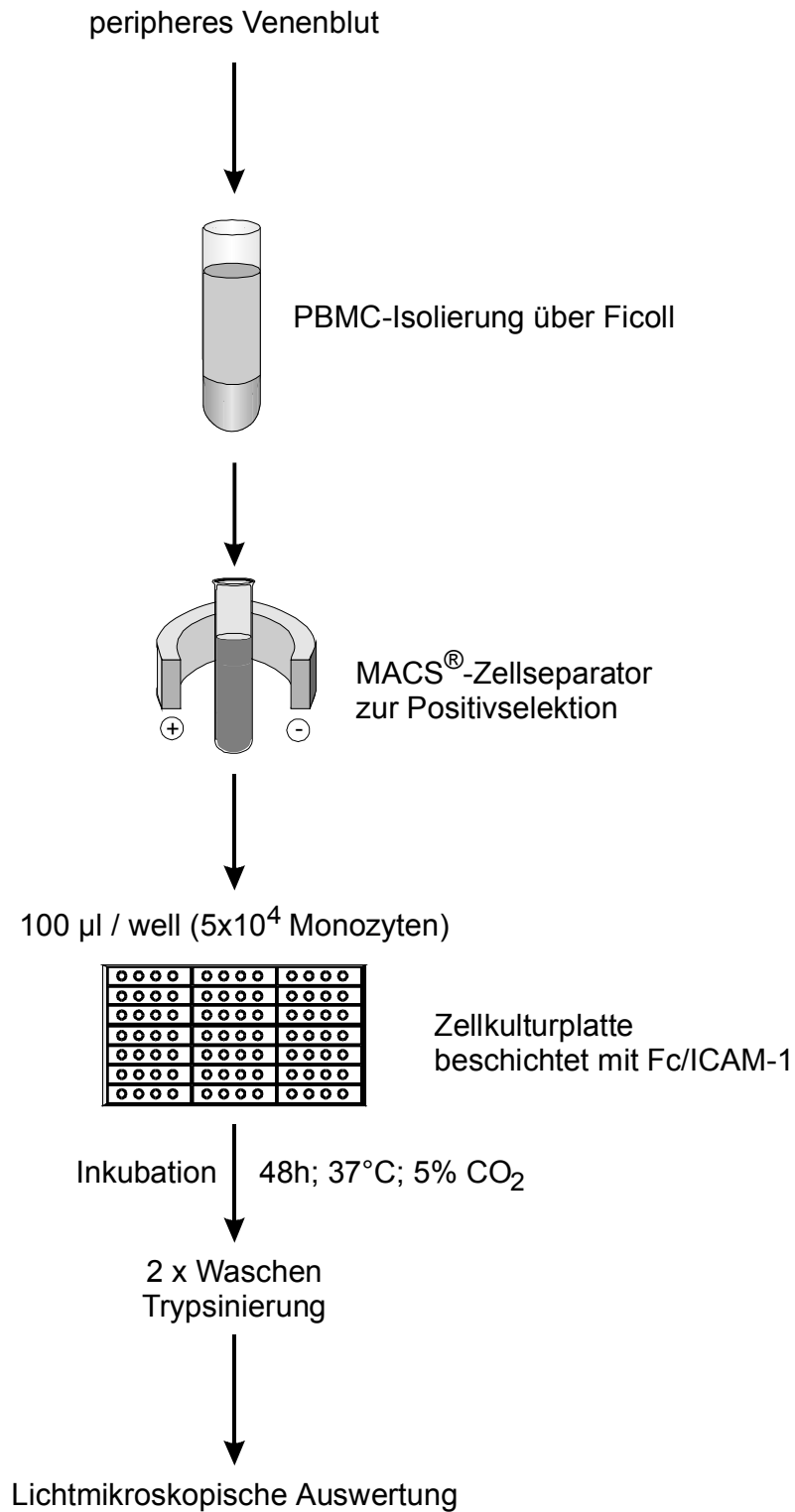


Abbildung 2-6: Adhäsionsassay

3 Ergebnisse

3.1 Analyse von antitumoral bedeutsamen Oberflächenmolekülen auf Immunabwehrzellen – Monozytenanalysen

3.1.1 CCR5

3.1.1.1 Vergleich Tumorpatienten - gesunde Probanden

Von Patienten der Hals-Nasen-Ohrenklinik Großhadern mit einer Karzinomdiagnose sowie einer Gruppe gesunder Probanden wurden Monozyten nach dem unter 2.2.1 beschriebenen Schema der Plastikadhäsion gewonnen. Diese wurden jeweils über 48 Stunden in autologem (eigenem) Serum inkubiert. Anschließend wurden die Chemokinrezeptoren mit monoklonalen, FITC-markierten Antikörpern gebunden (siehe Material und Methoden) und mittels FACS die Rezeptordichte analysiert.

Es zeigte sich, dass die CCR5-Expression bei der gesunden Kontrollgruppe signifikant höher lag ($p=0,0280$) als bei der Gruppe der Patienten. Die absoluten Messwerte bei Gesunden waren durchschnittlich 29,0% höher als bei Tumorpatienten. Zur Kontrolle des mikroskopisch ermittelten Ergebnisses wurde auch die MFIR (mean fluorescence intensity ratio) bestimmt: hier wird der absolute Messwert des an CCR5-gebundenen FITC durch den Wert einer FITC-Isotypkontrolle geteilt. Auch in der MFIR zeigten sich signifikant höhere CCR5-Werte bei den Gesunden ($p=0,0340$).

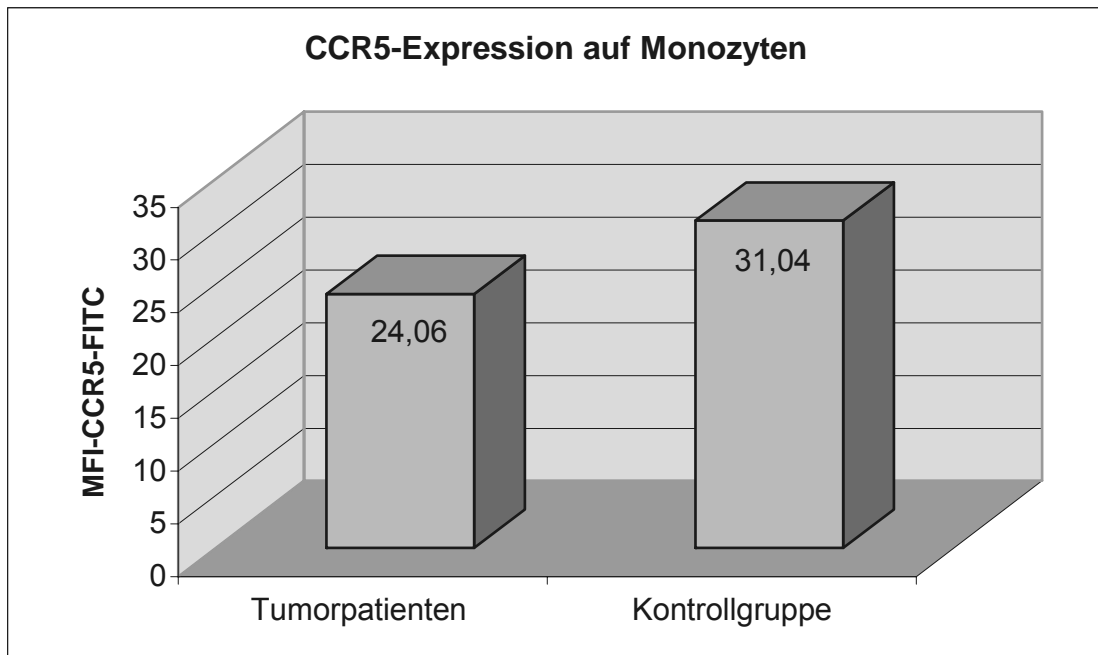


Abbildung 3-1: Die Expression von CCR5 liegt bei der gesunden Kontrollgruppe höher ($p=0,0280$); $SD(Tu)=12,91$; $SD(Ko)=12,84$; $n(Tu)=40$; $n(Ko)=30$

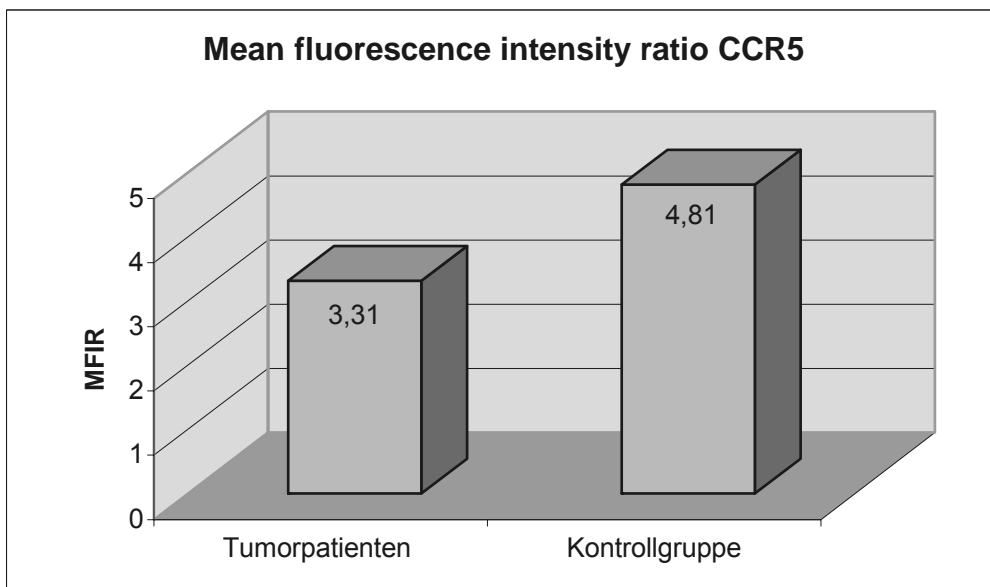


Abbildung 3-2: Signifikant höhere Rezeptorexpression für CCR5 auf Monozyten der gesunden Kontrollgruppe ($p=0,0340$); $SD(Tu)=1,91$; $SD(Ko)=3,28$; $n(Tu)=38$; $n(Ko)=27$

3.1.1.2 Monozyten von Tumorpatienten

Ausgehend vom Direktvergleich wurde nun untersucht, ob sich der Grad der Rezeptorexpression bei Tumorpatienten durch die Inkubation mit Serum der gesunden Kontrollprobanden beeinflussen lässt. Es wurden hierbei Monozyten von Tumorpatienten jeweils über 48 Stunden in autologem Serum sowie in Serum gesunder Probanden inkubiert. Anschließend wurden wiederum die Chemokinrezeptoren mit monoklonalen, FITC-markierten Antikörpern gebunden und die Rezeptordichte analysiert.

3.1.1.2.1 Gesamtdaten

Nach Inkubation mit den jeweiligen Seren zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Rezeptordichte an CCR5. Die Rezeptorexpression war nach Inkubation mit Serum gesunder Normalspender (nS) signifikant höher ($p=0,0004$) als nach Inkubation in autologem Serum (desselben Patienten) (tS). Die Rezeptordichte lag im Mittel um 22% höher nach Inkubation mit „gesundem“ Serum, im Median um 44% höher. Dieser Vorgang wird in den nachfolgenden Kapiteln als „Upregulation“ bezeichnet (höhere Rezeptordichte nach Inkubation mit Serum gesunder Spender).

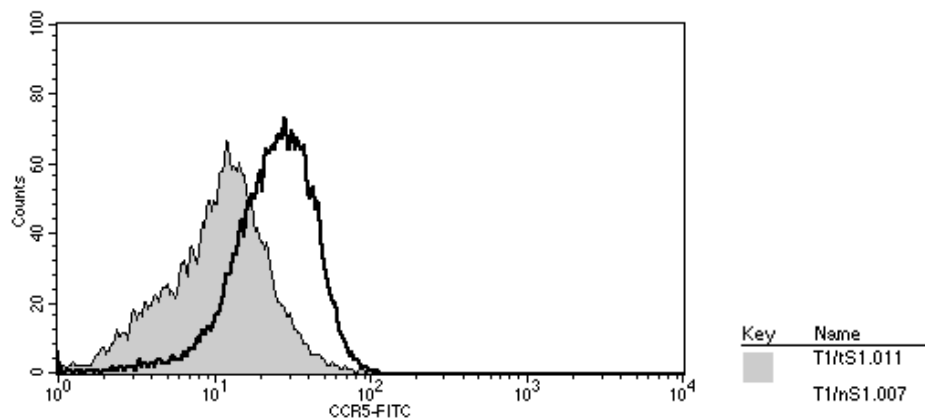


Abbildung 3-3: Beispielhafte Darstellung der Upregulation CCR5 auf Tumormonozyten (in grau dargestellt Messwerte mit Serum von Tumorpatient, mit fetter Linie dargestellt die Messwerte mit Serum von Kontrolle)

Der Grad der Upregulation wurde wie folgt berechnet: $(MFI(TnS) - MFI(TtS)) / MFI(TtS)$ und gibt in Prozent an, wie stark eine Veränderung der Messwerte nach oben durch Inkubation in Serum gesunder Spender erreicht wurde.

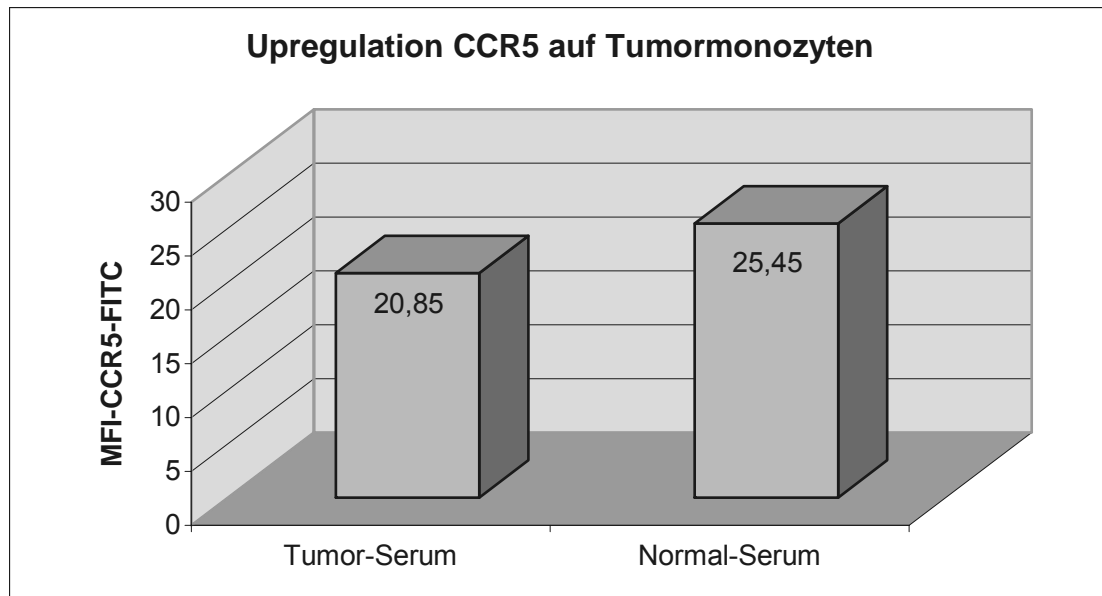


Abbildung 3-4: Nach Inkubation von Monozyten von Tumorpatienten mit Serum gesunder Normalspender war die CCR5-Expression signifikant erhöht ($p=0,0004$); $SD(tS)=12,75$; $SD(nS)=12,76$; $n=40$

3.1.1.2.2 Vergleich zwischen TumorgroÙe

Bei der Ermittlung der Werte deutete sich ein Unterschied in der Rezeptordichte bei Karzinompatienten mit kleineren Tumoren gegenüber denen mit größer gewachsenen Tumoren an. Postoperativ wurden die Tumore nun durch die Pathologie anhand der TNM-Klassifikation histologisch bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Rezeptordichte bei Patienten mit großen Tumoren (pT3 und pT4) geringer war als bei Patienten, bei denen das Karzinom als kleiner bestimmt wurde (pT1 und pT2). So lagen die Messwerte nach Inkubation im eigenen Serum im Schnitt bei Patienten mit großen Tumoren um 7,9% unter denen von an kleineren Tumoren Erkrankten, bei der statistischen Auswertung konnte jedoch keine Signifikanz errechnet werden.

Weiterhin fiel auf, dass nach Inkubation mit Serum gesunder Probanden sich die Messwerte bei T3/4-Tumoren in stärkerem Maße erhöhten als bei kleinen Tumoren. Deshalb wurde nun untersucht, ob sich ein Unterschied in der oben beschriebenen Upregulation feststellen ließ. Hierbei zeigte sich, dass die Hochregulation nach „Gabe“ von gesundem Serum stärker ausgeprägt war, wenn der Tumor als histologisch groß gewertet wurde (im Median 26,4%-Erhöhung bei Ausgangslage pT3/4 gegenüber 15,0% bei pT1/2), jedoch konnten diese Ergebnisse nicht als statistisch signifikant gewertet werden ($p=0,2735$).

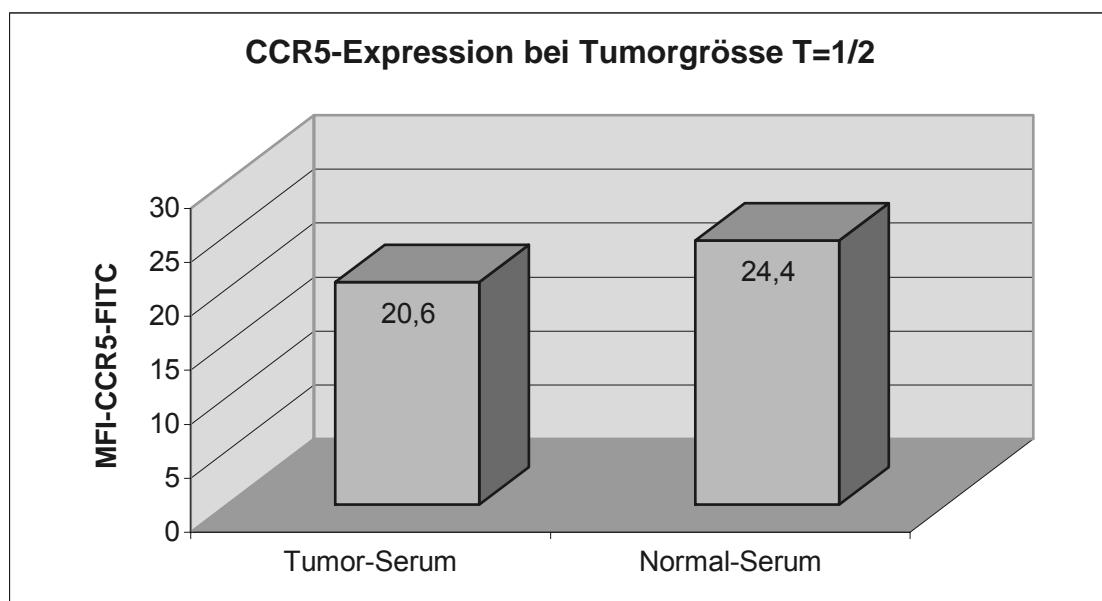


Abbildung 3-5: Hochregulation CCR5 bei Monozyten von Karzinompatienten mit histologisch kleinen Tumoren; SD(tS)=9,7; SD(nS)=12,4; n=14

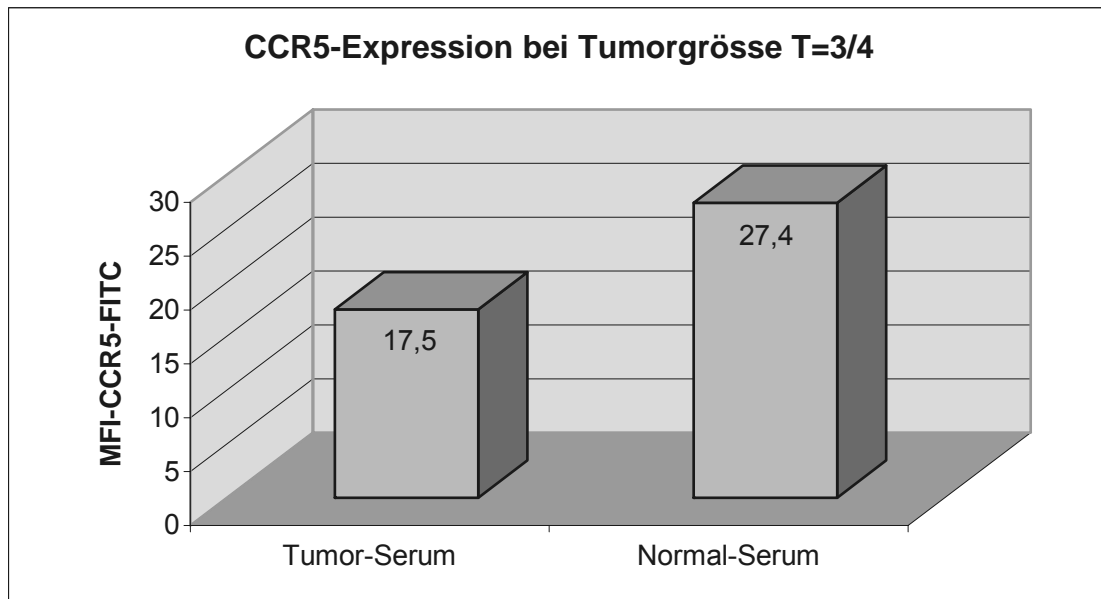


Abbildung 3-6: Stark ausgeprägter Effekt der Heraufregulation von CCR5 bei Monozyten von mit großen Karzinomen belasteter Patienten; SD(tS)=12,0; SD(nS)=11,4; n=23

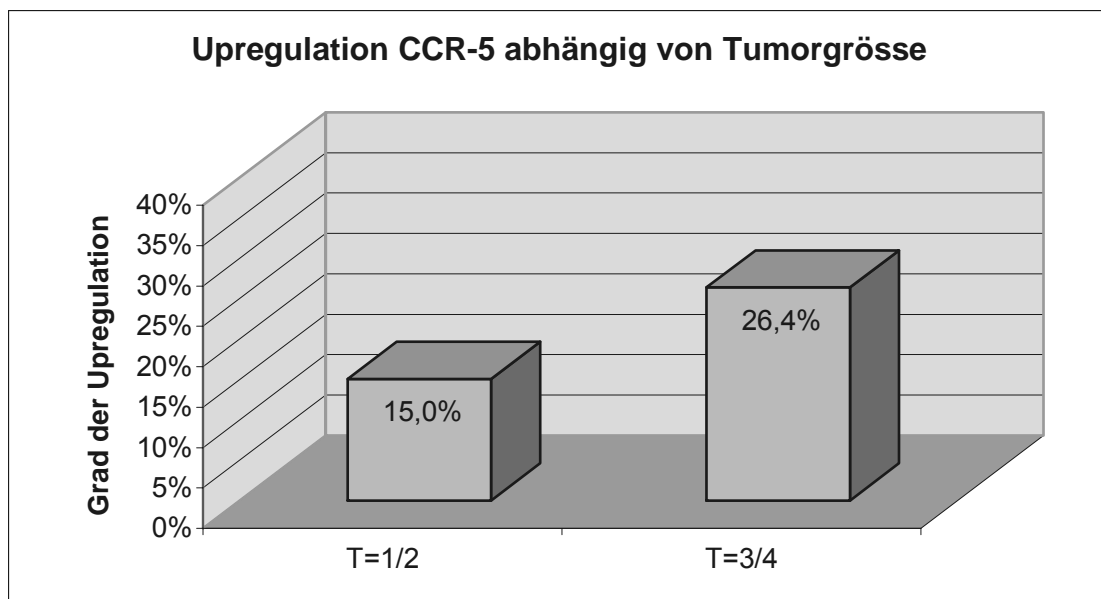


Abbildung 3-7: Vergleich des Grades der Heraufregulation von CCR5 bei Tumorpationen abhängig von der Tumorgröße; SD(1/2)=0,221; SD(3/4)=0,304; n(1/2)=14; n=3/4)=23

3.1.1.2.3 Vergleich im Lymphknotenbefall

Analog zur den eben genannten Ergebnissen konnten ebenso Unterschiede in der CCR5-Rezeptorexpression zwischen Patienten, bei denen keine regionären Lymphknoten befallen waren und bei solchen, welche schon einen

Lymphknotenbefall aufwiesen, festgestellt werden. So war die CCR5-Rezeptordichte nach Inkubation im eigenen Serum bei Lymphknotenbefall um durchschnittlich 16,2% (Median 24,9%) unter den Messwerten bei Patienten, bei denen keine regionären Lymphknotenmetastasen festgestellt wurden, ohne dass auch hier statistische Signifikanz errechnet werden konnte.

Analog zu den obigen Ergebnissen wurde nun auch der Unterschied des „Upregulation“-Effektes untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter ($p=0,0091$) Unterschied in der Hochregulation der Rezeptordichte besteht, abhängig davon, ob das Malignom bereits mit Lymphknotenbefall einherging oder nicht. So betrug die Upregulation bei bereits erfolgtem Lymphknotenbefall durchschnittlich 39,5%, während die Rezeptordichte ohne befallene Lymphknoten nur 9,4% betrug.

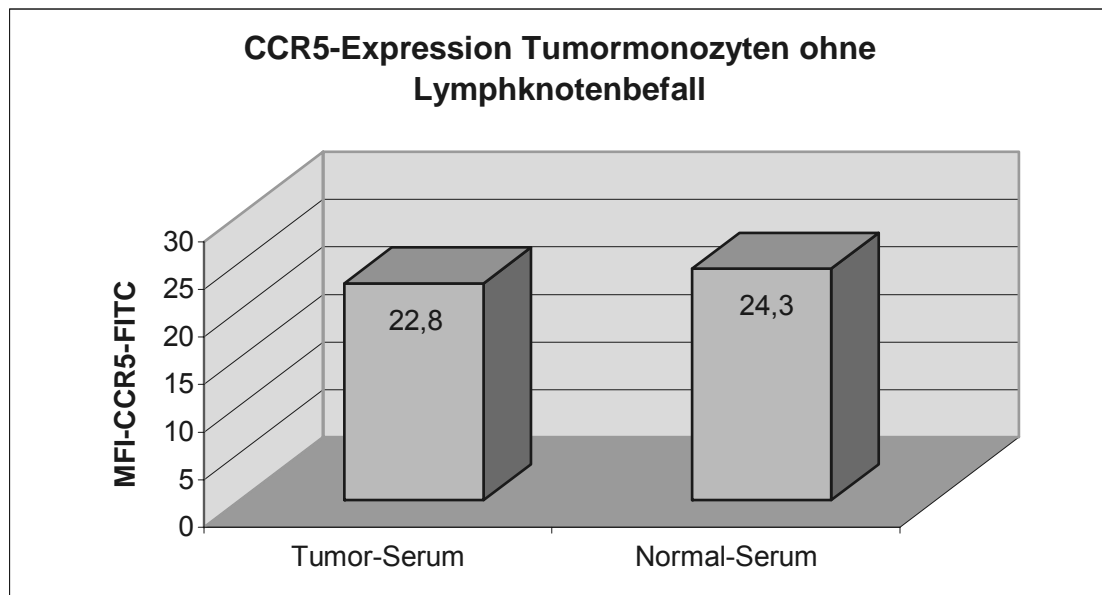


Abbildung 3-8: Nur geringgradige Upregulation von CCR5, wenn noch keine Lymphknotenmetastasen nachzuweisen waren; $SD(tS)=12,0$; $SD(nS)=12,4$; $n = 17$

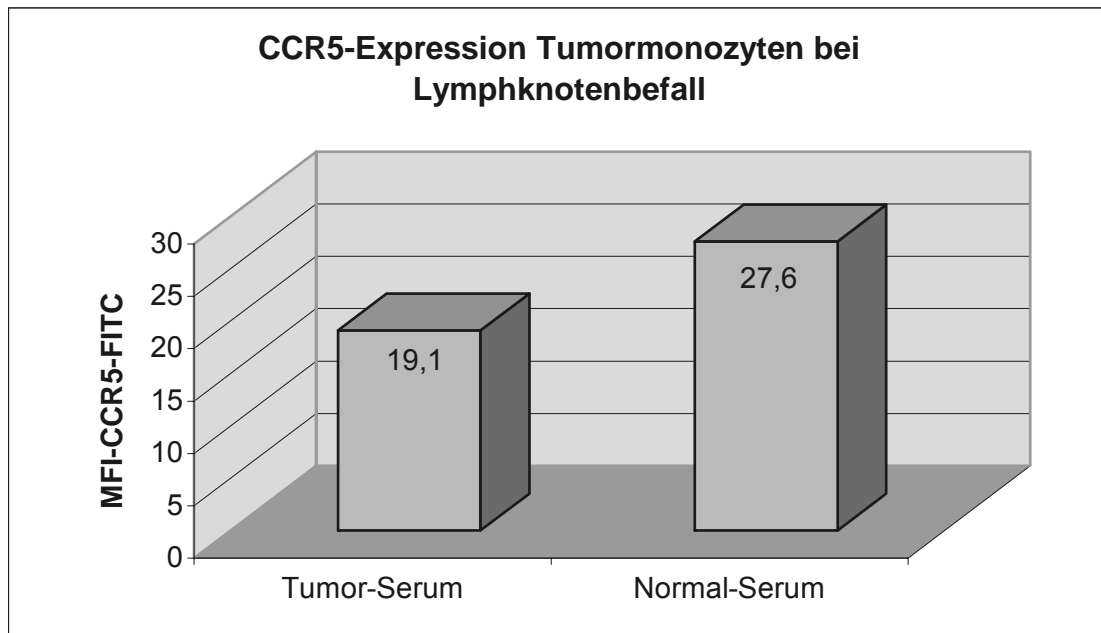


Abbildung 3-9: Upregulation des CCR5 bei lymphonodulär-positiven Karzinompatienten; SD(tS)=10,0; SD(nS)=12,1; n=19

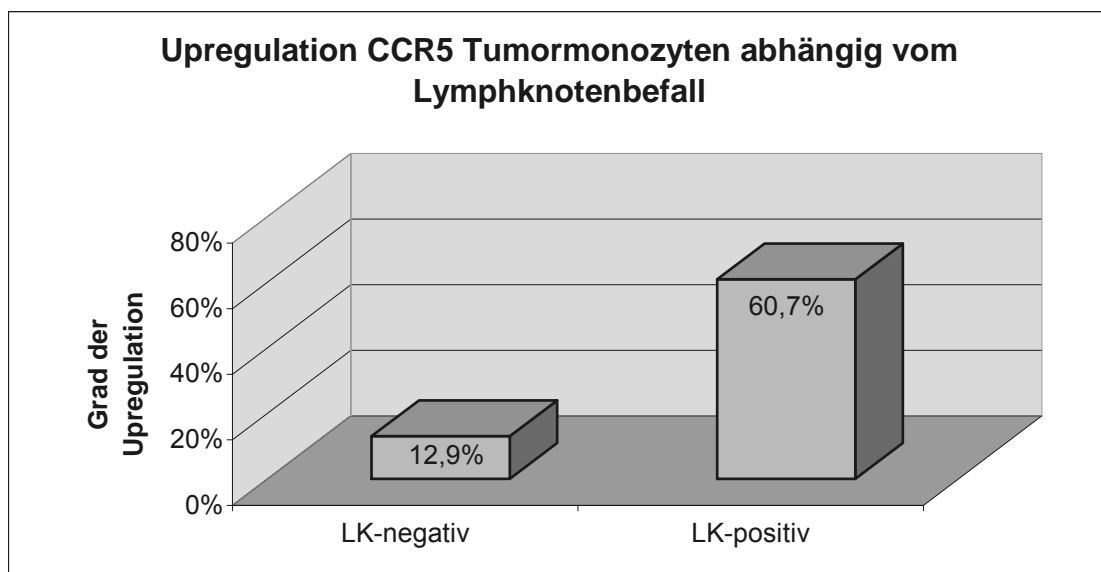


Abbildung 3-10: Signifikant stärkere Heraufregulation ($p=0,0091$) von CCR5 auf Monozyten von Karzinompatienten, sofern bereits Lymphknotenbefall nachgewiesen werden konnte; SD(neg)=0,278; SD(pos)=0,451; n(neg)=17; n(pos)=19

3.1.1.2.4 Vergleich im Tumorigradung

Wie vorher bereits für die Tumorgöße und den Parameter Lymphknotenmetastasen wurden die Messwerte auch abhängig vom

Tumorgrading analysiert. Hierbei wurde die Gruppe gut bis mäßig differenzierter Tumoren (Tumorklassifikation G1 oder G2) gegen die Gruppe schlecht- bis entdifferenzierter Tumoren (Grading = G3, G4) untersucht. Das Grading gibt insofern Hinweise auf die biologische Qualität von Karzinomen, als niedrig differenzierte im Allgemeinen eine höhere Progressionsneigung zeigen. Weiterhin ist das Grading auch ein prognostisch wichtiger Faktor, da Patienten mit einem gut differenziertem Malignom eine geringere Rezidivrate aufweisen als an einem entdifferenzierten Karzinom Erkrankte.

Bei der Untersuchung zeigte sich im Folgenden, dass die Rezeptorexpression nach Inkubation mit eigenem Serum bei Patienten mit schlecht differenzierten Tumoren um durchschnittlich 19,3% unter der Expression bei Tumoren mit höherem Differenzierungsgrad liegt, jedoch auch hier keine statistische Signifikanz aufwies.

Entsprechend den obigen Berechnungen wurde auch hier wieder gezeigt, dass der Effekt der Upregulation bei schlecht differenzierten Tumoren stärker (37,6%) ausgeprägt ist als bei denen mit guter Differenzierung (10,4%), das Signifikanzniveau wurde hier jedoch mit $p=0,0558$ knapp verfehlt.

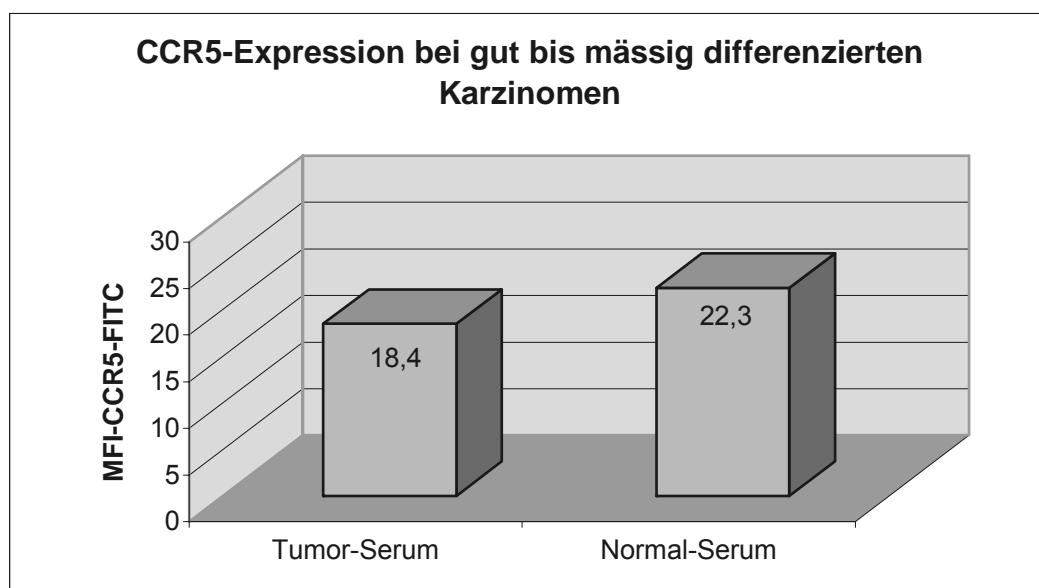


Abbildung 3-11: Mäßige Heraufregulation von CCR5 bei Grading G1 oder G2; SD(tS)=10,5; SD(nS)=12,6; n=18

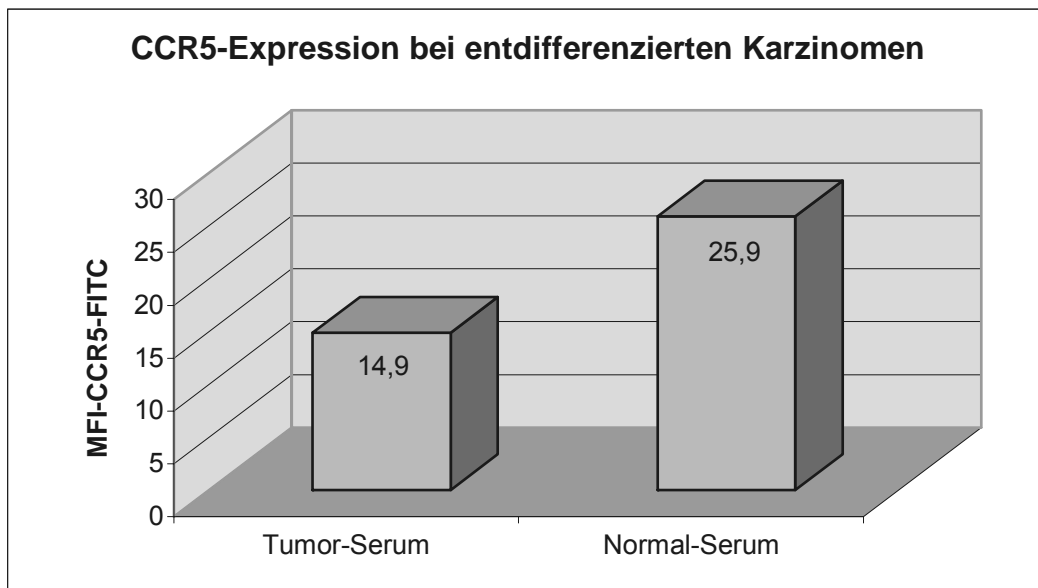


Abbildung 3-12: Stark ausgeprägte Heraufregulation von CCR5 bei entdifferenzierten Tumoren; SD(tS)=11,9; SD(nS)=10,4; n=16

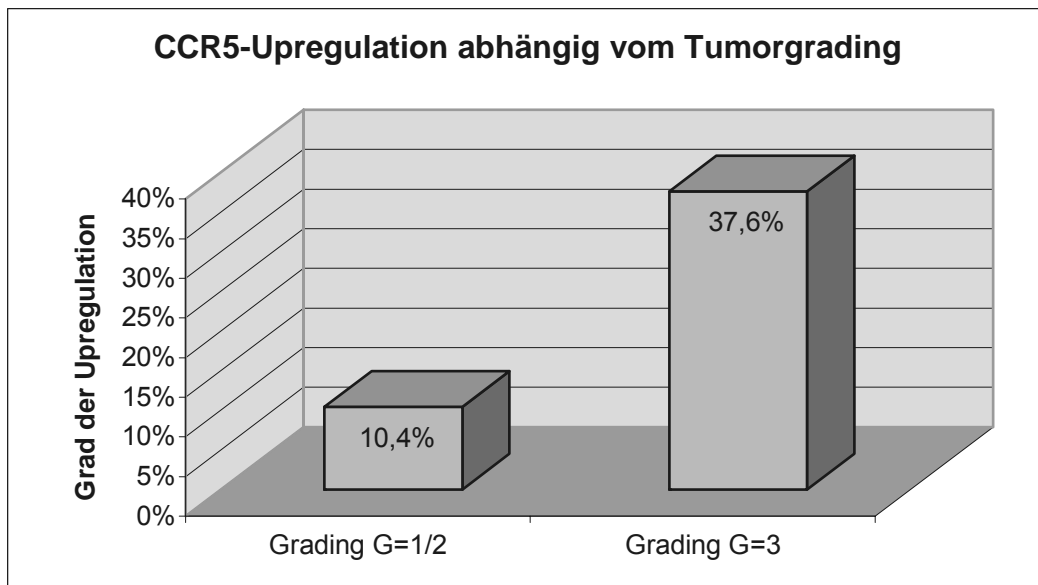


Abbildung 3-13: Der Effekt der Upregulation von CCR5 nach Inkubation der Monozyten in Serum gesunder Spender war deutlich stärker bei schlecht differenzierten Tumoren (p=0,0558); SD(1/2)=0,443; SD(3)=0,715; n(1/2)=18; n(3)=16

3.1.1.3 Monozyten der gesunden Kontrollgruppe

3.1.1.3.1 Gesamtdaten

Ausgehend von den Ergebnissen, die zeigten, dass Tumorpatienten eine erniedrigte CCR5-Expression aufweisen, wurde analog der obigen Versuche untersucht, ob sich durch Inkubation mit Serum dieser Tumorpatienten eine Herabregulation der Chemokinrezeptoren auf Monozyten gesunder Probanden feststellen lässt. Dazu wurden wie beschrieben Monozyten gesunder Spender jeweils 2 Tage mit dem autologen Serum bzw. mit dem Serum von Patienten, die an einem Karzinom im Kopf- und Halsbereich erkrankt waren, inkubiert. Mittels FACS-Analyse wurde die Rezeptorexpression verglichen.

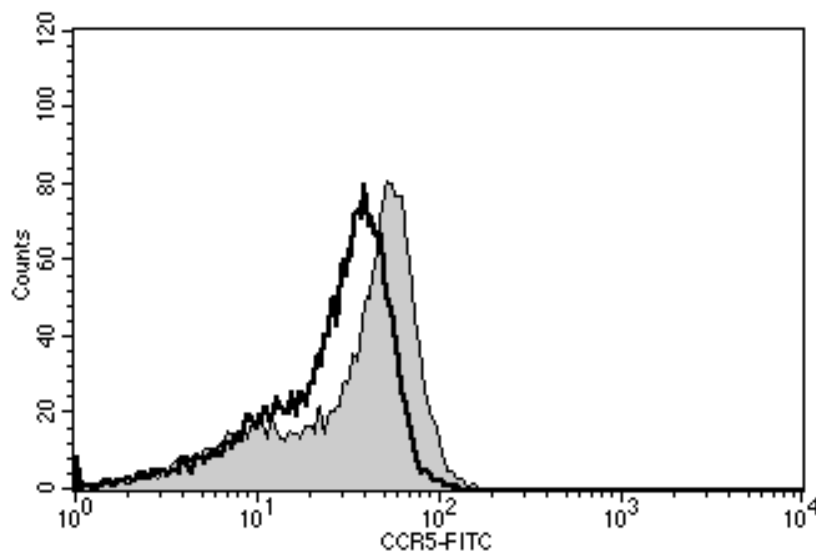


Abbildung 3-14: Beispielhafte Downregulation CCR5 auf Monozyten der Kontrolle (in grau dargestellt Messwerte mit Serum von Kontrolle, mit fetter Linie dargestellt die Messwerte mit Serum von Tumorpatienten)

Dabei zeigte sich, dass nach Inkubation mit Tumorserum die CCR5-Spiegel um durchschnittlich 9,2% erniedrigt waren (Median 18,7%), das Signifikanzniveau wurde mit $p=0,0598$ nur knapp verfehlt. Betrachtet man isoliert die Gruppe der Experimente, in denen gesunde Monozyten mit Serum von Patienten, die an einem Malignom im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung litten, so lässt sich eine signifikante „Downregulation“

(Rezeptorexpression niedriger mit Tumorserum als mit Serum gesunder Probanden) feststellen.

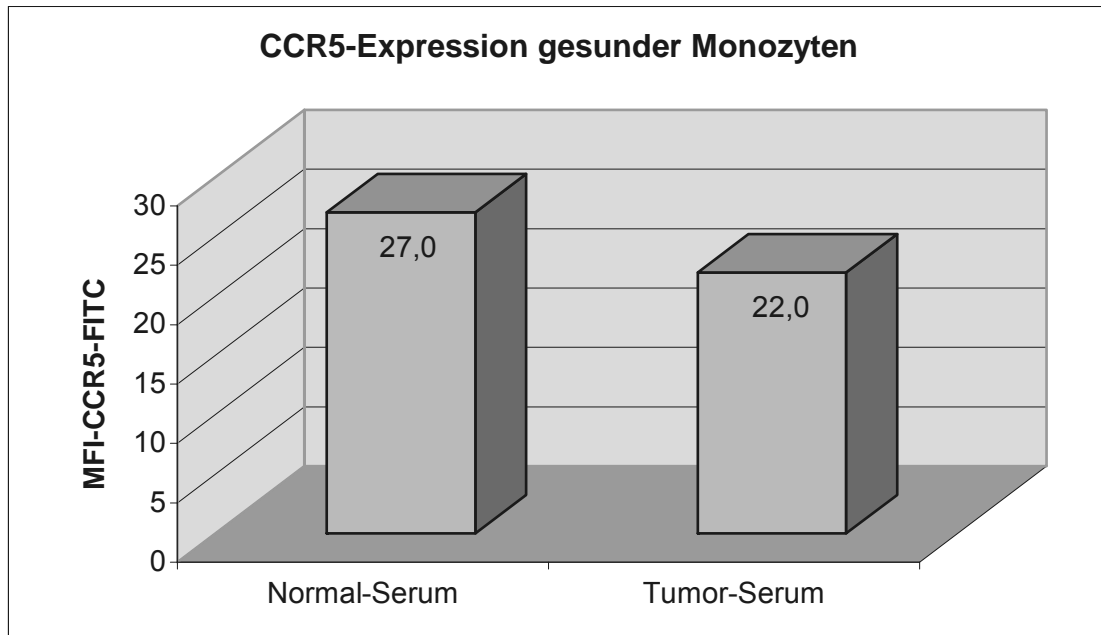


Abbildung 3-15: Verminderte Expression von CCR5 nach Inkubation gesunder Monozyten in Tumorserum ($p=0,0598$); $SD(nS)=12,7$; $SD(tS)=13,4$; $n=30$

3.1.1.3.2 Vergleich zwischen Tumorgroße

Solche Monozyten, die mit Patientenserum mit Tumorgroße pT3 oder pT4 behandelt wurden, wiesen eine um durchschnittlich 17,4% (Median 24,1%) signifikant erniedrigte ($p=0,0268$) Rezeptordichte auf gegenüber solchen, die mit Serum gesunder Probanden „behandelt“ wurden, während sich nach Inkubation mit Serum kleiner Tumoren (pT1 und pT2) keine nennenswerte Herabregulation nachweisen ließ. Ein Vergleich des Ausmaßes der „Downregulation“ zeigte, dass dieser Effekt signifikant stärker ausgeprägt war ($p=0,0040$), wenn die Inkubation in Serum mit großen Tumoren belasteter Patienten erfolgte. Die Herabregulation wurde wie folgt berechnet:

$(MFI(NnS) - MFI(NtS)) / MFI(NnS)$ und gibt in Prozent an, wie stark eine Veränderung der Messwerte nach unten durch Inkubation in Serum gesunder Spender erreicht wurde.

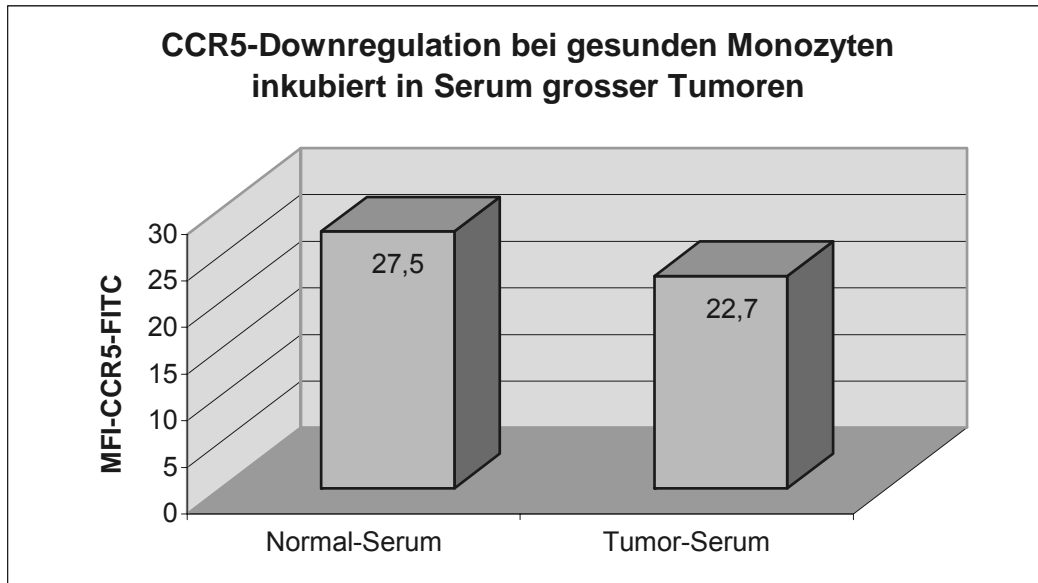


Abbildung 3-16: Signifikant ($p=0,0268$) erniedrigte CCR5-Rezeptorexpression nach Inkubation in Serum von Karzinompatienten mit großen Tumoren; $SD(nS)=12,0$; $SD(tS)=12,1$; $n=18$

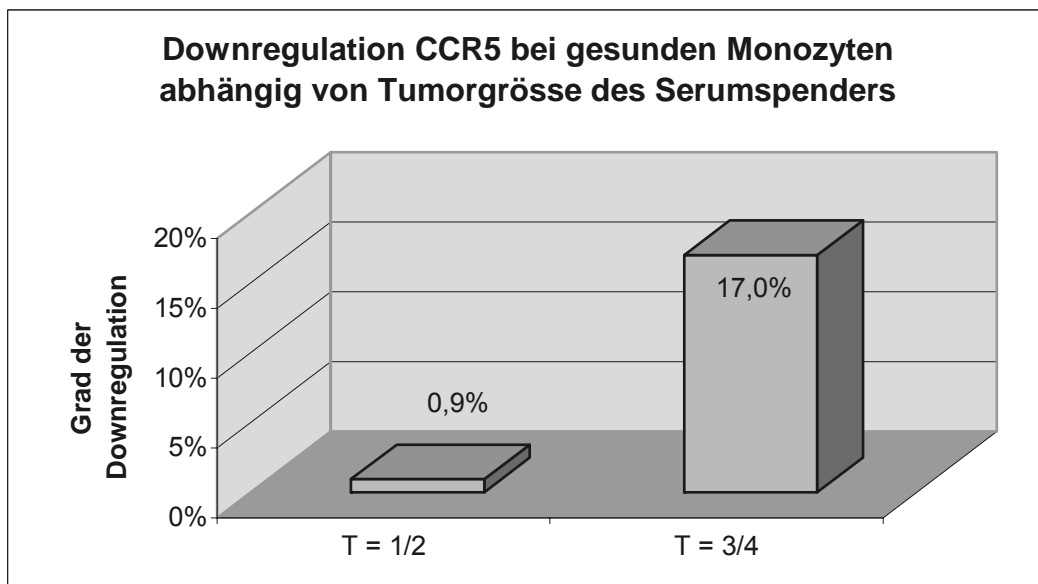


Abbildung 3-17: Signifikant ($p=0,0040$) größere Herabregulation des CCR5-Rezeptors nach Inkubation in Serum von Patienten mit großer Tumormasse; $SD(1/2)=0,193$; $SD(3/4)=0,333$; $n(1/2)=11$; $n(3/4)=18$

3.1.1.3.3 Vergleich im Lymphknotenbefall

Auch im Vergleich, ob Monozyten gesunder Probanden stärker in der Expression des CCR5 beeinflusst wurden, je nachdem, ob die Tumorerkrankung des Serumdonators bereits mit Lymphknotenbefall einherging, zeigten sich Unterschiede. So konnte in der Untergruppe der mit Serum ohne Lymphknotenbefall erkrankter Patienten behandelten Monozyten (Lk-) keine nennenswerte Herabregulation (im Schnitt <5%) beobachtet werden, während in der Untergruppe mit Lymphknotenbefall (Lk+) eine signifikante ($p=0,0150$) Downregulation um durchschnittlich 16,8% festzustellen war. Das Ausmaß der Downregulation war signifikant größer ($p=0,0458$), wenn gesunde Monozyten mit Serum von LK-positiven Tumorpatienten inkubiert wurde.

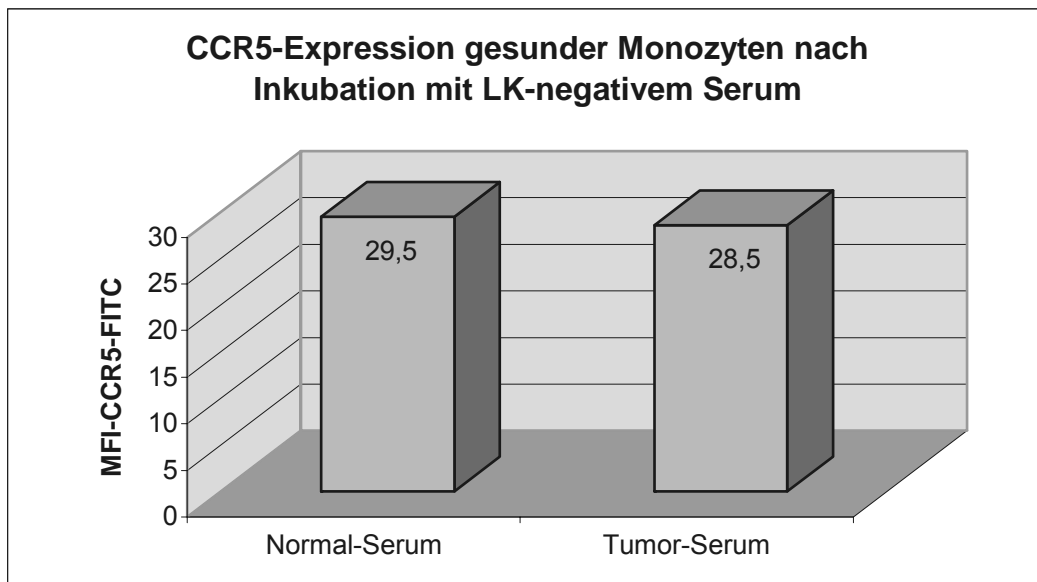


Abbildung 3-18: Nur minimale Herabregulation der CCR5-Dichte auf Monozyten gesunder Spender nach Inkubation mit Serum von Tumorpatienten, bei denen noch keine befallenen Lymphknoten nachgewiesen wurden; $SD(nS)=10,3$; $SD(tS)=12,0$; $n=11$

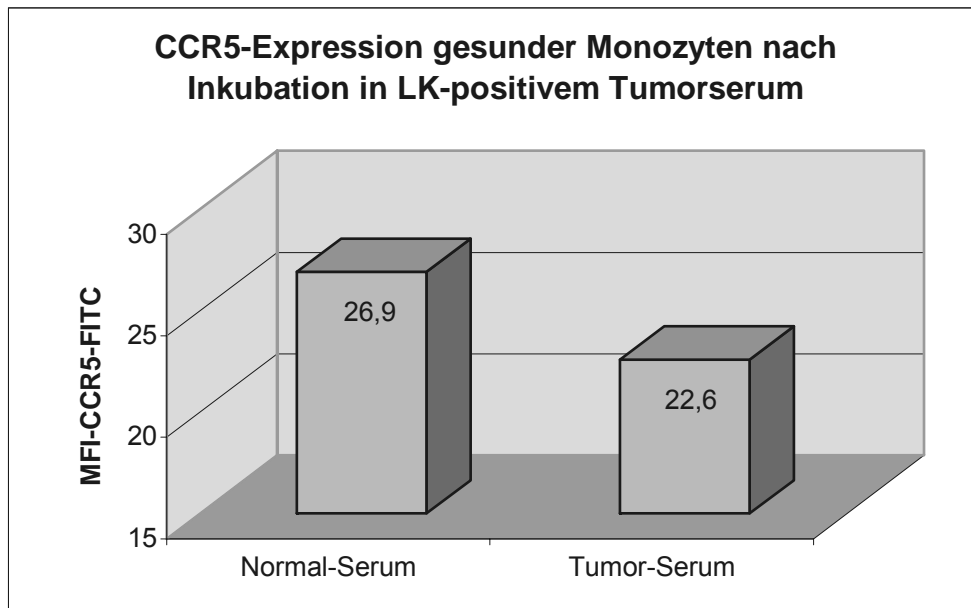


Abbildung 3-19: Signifikante ($p=0,0150$) Herabregulation der CCR5-Dichte nach Inkubation gesunder Monozyten in Serum von Tumorpatienten, bei denen ein LK-Befall nachgewiesen wurde; $SD(nS)=13,8$; $SD(tS)=14,1$; $n=17$

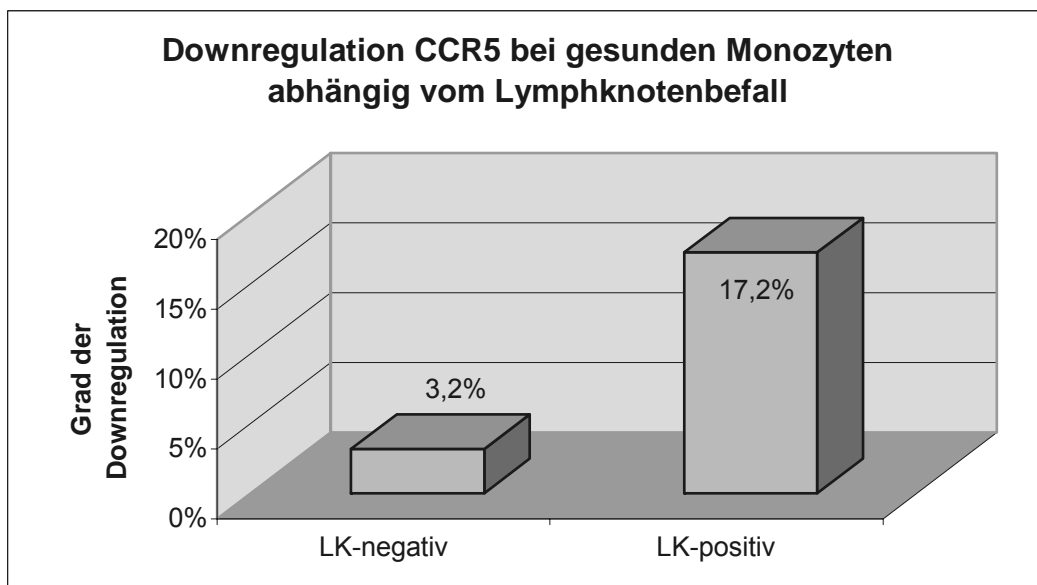


Abbildung 3-20: Signifikant ($p=0,0458$) stärkere Herabregulation der CCR5-Expression nach Inkubation mit Serum von Tumorpatienten mit positivem Lymphknotenbefall; $SD(neg)=0,328$; $SD(pos)=0,276$; $n(neg)=11$; $n(pos)=17$

3.1.1.3.4 Vergleich im Tumorgrading

In der Untersuchung auf Unterschiede des Ausmaßes der Herabregulation der Rezeptorexpression in Bezug auf das Grading (=Differenzierungsgrad) des Tumors der Serumgeber konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. So betrug die Herabregulation nach Inkubation mit Serum schlecht differenzierter Tumoren (G3) durchschnittlich 13,3%, nach Inkubation mit Serum besser differenzierter Tumoren (G1-2) <5%, jedoch ließ sich keine statistische Signifikanz nachweisen.

3.1.1.4 Kontrolluntersuchungen

Zur Kontrolle, ob die Veränderungen der Messwerte durch die Verwendung eines körperfremden Serums herrührten, wurden Monozyten eines gesunden Spenders in eigenem Serum und in vier verschiedenen Seren anderer gesunder Probanden inkubiert und die CCR5-Expression gemessen. Bei den 3 durchgeführten Versuchen ließ sich kein wesentlicher Unterschied feststellen. Eine statistische Untersuchung wurde aufgrund der geringen Fallzahl nicht durchgeführt.

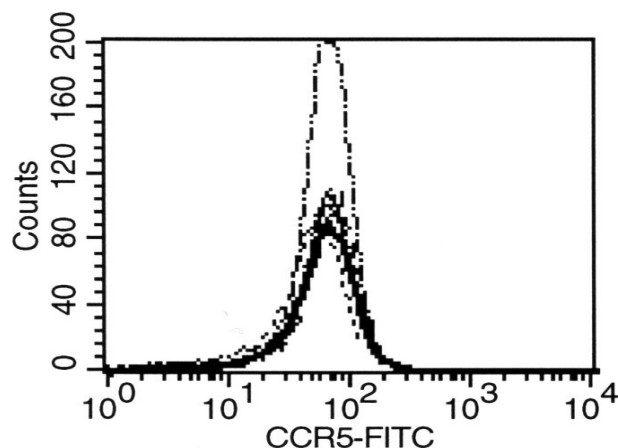


Abbildung 3-21: Auf Monozyten eines gesunden Probanden ließen sich nach Inkubation keine Unterschiede der CCR5-Expression zwischen dem eigenen Serum (fette Linie) und dem vier anderer gesunder Probanden nachweisen

Analog hierzu wurden Monozyten von drei Tumorpatienten mit mindestens Tumorstadium T3 mit Seren von vier anderen T3-Patienten inkubiert, auch hierbei zeigten sich nur geringe Unterschiede.

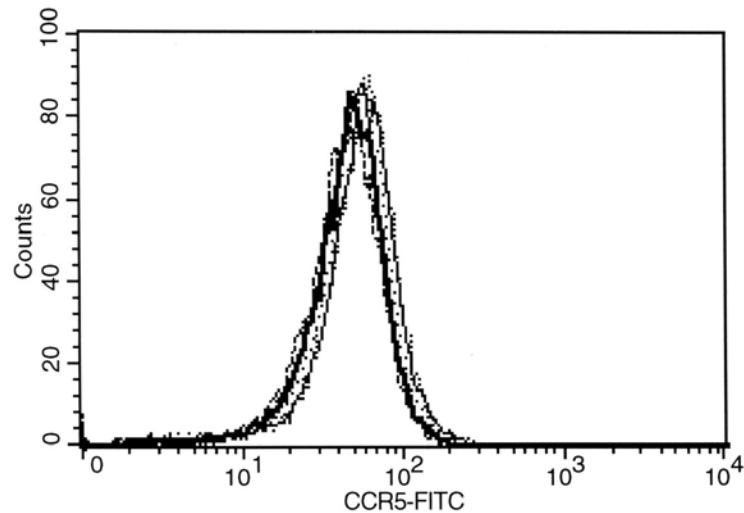


Abbildung 3-22: CCR5-Expression auf Monozyten eines Tumorpatienten nach Inkubation in eigenem Serum (fette Linie) und Serum 4 anderer Tumorpatienten.

Zwei weitere Kontrollansätze sind nun noch exemplarisch abgebildet:

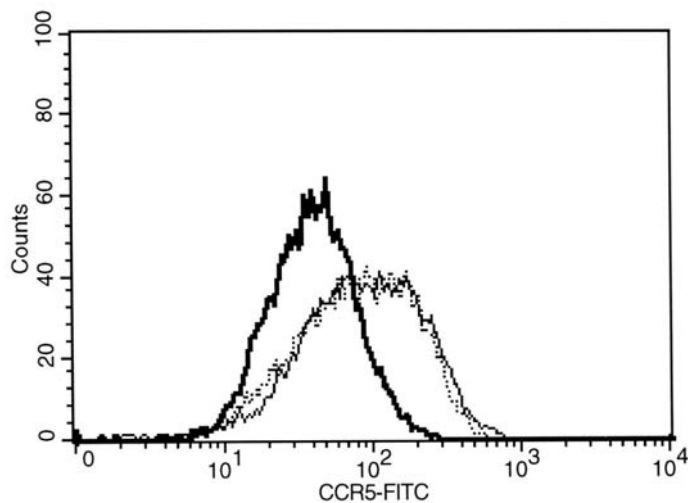


Abbildung 3-23: Herunterregulation der CCR5-Expression auf Monozyten eines gesunden Probanden nach Inkubation in Serum eines Tumorpatienten (fette Linie). Kein Unterschied hingegen zwischen der Inkubation in autologem Serum (dünne Linie) und in allogenem Serum eines anderen gesunden Probanden.

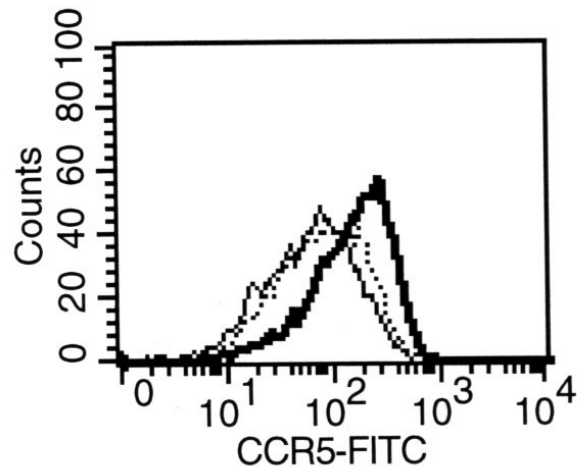


Abbildung 3-24: Erhöhte CCR5-Expression auf Monozyten eines Tumorpatienten durch Serum eines gesunden Probanden (fette Linie), hingegen bleibt die Rezeptordichte gleich niedrig nach Inkubation in autologem (dünne Linie) Serum oder allogenen Serum eines anderen Tumorpatienten (gestrichelte Linie).

3.1.1.5 Zusammenfassung Ergebnisse CCR5

Die oben beschriebenen Experimente ergaben folgende Erkenntnisse:

- a) Der Chemokinrezeptor CCR5 wird auf Monozyten gesunder Probanden signifikant stärker exprimiert als auf Monozyten von Patienten, die an einem Karzinom im Kopf- und Halsbereich leiden.
- b) Die CCR5-Expression ist umso geringer, je weiter fortgeschritten die Tumorerkrankung ist, abhängig von den Faktoren Tumorgroße, Lymphknotenbefall und Differenzierungsgrad des Karzinoms.
- c) Durch Inkubation von Monozyten dieser Tumorpatienten mit Serum gesunder Probanden wird die Rezeptordichte an CCR5 signifikant erhöht.
- d) Diese Heraufregulation der CCR5-Rezeptordichte durch gesundes Serum ist umso stärker ausgeprägt, je weiter fortgeschritten das Stadium des Karzinoms der betreffenden Patienten ist.
- e) Durch Inkubation von Monozyten gesunder Probanden mit Serum von Karzinompatienten wird die Rezeptordichte von CCR5 erniedrigt.

- f) Diese Herabregulation an CCR5 durch Tumorserum ist umso stärker ausgeprägt, je größer das Stadium des Karzinoms des Patienten ist, mit dem die gesunden Monozyten behandelt werden.

3.1.2 CCR2

3.1.2.1 Vergleich Tumorpatienten - gesunde Probanden

Nach genanntem Schema wurde der Grad der CCR2-Expression nach Inkubation über 2 Tage in autologem Serum auf Monozyten von Tumorpatienten mit der Expression auf Monozyten der gesunden Kontrollgruppe verglichen. So zeigte sich eine geringgradig (<5%) höhere CCR2-Dichte auf den Zellen bei Gesunden, die MFIR lag um 15,0% über der von Tumorpatienten, eine statistische Signifikanz konnte jedoch hier nicht nachgewiesen werden. Dennoch wurden die Monozytenpopulationen wieder getrennt voneinander untersucht und anhand der Parameter Tumorgröße, Lymphknotenbefall und Grading verglichen.

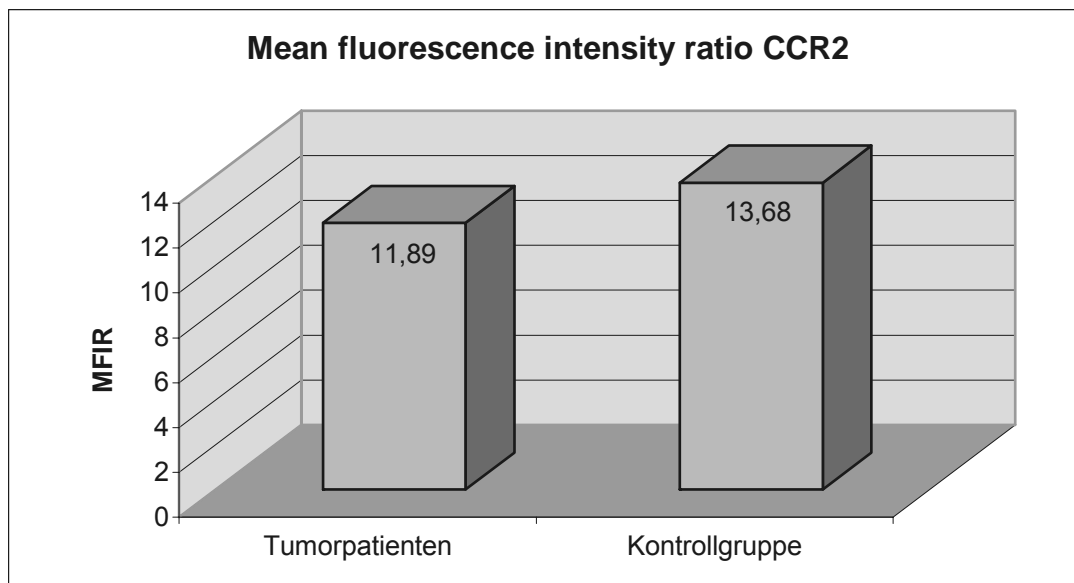


Abbildung 3-25: Erhöhter Grad der CCR2-Rezeptorexpression auf Monozyten gesunder Probanden; n(Tu)=23; n(Ko)=21

3.1.2.2 Monozyten von Tumorpatienten

3.1.2.2.1 Gesamtdaten

Es zeigte sich, dass die CCR2-Expression nach Inkubation mit allogenen Serum gesunder Spender deutlich erhöht war im Vergleich zur Inkubation mit autologem Serum der Tumorpatienten (Upregulation). Auch Inkubation mit allogenen Serum anderer Tumorpatienten ergab denselben Effekt, siehe auch 3.1.1.4. So lag die CCR2-Dichte mit „gesundem“ Serum um durchschnittlich 23,1% (Median 39,5%) höher als nach Behandlung mit „Tumorserum“. Die statistische Analyse blieb mit $p=0,0960$ jedoch über dem Signifikanzniveau.

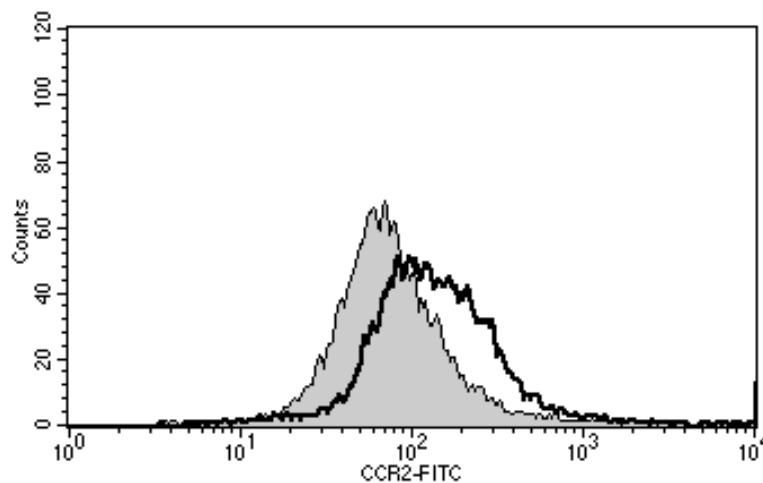


Abbildung 3-26: Beispielhaft eine Upregulation CCR2 auf Tumormonozyten

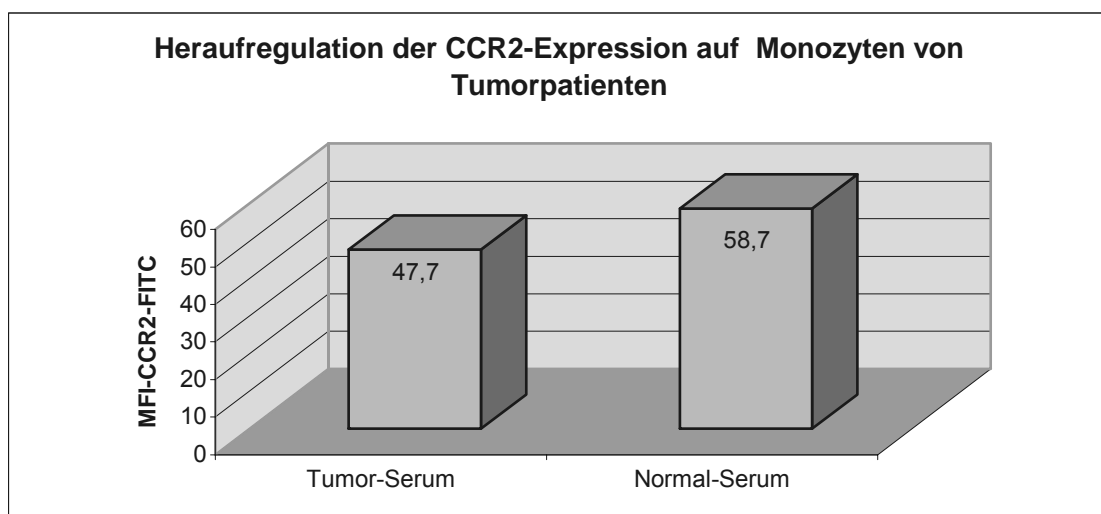


Abbildung 3-27: Erhöhte Expression von CCR2 auf Monozyten von Tumorpatienten nach Inkubation mit Serum gesunder Probanden; $p=0,0960$; $SD(tS)=24,7$; $SD(nS)=29,1$; $n=23$

3.1.2.2 Vergleich zwischen Tumorgröße

Die Untersuchung auf Unterschied in Bezug auf die histologisch bestimmte Größe des Karzinoms zeigte, dass die CCR2-Expression bei an Tumoren im Stadium pT3 und pT4 Erkrankten um durchschnittlich 33,4% niedriger lag als bei Tumorbefall im Stadium pT1 und pT2, jedoch konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden ($p=0,1025$).

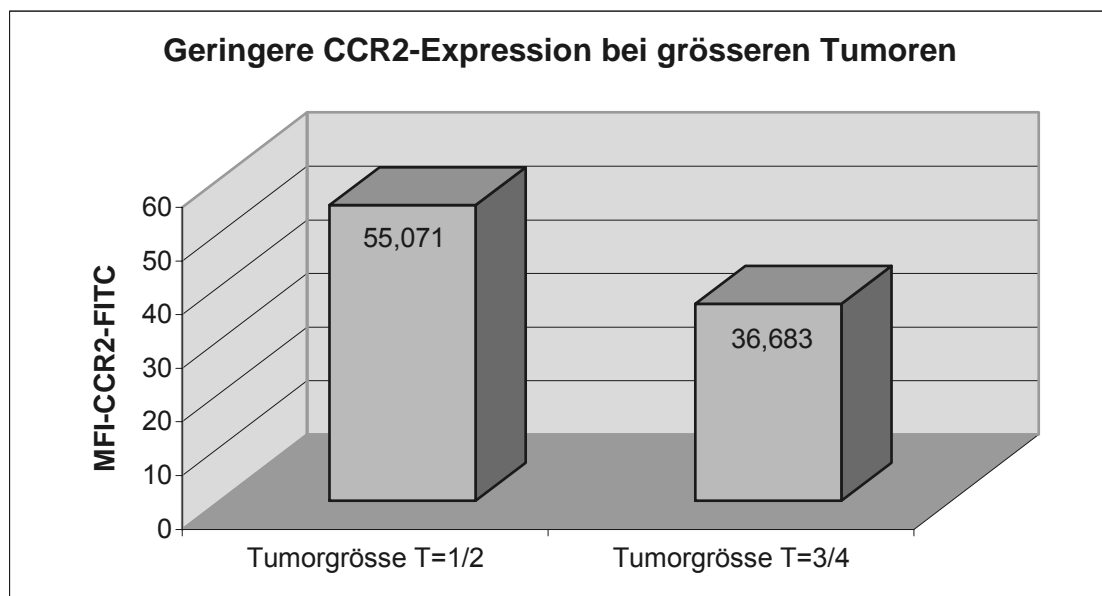


Abbildung 3-28: Die Expression von CCR2 auf Monozyten von Tumorpatienten lag bei größeren Tumoren deutlich tiefer als bei kleinen Tumoren; $p=0,1025$; $SD(1/2)=18,2$; $SD(3/4)=23,4$; $n(1/2)=9$; $n(3/4)=12$

Bezüglich des Grades der Heraufregulation der CCR2-Dichte zeigte sich, dass diese Upregulation bei an größeren Tumoren erkrankten (pT3/4) durchschnittlich um 45% lag, bei Patienten mit kleineren Tumoren stellte sich dieser Effekt nur mit durchschnittlich 9,6% dar. Aufgrund der großen Bandbreite der Messwerte lagen diese Ergebnisse jedoch auch außerhalb der statistischen Signifikanz ($p=0,0878$).

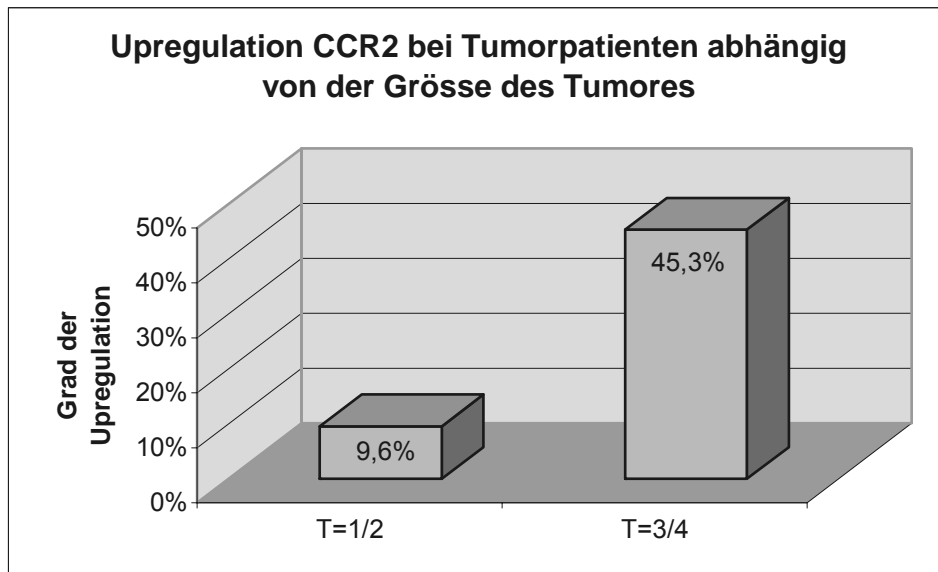


Abbildung 3-29: Deutlich stärkerer Effekt der Upregulation von CCR2 nach Inkubation in Serum gesunder Spender, sofern ein größeres Karzinom vorlag; ($p=0,0878$); $SD(1/2)=0,49$; $SD(3/4)=0,61$; $n(1/2)=9$; $n(3/4)=12$

3.1.2.2.3 Vergleich im Lymphknotenbefall

Ein ähnlicher Effekt ließ sich auch im Vergleich anhand erfolgten oder nicht erfolgten Lymphknotenbefalls feststellen. So lagen die Werte der CCR2-Expression bei Patienten mit LK-Metastasen im Durchschnitt um 42,9% unter denen von Patienten, bei denen keine Lymphknoten befallen waren, statistische Signifikanz wurde mit $p=0,0745$ wiederum verfehlt.

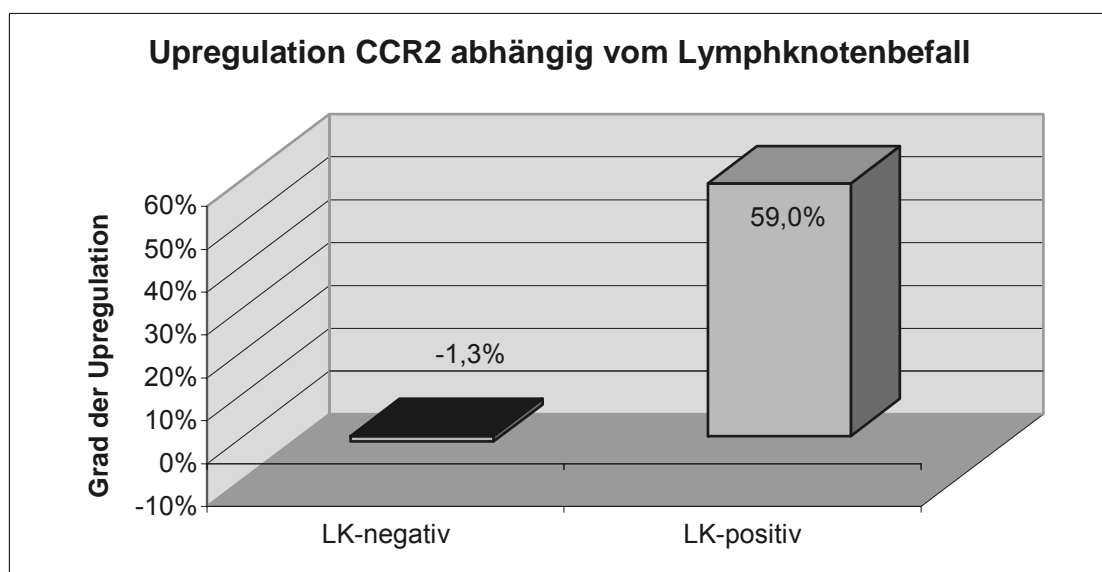


Abbildung 3-30: Upregulation von CCR2 nur bei positivem Lymphknotenbefall; $p=0,0745$; $SD(neg)=0,355$; $SD(pos)=0,606$; $n(1/2)=10$; $n(3/4)=11$

3.1.2.2.4 Untergruppe T3/4 mit LK+

Die im Schnitt oftmals deutlichen Unterschiede in der CCR2-Expression bei fehlendem Signifikanzniveau verleiteten dazu, die Untergruppe der Patienten mit fortgeschrittenem Stadium (Tumorgröße pT3/4 und positiver Lymphknotenbefall) gegen jene Patientengruppe mit Anfangstumorstadium zu untersuchen (Tumorgröße pT1/2 bei negativem LK-Befall). Hier zeigte sich einerseits, dass die CCR2-Expression bei Patienten im fortgeschrittenen Tumorstadium signifikant reduziert war ($p=0,0177$) gegenüber der Gruppe im Tumoranfangsstadium.

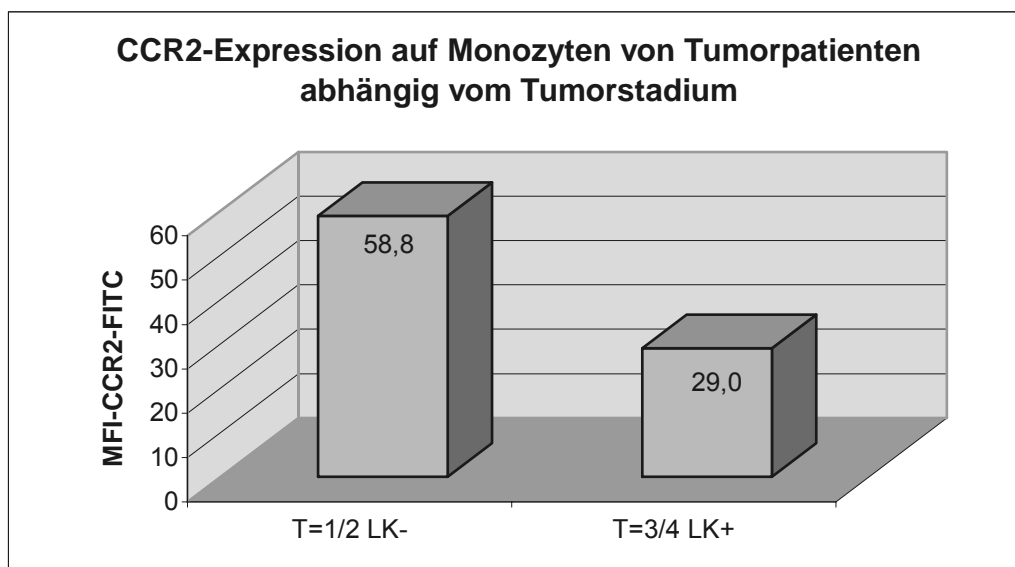


Abbildung 3-31: Signifikante geringere Expression von CCR2 bei fortgeschrittenem Tumorstadium ($p=0,0177$); $SD(1/2-)=18,9$; $SD(3/4+)=10,7$; $n(1/2-)=6$; $n(3/4+)=8$

Des Weiteren konnte bei der Gruppe im fortgeschrittenen Stadium durch Inkubation mit Serum gesunder Spender eine signifikante Hochregulation der CCR2-Dichte nachgewiesen werden ($p=0,0469$).

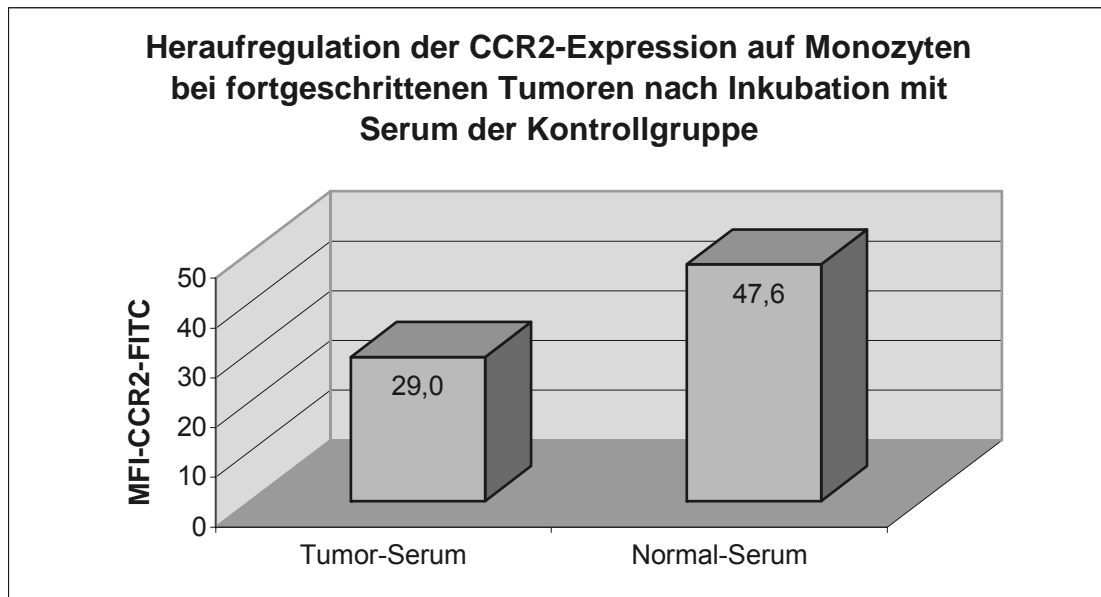


Abbildung 3-32: Signifikante ($p=0,0469$) Heraufregulation von CCR2 nach Inkubation mit Serum gesunder Spender bei fortgeschrittenem Tumorstadium; $SD(tS)=10,6$; $SD(nS)=22,3$; $n=8$

Weiterhin zeigte sich, dass der Grad der Upregulation signifikant höher war, wenn ein ausgeprägteres Tumorstadium vorliegt als bei einem Tumoranfangsstadium ($p=0,0480$).

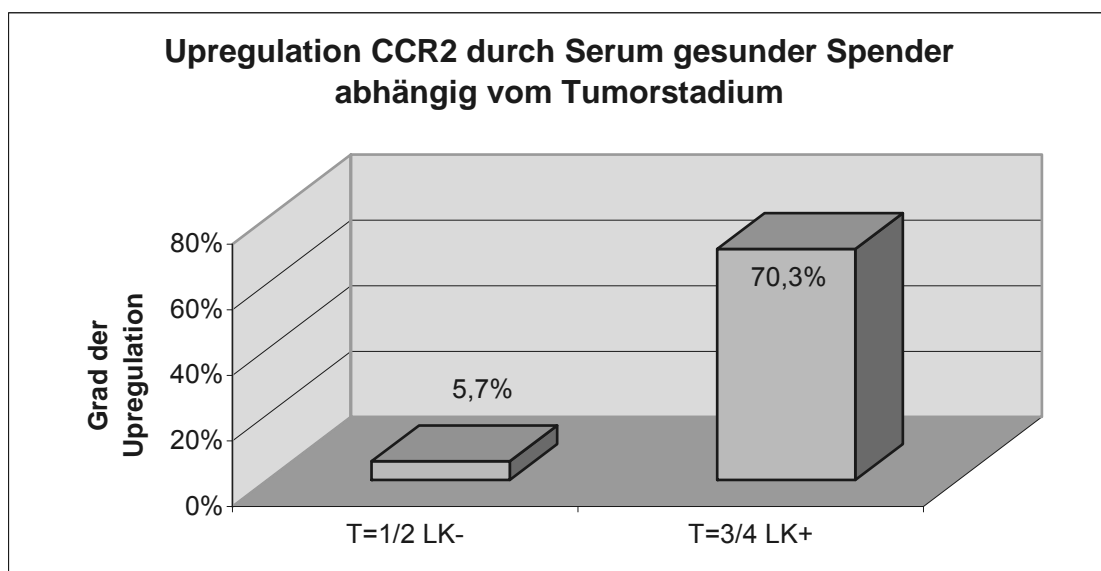


Abbildung 3-33: Die Heraufregulation der CCR2-Dichte auf Monozyten von Tumorpatienten konnte durch Inkubation in Serum gesunder Probanden signifikant stärker heraufreguliert werden, wenn ein fortgeschrittenes Tumorstadium vorlag ($p=0,0480$); $SD(1/2-)=0,447$; $SD(3/4+)=0,565$; $n(1/2-)=6$; $n(3/4+)=8$

3.1.2.2.5 Vergleich im Tumorigradung

Bezüglich des Parameters Grading konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der CCR2-Expression bei Tumorpatienten festgestellt werden. Jedoch war auch hier nachzuweisen, dass die Heraufregulation der CCR2-Dichte nach Gabe von Serum gesunder Probanden deutlich stärker ausgeprägt war, wenn der Tumor eine schlechtere Differenzierung aufwies. Signifikanzen ließen sich wiederum nicht errechnen ($p=0,1049$).

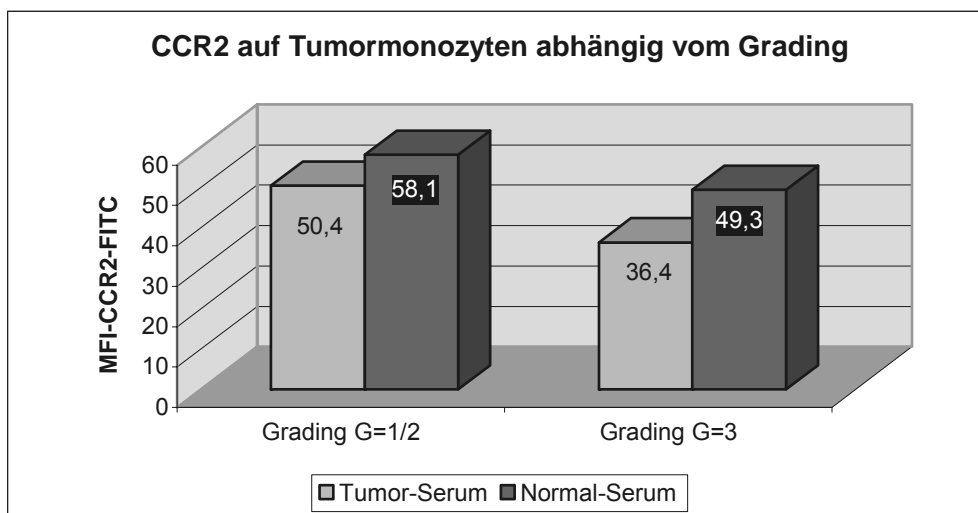


Abbildung 3-34: Verminderte CCR2-Expression bei schlecht- bis entdifferenzierten Tumoren

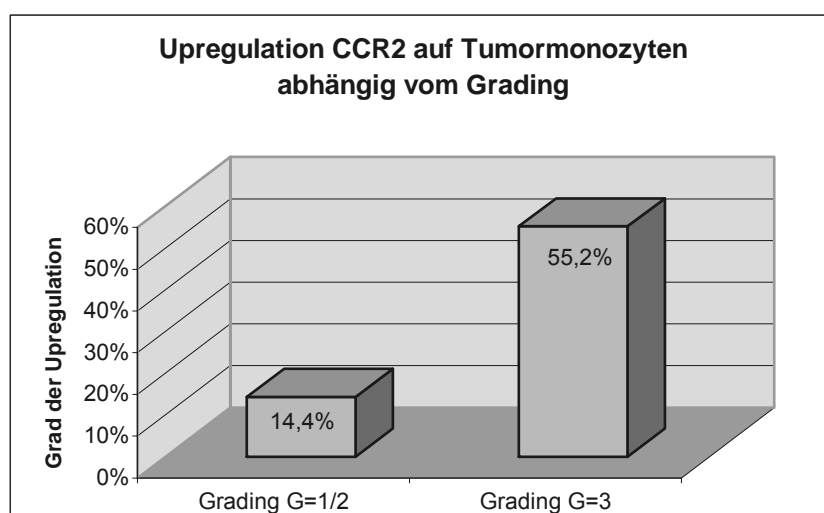


Abbildung 3-35: Auf Monozyten von Tumorpatienten konnte durch Inkubation mit Serum gesunder Spender die CCR2-Expression stärker heraufreguliert werden, wenn es sich um schlecht differenzierte Tumoren handelte; $SD(1/2)=0,448$; $SD(3)=0,634$; $n(1/2)=10$; $n(3/4)=10$

3.1.2.3 Monozyten der gesunden Kontrollgruppe

3.1.2.3.1 Gesamtdaten

Nach Inkubation von Monozyten gesunder Probanden mit Serum von Tumorpatienten konnte eine durchschnittliche Herabregulation der CCR2-Expression um 20,4% festgestellt werden. Statistisch wurde das Signifikanzniveau mit $p=0,0630$ knapp verfehlt.

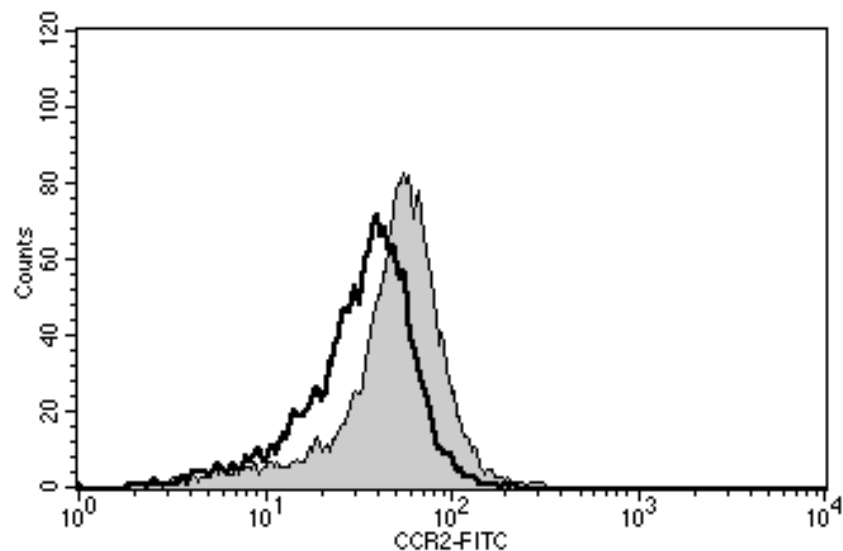


Abbildung 3-36: Beispielhafte Downregulation von CCR2 bei der gesunden Kontrollgruppe

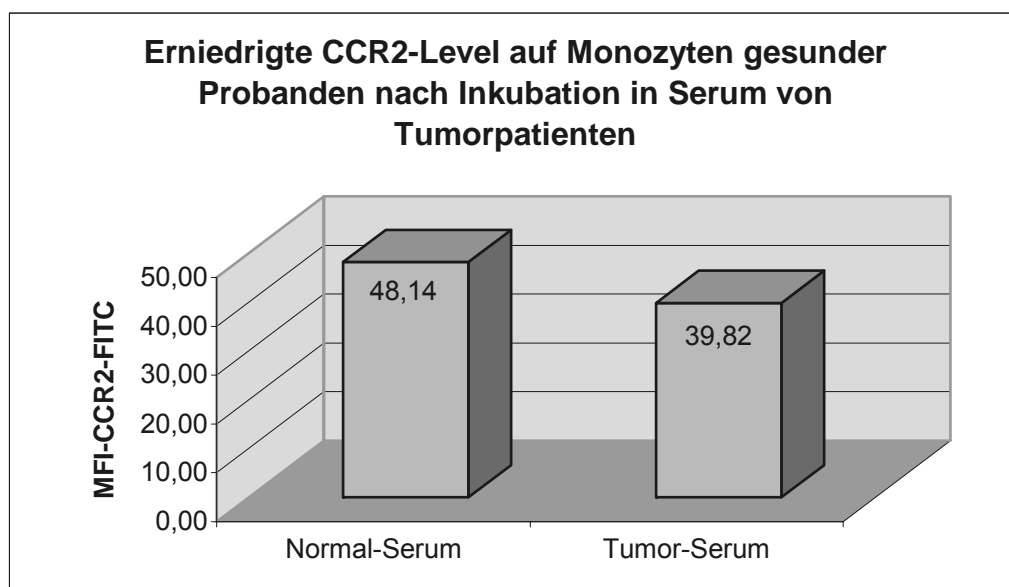


Abbildung 3-37: Deutliche Herabregulation der „gesunden“ Monozyten nach Inkubation in Serum von Karzinompatienten; $p=0,0630$; $SD(nS)=23,48$; $SD(tS)=18,29$; $n=19$

3.1.2.3.2 Vergleich zwischen Tumorgröße

Beim Vergleich des Downregulation-Effektes abhängig davon, ob das Serum von einem Patienten mit kleinem oder großen Karzinom stammte, konnte festgestellt werden, dass ein signifikanter Unterschied ($p=0,0203$) im Ausmaß der Rezeptorregulation nach unten besteht. Die Herabregulation war deutlich stärker, wenn das Serum von einem Patienten mit großem Tumor stammte.

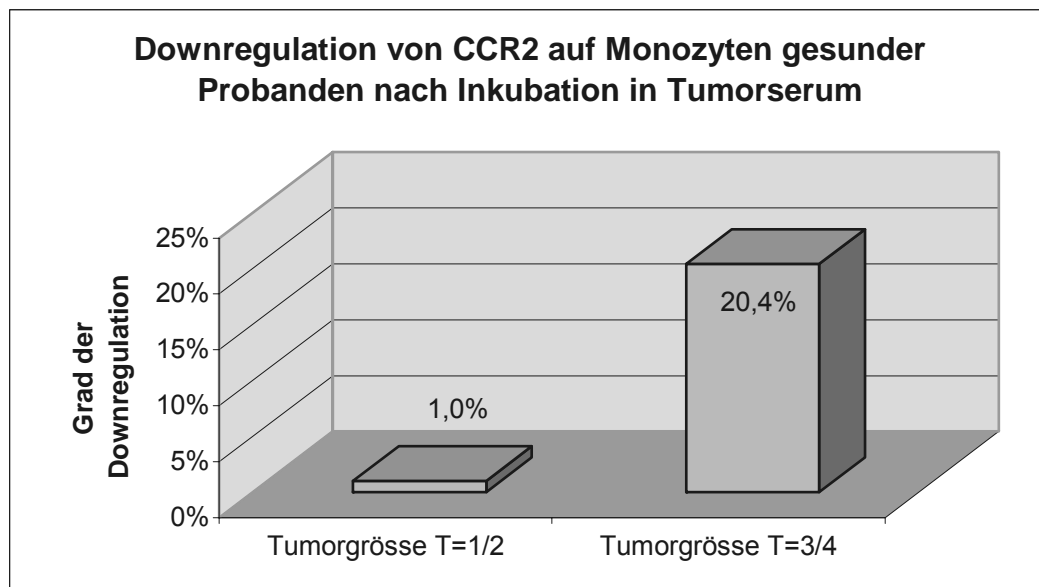


Abbildung 3-38: Die CCR2-Expression auf Monozyten gesunder Spender wurde signifikant stärker ($p=0,0203$) herunterreguliert nach Inkubation mit Serum von Patienten mit großen Tumoren; $SD(1/2)=0,261$; $SD(3/4)=0,239$; $n(1/2)=8$; $n(3/4)=11$

3.1.2.3.3 Vergleich im Lymphknotenbefall

Die Rezeptorexpression lag nach Inkubation mit Serum von Patienten mit befallenen Lymphknoten um 15,1% unter der nach Inkubation mit Serum ohne Lymphknotenbefall, jedoch konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden. Nur bei den gesunden Monozyten, die mit LK-positivem Serum behandelt wurden, zeigte sich eine signifikante Herabregulation der Rezeptordichte ($p=0,0399$).

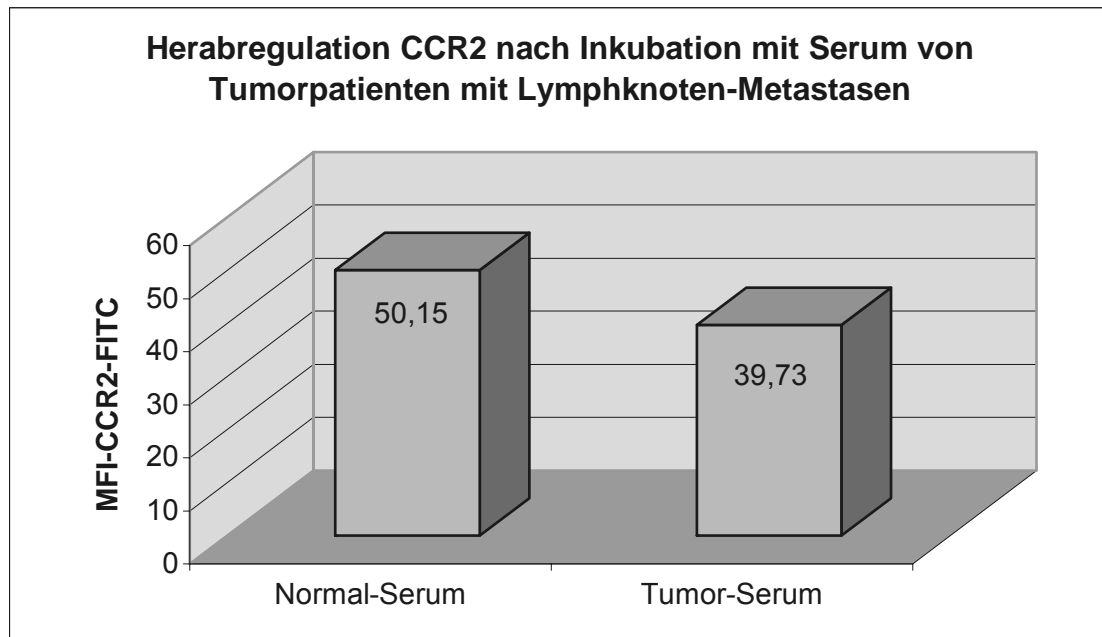


Abbildung 3-39: Signifikante ($p=0,0399$) Herabregulation von CCR2 auf Monozyten gesunder Spender nach Inkubation in Serum von Tumorpatienten, die mit LK-Metastasen belastet waren; $SD(nS)=26,16$; $SD(tS)=20,60$; $n=11$

3.1.2.3.4 Vergleich im Tumorigradung

Auch abhängig vom Differenzierungsgrad des Tumors zeigten sich keine beweisbaren Unterschiede in der Rezeptorexpression nach Inkubation mit Serum eines Tumorpatienten.

3.1.2.4 Zusammenfassung Ergebnisse CCR2

- Der Chemokinrezeptor CCR2 wird auf Monozyten gesunder Probanden geringgradig stärker exprimiert als auf Monozyten von Tumorpatienten
- Die Rezeptordichte auf Monozyten der Karzinompatienten ist signifikant vom Tumorstadium abhängig, ein fortgeschrittenes Tumorstadium geht mit einer erniedrigten Rezeptordichte einher.
- Durch Inkubation mit Serum gesunder Probanden ließ sich die Rezeptordichte auf Monozyten von an fortgeschrittenem SCCHN Erkrankten (Tumorstadium pT3 oder pT4 mit Lymphknotenbefall) signifikant erhöhen.

- d) Die CCR2-Rezeptoren bei gesunden Probanden werden geringgradig schwächer exprimiert nach Inkubation in Serum von Tumorpatienten.
- e) Das Tumorstadium des „Serumgebers“ hat einen signifikanten Einfluss auf den Grad der Herabregulation bei gesunden Monozyten.

3.1.3 CD11b (Mac-1)

3.1.3.1 Vergleich Tumorpatienten - gesunde Probanden

Zunächst wurde wieder der Expressionsgrad des Adhäsionsmoleküls Mac-1 (CD11b) nach Inkubation in autologem Serum gemessen. Es zeigte sich, dass auf Monozyten von Gesunden eine signifikant ($p=0,0142$) höhere Rate an CD11b-Molekülen exprimiert wird als auf Monozyten von Tumorpatienten. Diese lag im Schnitt um 40,9% (Median 44,4%) höher als auf mit Tumorerkrankung belasteten Monozyten. Die Überprüfung der Werte anhand der MFIR scheiterte knapp am Signifikanzniveau ($p=0,0804$).

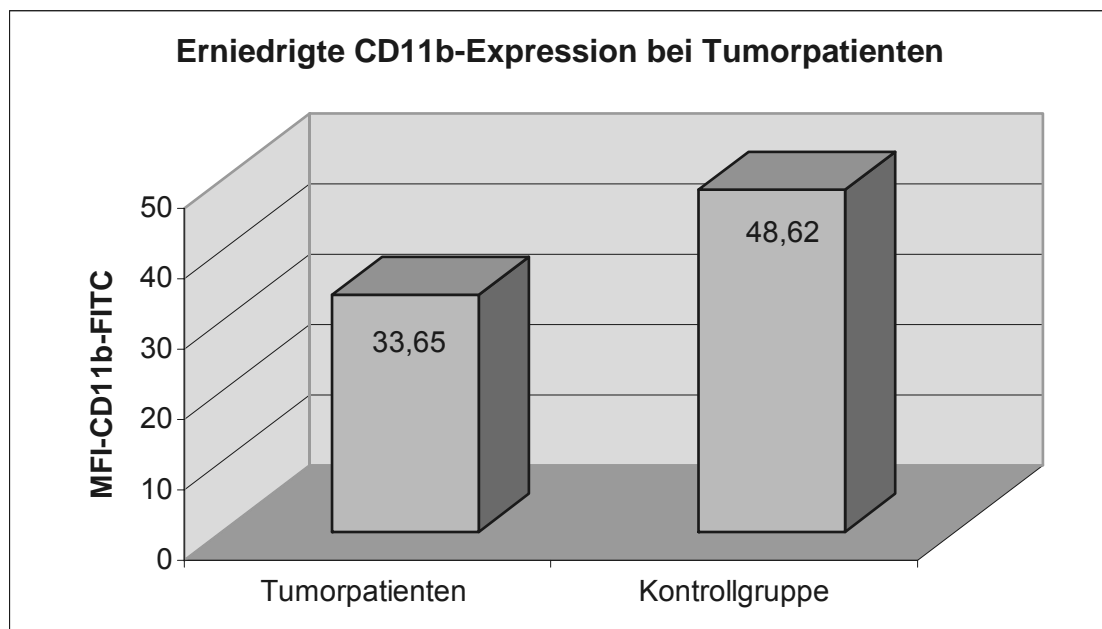


Abbildung 3-40: Die Expression von CD11b nach Inkubation in eigenem Serum lag bei den Tumorpatienten signifikant niedriger ($p=0,0142$); $SD(Tu)=15,72$; $SD(Ko)=22,54$; $n(Tu)=24$; $n(Ko)=19$

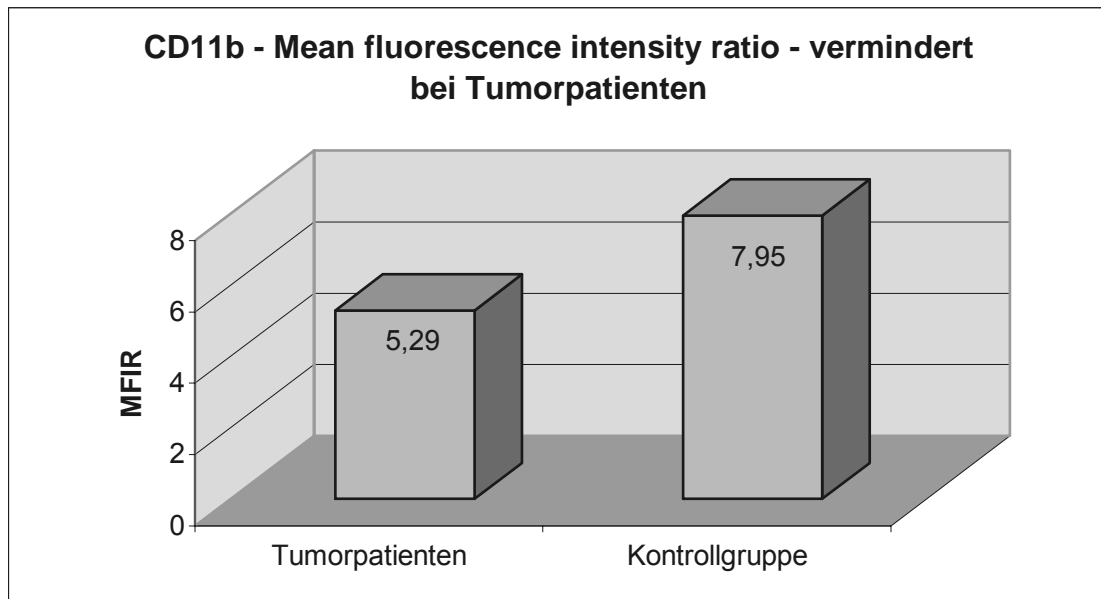


Abbildung 3-41: Auch in der MFIR zeigte sich die verminderte Expression von CD11b auf Monozyten im Vergleich zu den gesunden Probanden; ($p=0,0804$); $SD(Tu)=3,26$; $SD(Ko)=6,30$; $n(Tu)=24$; $n(Ko)=19$

3.1.3.2 Monozyten von Tumorpatienten

3.1.3.2.1 Gesamtdaten

Die Expression des CD11b auf Monozyten von Tumorpatienten konnte nach Inkubation in Serum gesunder Probanden um durchschnittlich 21,4% erhöht werden. Bei der statistischen Auswertung lagen die Ergebnisse jedoch mit $p=0,0894$ oberhalb des Signifikanzniveaus.

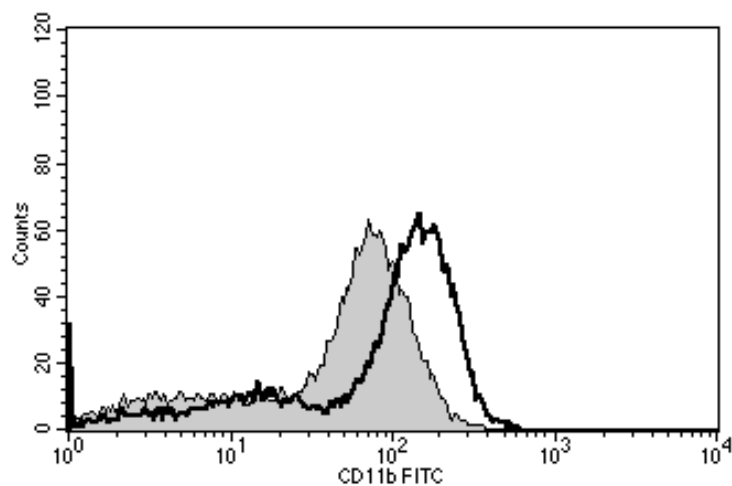


Abbildung 3-42: Beispielhafte Upregulation von CD11b auf Tumormonozyten

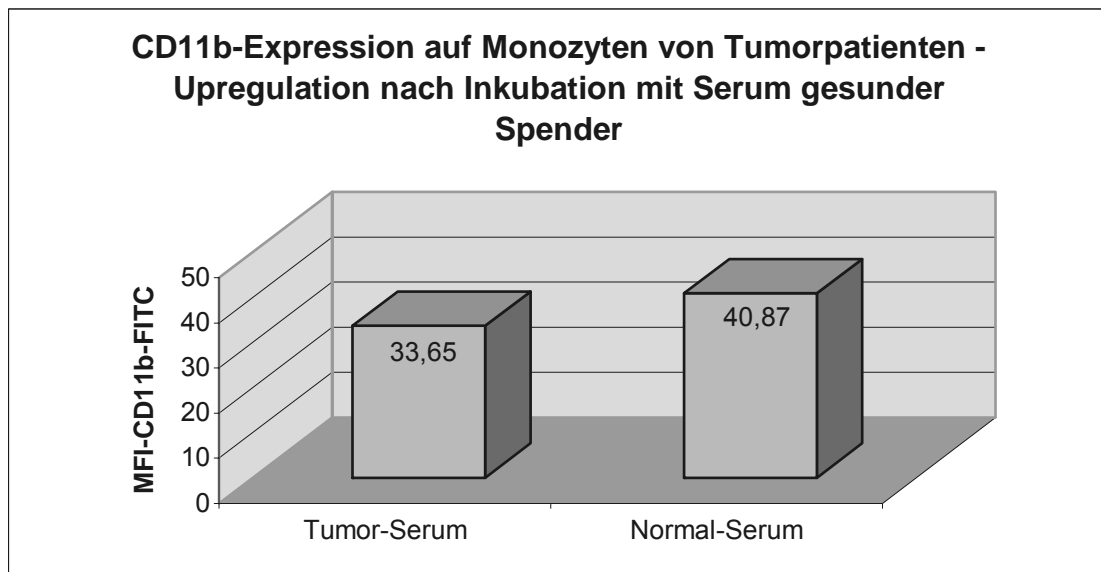


Abbildung 3-43: Nach Inkubation in Serum gesunder Probanden zeigte sich eine Erhöhung der CD11b-Expression auf Monozyten von Tumorpatienten; SD(tS)=15,72; SD(Ko)=24,13; n=24

3.1.3.2.2 Vergleich zwischen TumorgroÙe

Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in der Expression des CD11b-Oberflächenmoleküles auf Monozyten von Tumorpatienten, abhängig vom Tumorstadium (Ergebnisse nicht aufgezeigt).

3.1.3.2.3 Vergleich im Lymphknotenbefall

Ebenso konnte kein Unterschied der CD11b-Expression anhand erfolgten oder nicht erfolgten Lymphknotenbefalls festgestellt werden.

3.1.3.2.4 Vergleich im Tumorgrading

Die CD11b-Messwerte unterschieden sich auch nicht abhängig vom Differenzierungsgrad des Tumors.

3.1.3.3 Monozyten der gesunden Kontrollgruppe

3.1.3.3.1 Gesamtdaten

Nach Inkubation gesunder Monozyten mit Tumorserum wurde eine durchschnittliche Herabregulation der CD11b-Expression um 5,9% festgestellt, ohne statistische Signifikanz.

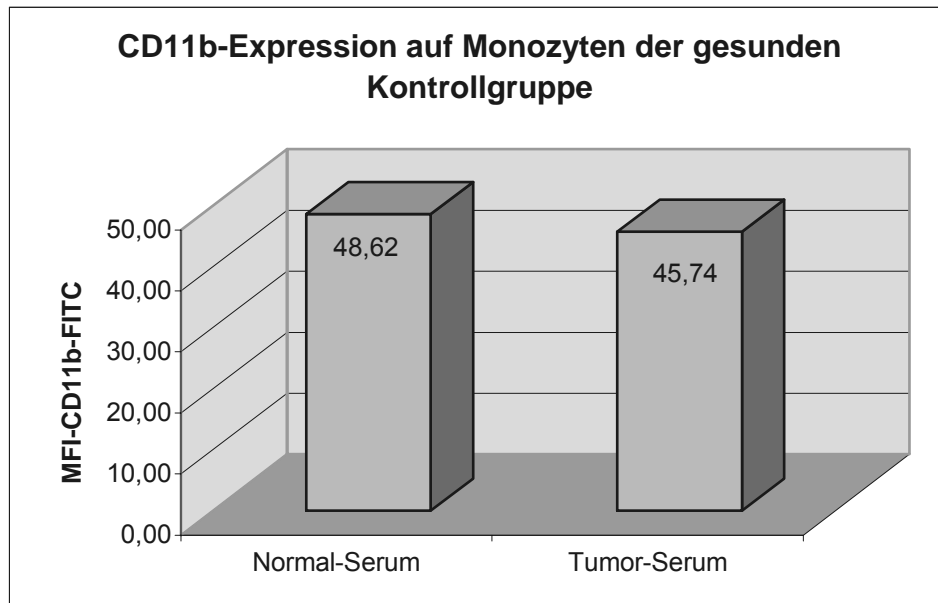


Abbildung 3-44: Keine wesentliche Herabregulation von CD11b auf Monozyten gesunder Spender nach Inkubation in Serum von Tumorpatienten; SD(nS)=22,51; SD(tS)=16,40; n=19

3.1.3.3.2 Vergleich zwischen TumorgroÙe

Die GröÙe des diagnostizierten Tumors hatte keinen nachweisbaren Einfluss auf die CD11b-Dichte auf gesunden Monozyten nach Inkubation in Serum von Tumorpatienten (Ergebnisse nicht aufgezeigt).

3.1.3.3.3 Vergleich im Lymphknotenbefall

Auch anhand des Parameters Lymphknotenbefall konnte kein Unterschied in der CD11b-Expression festgestellt werden.

3.1.3.3.4 Vergleich im Tumorstadium

Ebenso schien der Differenzierungsgrad des Tumors keinen Einfluss auf die CD11b-Dichte auf gesunden Monozyten zu haben.

3.1.3.4 Zusammenfassung Ergebnisse CD11b (Mac-1)

- a) Es zeigt sich eine signifikant höhere CD11b-Rate bei Gesunden.
- b) Eine Heraufregulation von Mac-1 bei Tumorkranken nach Inkubation in Serum von gesunden Spendern kann nachgewiesen werden.
- c) Es ergibt sich kein bewiesener Einfluss des Tumorstadiums auf die CD11b-Expression.
- d) Nach Inkubation in Serum von Tumorkranken ließ sich eine nur geringe Herabregulation auf gesunden Monozyten nachweisen.

3.2 Lymphozytenanalysen

Die Lymphozyten wurden wie in Kapitel 2.2.2 gewonnen und wie beschrieben über 48 Stunden inkubiert.

3.2.1 CTLA-4

Bei gesunden Probanden zeigte sich ein um durchschnittlich 42,5% höherer Messwert bezüglich der CTLA-4 Expression nach Inkubation im eigenen Serum gegenüber der Gruppe der Tumorpatienten, jedoch keine statistische Signifikanz.

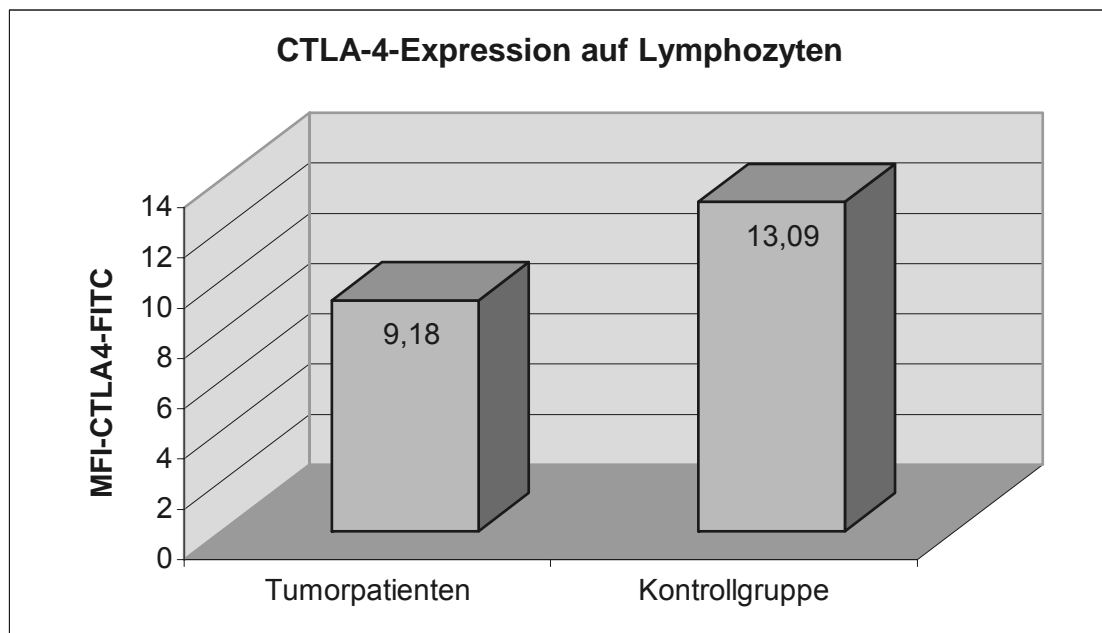


Abbildung 3-45: Erhöhte Expression von CTLA-4 auf Lymphozyten der Kontrollgruppe; SD(Tu)=6,52; SD(Ko)=8,74; n(Tu)=6; n(Ko)=6

Nach Inkubation in Serum gesunder Spender erhöhte sich der Wert der CTLA-4-Expression geringfügig um 5,9 %.

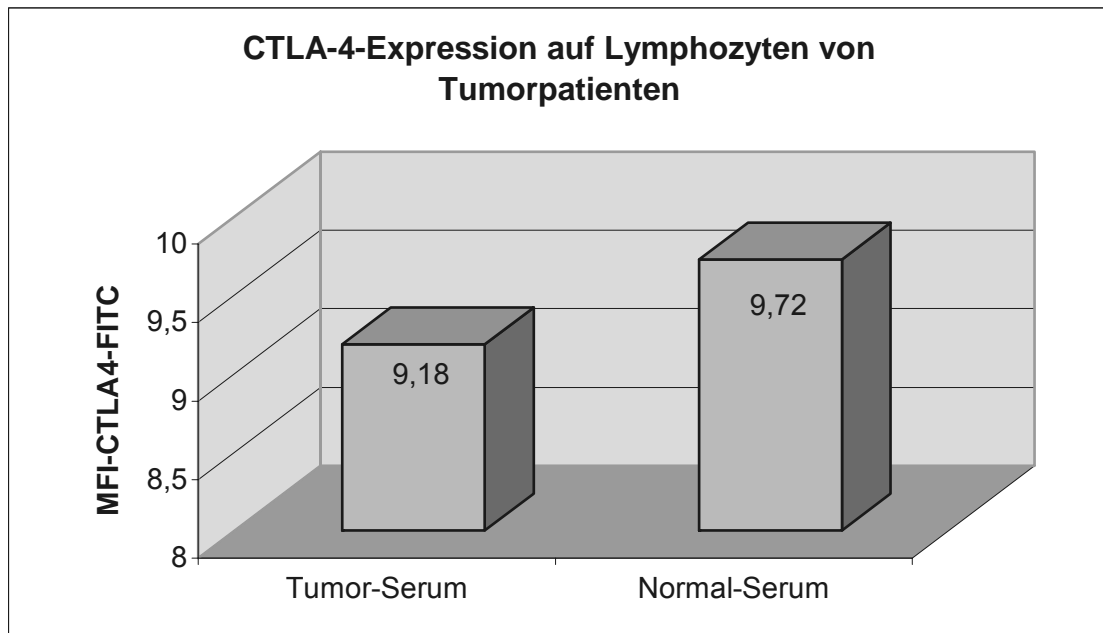


Abbildung 3-46: Geringfügig erhöhte CTLA-4-Expression nach Inkubation in Serum gesunder Probanden; SD(Tu)=6,52; SD(Ko)=4,35; n=6

Auf den Lymphozyten gesunder Spender war nach Inkubation in Serum von Tumorpatienten die Expression von CTLA-4 um durchschnittlich 16,7% vermindert.

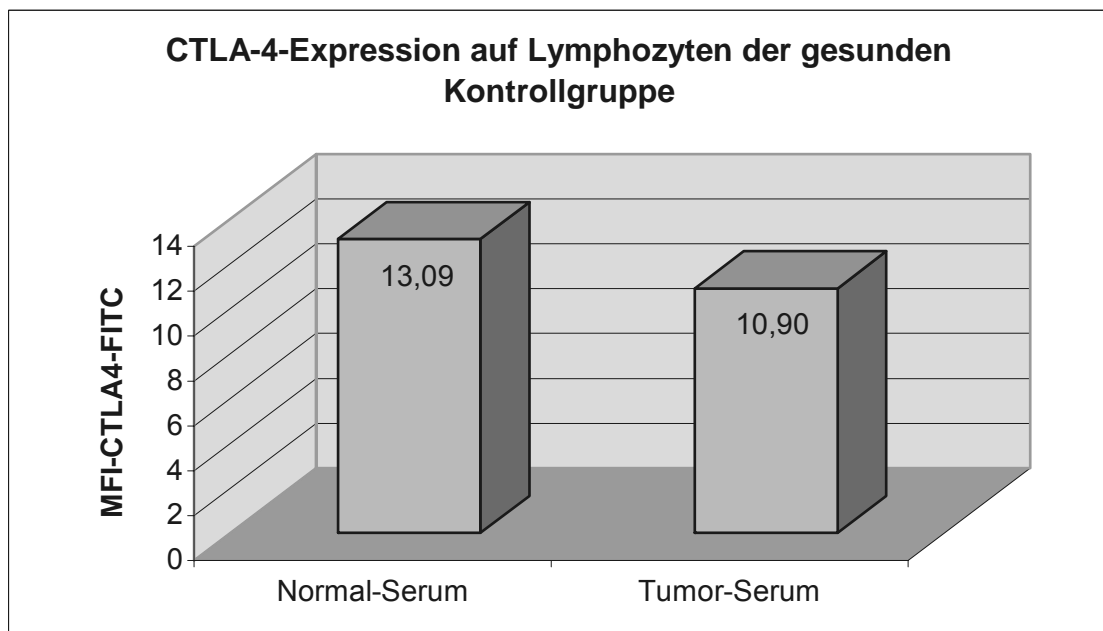


Abbildung 3-47: Herunterregulation von CTLA-4 auf Lymphozyten der gesunden Kontrollgruppe nach Inkubation in Tumor-Serum; SD(nS)=8,74; SD(tS)=5,88; n=6

3.2.2 CD28 / TCR-zeta

Bei den Experimenten bezüglich des CD28 konnten keine wesentlichen Veränderungen der Molekülexpression zwischen Gesunden und an einem SCCHN Erkrankten beobachtet werden (Ergebnisse nicht aufgeführt).

Nach Inkubation in autologem Serum zeigten sich hier erhöhte Werte an TCR-zeta bei Tumorpatienten im Vergleich zu der gesunden Probandengruppe.

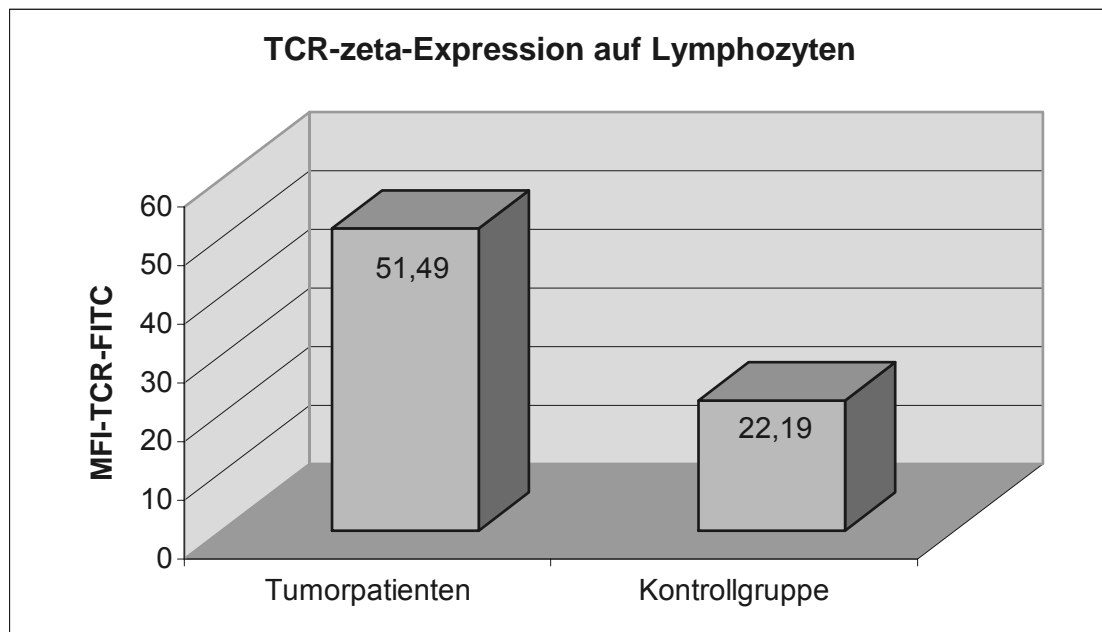


Abbildung 3-48: Verminderte Expression von TCR-zeta auf Lymphozyten der gesunden Kontrollgruppe; SD(Tu)=33,51; SD(Ko)=22,43; n(Tu)=6; n(Ko)=6

Nach Inkubation in Serum gesunder Probanden waren die TCR-Zeta-Werte durchschnittlich um 23,5% erniedrigt.

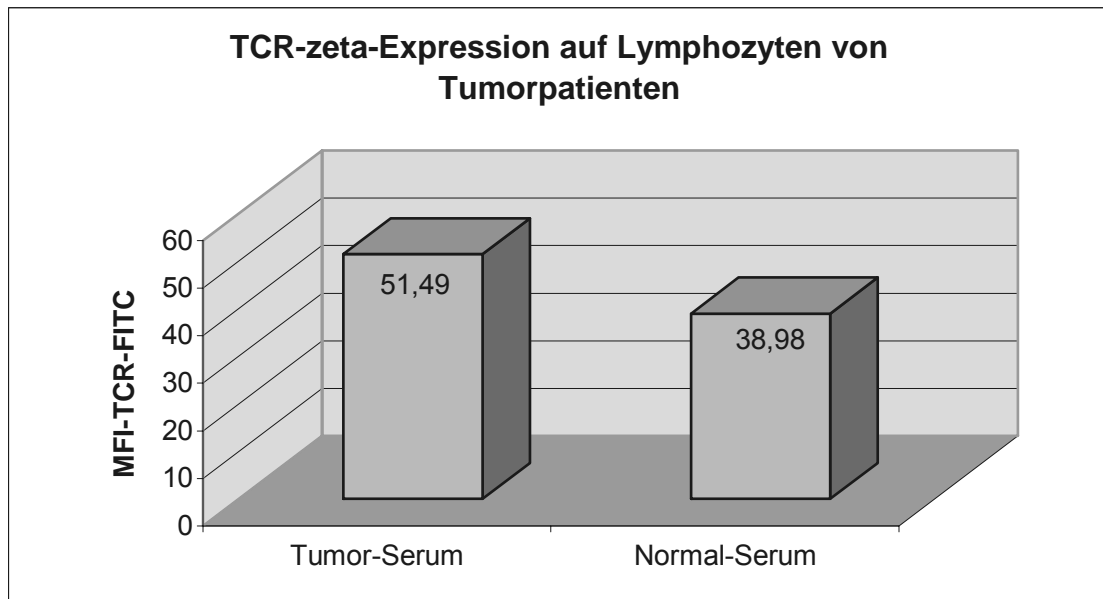


Abbildung 3-49: Herabregulation von TCR-zeta nach Inkubation in Serum gesunder Spender; SD(tS)=33,56; SD(nS)=21,70; n=6

Die TCR-zeta-Expression auf Lymphozyten gesunder Probanden waren nach Inkubation in Serum von Karzinompatienten durchschnittlich um 12,9% signifikant erniedrigt ($p=0,0318$).

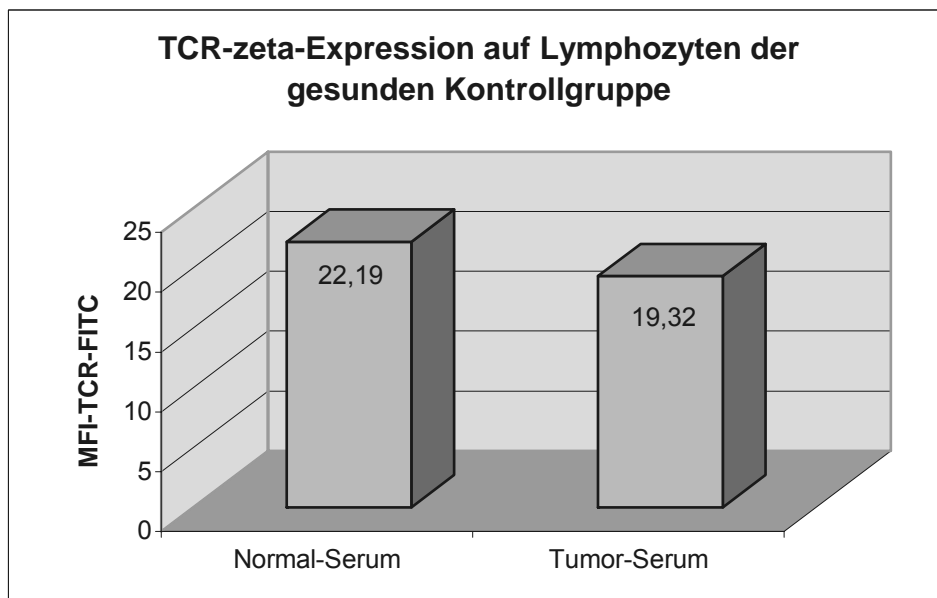


Abbildung 3-50: Auf Lymphozyten der gesunden Probanden erbrachte die Inkubation in mit Serum von Tumorpatienten ebenfalls eine Erniedrigung der Rezeptordichte; SD(nS)=22,41; SD(tS)=18,42; n=6

3.2.3 Lymphozyten in Überstand einer FaDu-Karzinomzelllinie

Lymphozyten von Normalspendern und von Tumorpatienten wurden jeweils für 48 Stunden in Kälberserum inkubiert ohne und mit Zugabe von Überstand einer im eigenen Labor kultivierten Zellkultur der FaDu-Karzinomzelllinie. Hierbei konnte für keines der 3 Moleküle CTLA-4, CD18 und TCR-zeta ein wesentlicher Unterschied in der Expression festgestellt werden.

3.2.4 Zusammenfassung Lymphozytenanalysen

- a) Es ergeben sich geringfügig erhöhte CTLA-4-Werte bei Gesunden.
- b) Auf Lymphozyten von Tumorpatienten kann eine geringfügige Upregulation von CTLA-4 durch Serum der Kontrolle erzeugt werden, auf Lymphozyten Gesunder zeigt sich eine geringfügige Downregulation durch Serum von Tumorpatienten.
- c) Es waren keine Veränderungen der CD28-Expression nachweisbar.
- d) Ebenfalls waren keine konstanten Veränderungen der TCR-zeta-Expression ersichtlich.
- e) Ebenso ergaben sich keine Veränderungen der untersuchten Moleküle nach Inkubation mit Überstand einer Karzinomzelllinie.

3.3 Funktionelle Analyse der Monozytenadhäsion

Im Rahmen der folgenden Experimente sollte geklärt werden, ob die Inkubation mit Tumorserum nicht nur zu einer Veränderung des monozytären Phänotyps führt, sondern auch funktionelle Konsequenzen nach sich zieht. Die hier dargestellten Experimente beziehen sich jeweils auf eine ICAM-1-vermittelte Adhäsionsfähigkeit, auch wenn nur das Stichwort „Adhäsion“ genannt ist.

3.3.1 Konzentrationen an gelöstem ICAM-1

Da es für andere Tumorentitäten bekannt ist, dass Karzinompatienten häufig erhöhte Serumspiegel an gelöstem ICAM-1 haben (Ozer 2003, O'Hanlon 2002, Arak 2001) und diese die β 2-Integrin-vermittelte Adhäsion mit an Platten gebundenem ICAM-1 inhibieren können, wurden die Serumkonzentrationen an löslichem ICAM-1 bei der Gruppe der Tumorpatienten sowie der Kontrollgruppe durch einen h-sICAM-1-ELISA-Test von Boehringer Mannheim (Cat.No. 1-573-659) bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass die Messwerte bei Tumorpatienten zwar etwas erhöht waren gegenüber der Kontrollgruppe, jedoch ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,164$). Somit sollten die jeweiligen Serumspiegel keinen wesentlichen Einfluss auf die nachfolgenden Experimente haben.

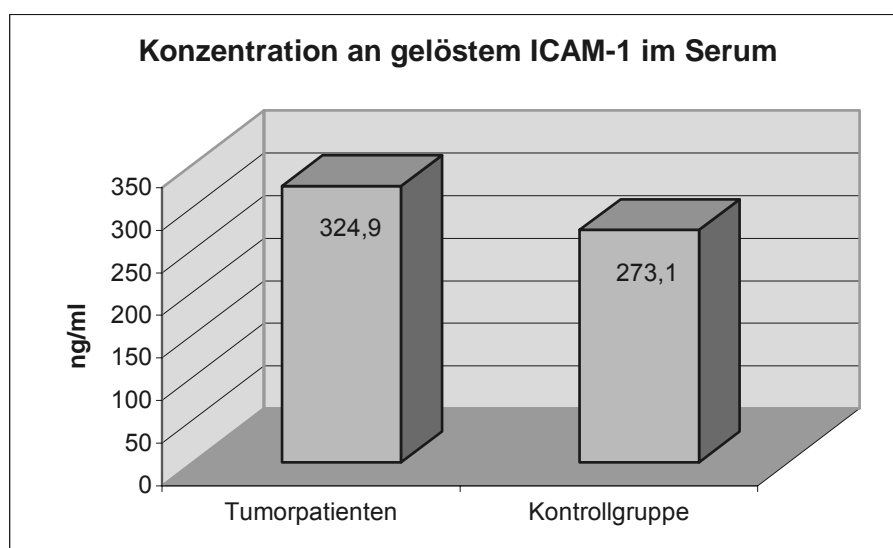


Abbildung 3-51: Kein signifikanter Unterschied an gelöstem ICAM-1 i.S. zwischen den Patienten und der Kontrollgruppe; $p=0,164$; $SD(Tu)=191,4$; $SD(Ko)=109,3$; $n(Tu)=20$; $n(Ko)=16$

3.3.2 Vergleich Tumorpatienten - gesunde Probanden

Nach Behandlung der Monozyten nach unter Kapitel 2.4 beschriebenem Adhäsionsassay zeigte sich, dass Monozyten von SCCHN-Patienten nach Inkubation in eigenem Serum ein reduziertes Adhäsionsvermögen an rekombinant hergestelltes ICAM-1 auf Zellkulturplatten haben im Vergleich zu Kulturen von Zellen gesunder Spender die ebenso in autologem Serum inkubiert wurden, das Signifikanzniveau wurde jedoch verfehlt.

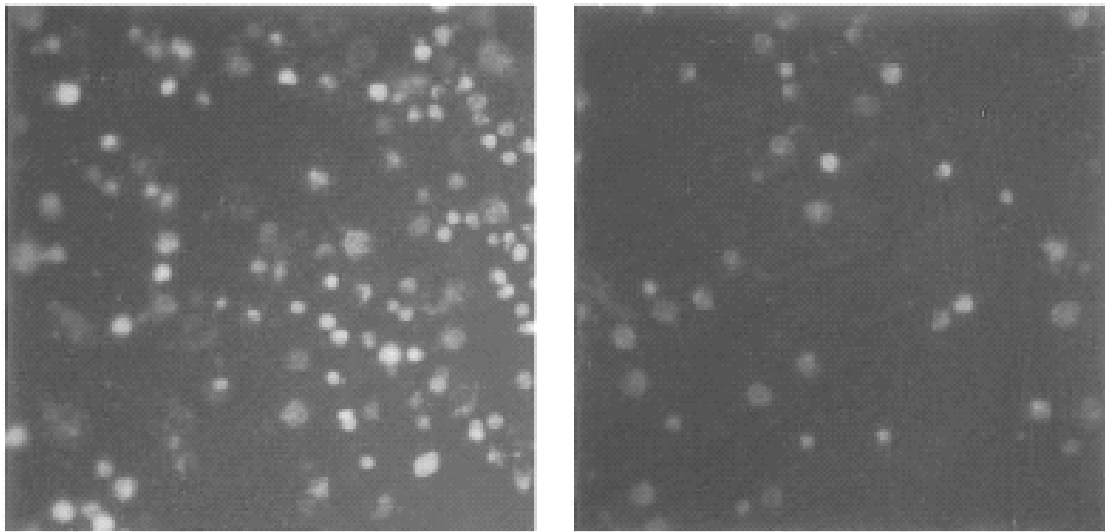


Abbildung 3-52: Reduziertes Adhäsionsvermögen nach Inkubation in autologem Serum bei Monozyten von Tumorpatienten im Vergleich zu Monozyten von gesunden Probanden

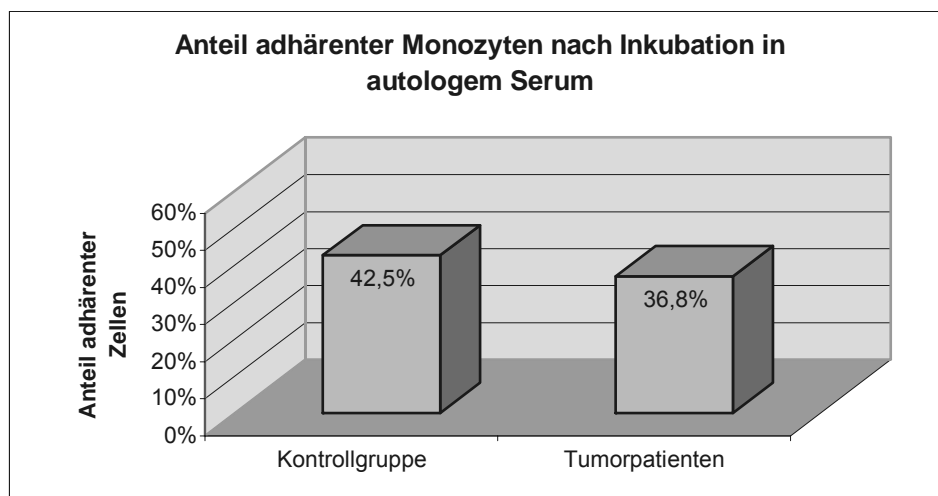


Abbildung 3-53: Die Fähigkeit der Monozyten zur Adhäsion an ICAM ist größer bei der gesunden Kontrollgruppe als bei Tumorpatienten, jedoch keine statistische Signifikanz; $SD(Ko)=0,176$; $SD(Tu)=0,153$; $n(Ko)=10$; $n(Tu)=14$

3.3.3 Monozyten von Tumorpatienten

Es wurde jedoch deutlich, dass die reduzierte Fähigkeit zur Bindung an ICAM-1 bei Tumormonozyten nach Inkubation in Serum gesunder Spender signifikant verbessert werden konnte ($p=0,0002$).

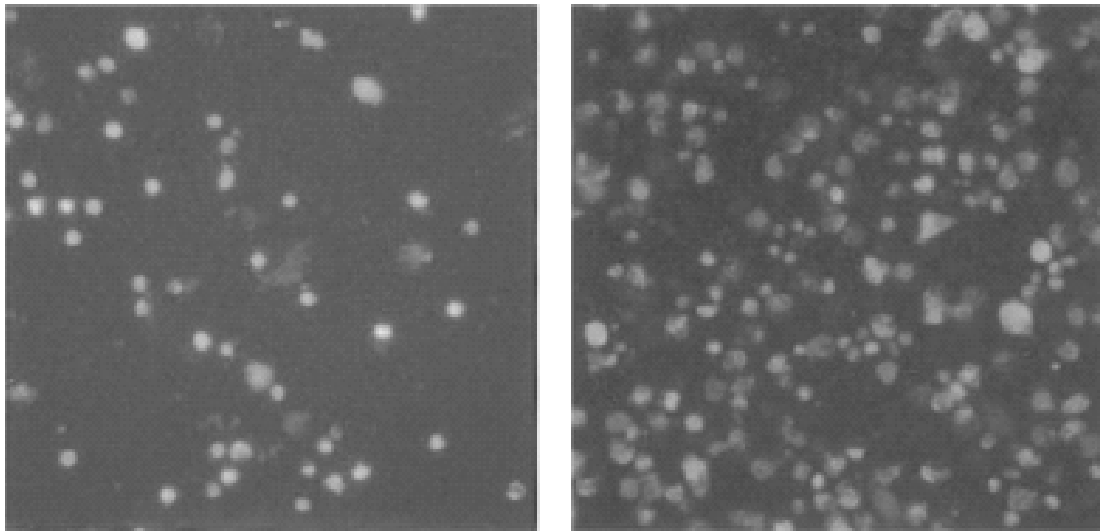


Abbildung 3-54: Gesteigerte Adhäsionsfähigkeit an ICAM-1 von Monozyten von Tumorpatienten nach Inkubation in Serum gesunder Spender

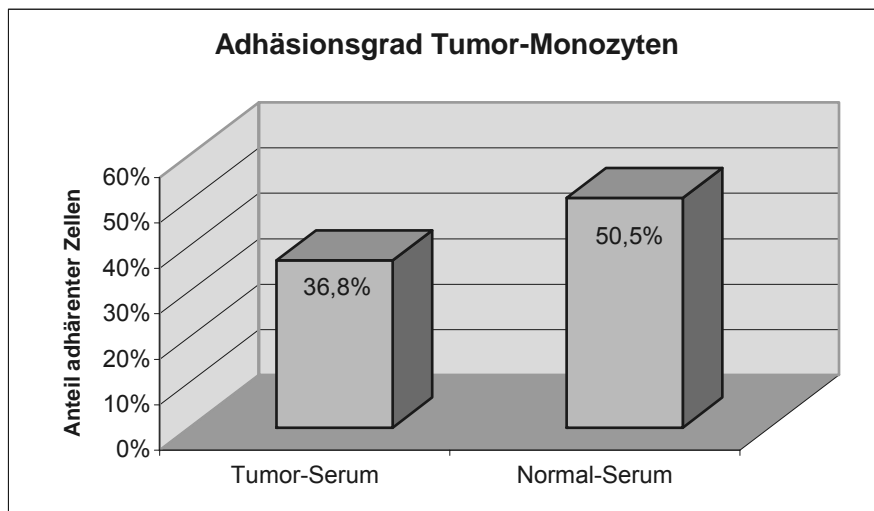


Abbildung 3-55: Der Anteil der an ICAM-1 adhärenter Monozyten der Tumorpatienten liegt signifikant höher nach Inkubation mit Serum gesunder Spender ($p=0,0002$); $SD(tS)=0,153$; $SD(nS)=0,193$; $n=24$

Ein Vergleich der Daten in Bezug auf das Tumorstadium ergab, dass dieser Effekt der Restauration des Adhäsionsvermögens signifikant stärker ausgeprägt war, wenn es sich um einen großen Ausgangstumor gehandelt hatte ($p=0,0336$).

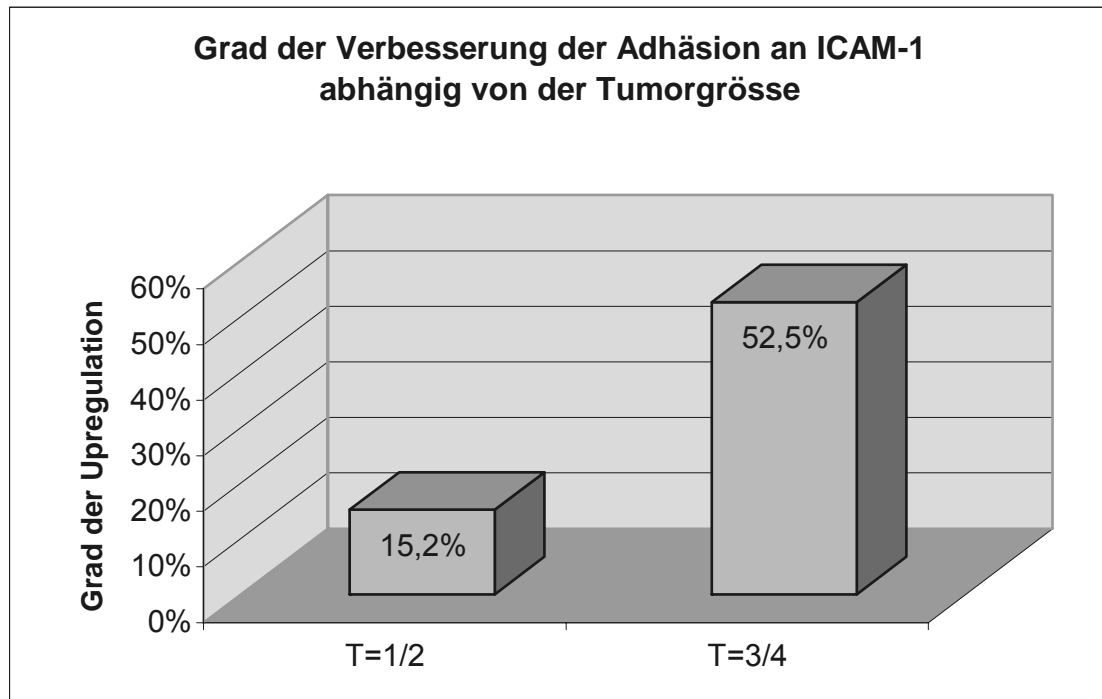


Abbildung 3-56: Nach Inkubation in Serum gesunder Spender konnte die Fähigkeit zur Adhäsion deutlich stärker heraufreguliert werden, wenn es sich um Zellen eines mit einem großen Tumor belasteten Patienten handelte ($p=0,0363$); $SD(1/2)=0,130$; $SD(3/4)=0,373$; $n(1/2)=8$; $n(3/4)=16$

Ebenso traf dies zu bei positivem Lymphknotenbefall oder entdifferenzierten Tumoren, jedoch war hier keine statistische Signifikanz nachweisbar.

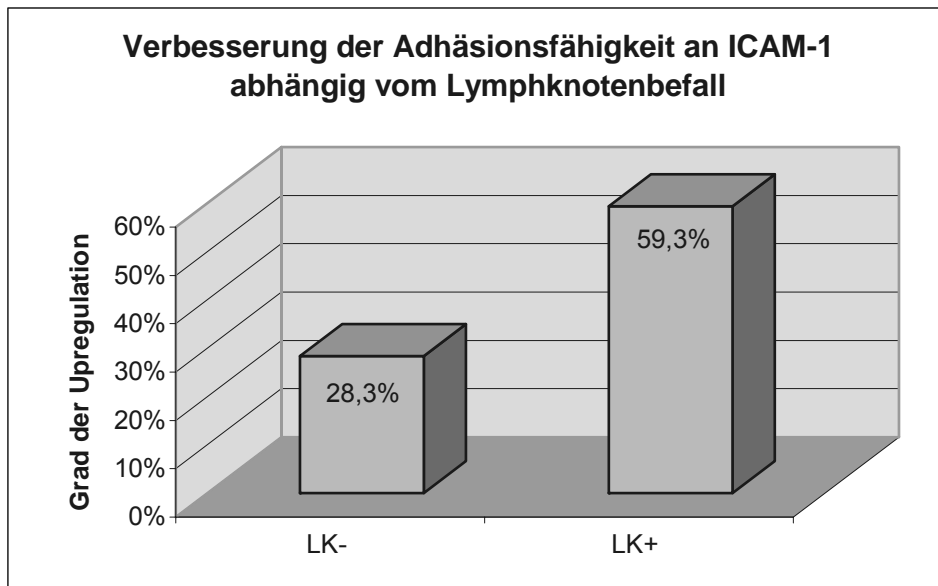


Abbildung 3-57: Nach Inkubation in Serum gesunder Spender konnte die Fähigkeit zur Adhäsion stärker wiederhergestellt werden, wenn bereits ein Lymphknotenbefall vorlag (nicht signifikant); n(LK-)=10; n(LK+)=14

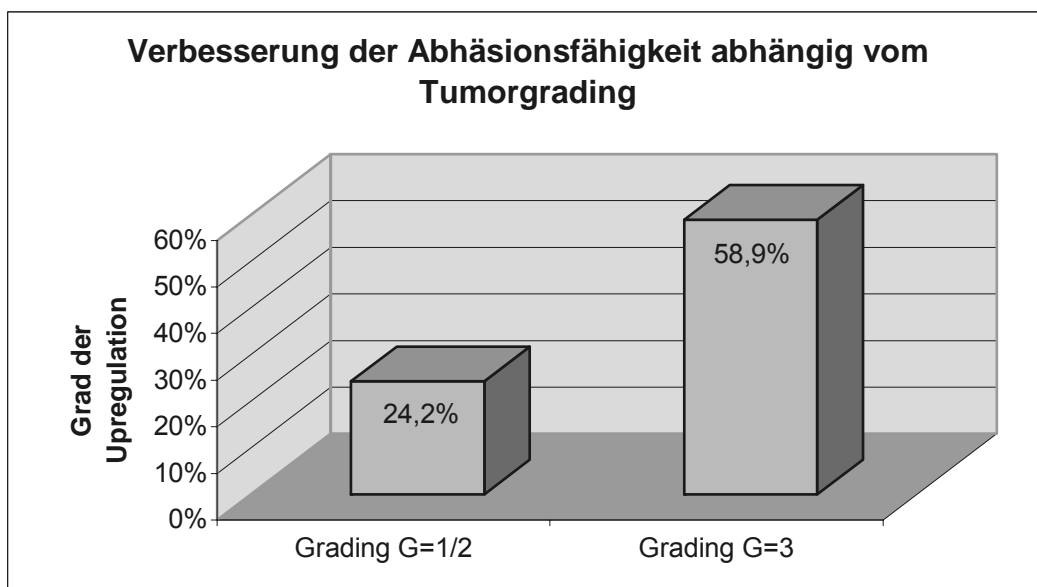


Abbildung 3-58: Ebenso war dieser Effekt größer, wenn es sich um einen entdifferenzierten Tumor handelte, keine statistische Signifikanz; n(G1/2)=12; n(G3)=12

3.3.4 Monozyten gesunder Probanden

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Monozyten gesunder Probanden ein erniedrigtes Adhäsionsvermögen aufwiesen, nachdem sie statt in eigenem Serum in Serum von Karzinompatienten inkubiert wurden. Das Signifikanzniveau wurde mit $p=0,0645$ jedoch knapp verfehlt.

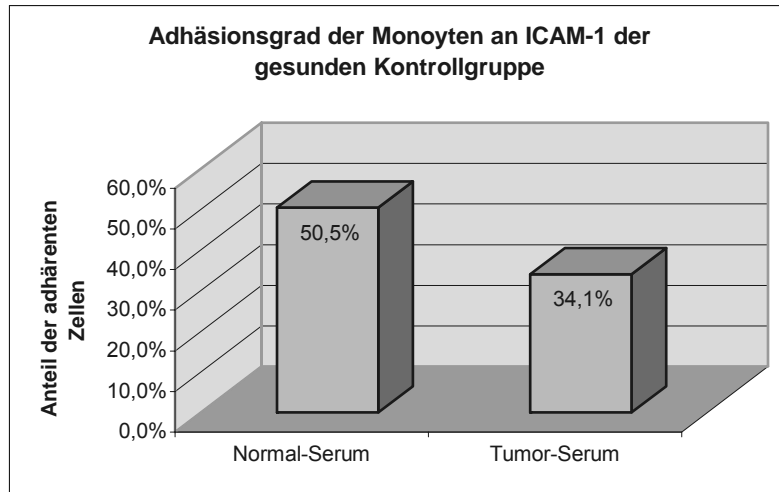


Abbildung 3-59: Herabregulation der Adhäsionsfähigkeit nach Inkubation gesunder Monozyten in Serum von Tumorpatienten

3.3.5 Zusammenfassung

- Die Fähigkeit zur Adhäsion an rekombinant hergestelltes ICAM ist bei Monozyten von Tumorpatienten vermindert im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, jedoch nicht statistisch signifikant.
- Nach Inkubation von „Tumormonozyten“ mit Serum gesunder Spender stieg die Adhäsion signifikant an.
- Dieser Effekt der Upregulation ist signifikant stärker ausgeprägt, wenn es sich um ein fortgeschrittenes Tumorstadium handelt.
- Nach Inkubation mit Serum von Tumorpatienten sinkt die Fähigkeit zur Adhäsion gesunder Monozyten.

3.4 Postoperative Restauration der supprimierten Monozytenfunktion

Da in klinischen Studien gezeigt werden konnte, dass sich die bei SCCHN-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden oftmals präoperativ erhöhte PGE-2-Serumkonzentration postoperativ normalisierte (Klapan 1992), lag es nahe, zu untersuchen, ob nach erfolgter Tumorresektion der Wegfall dieses immunsuppressiven Stimulus auch Konsequenzen für die antitumoralen Eigenschaften von Monozyten hat: Alle bisher untersuchten rezidivfreien Patienten (n=5) zeigten 4-6 Monate postoperativ eine komplette Erholung der präoperativ supprimierten CCR5- sowie CD11b-Expression, d.h. die Inkubation von Monozyten ehemaliger Tumorpatienten in autologem Serum oder gesundem Normalspenderserum zeigte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Höhe der jeweiligen Rezeptorexpression. Andersherum resultierte bei Normalspendermonozyten die Inkubation mit eigenem oder Serum ehemaliger Tumorpatienten in keiner unterschiedlichen Rezeptorexpression. Darüber hinaus lag auch das Adhäsionsvermögen von Monozyten, isoliert von Patienten nach Tumorresektion, auf dem Niveau gesunder Probanden, d.h. die Inkubation mit autologem Serum führte postoperativ nicht mehr zu der präoperativ beobachteten Suppression der Adhäsionsfähigkeit.

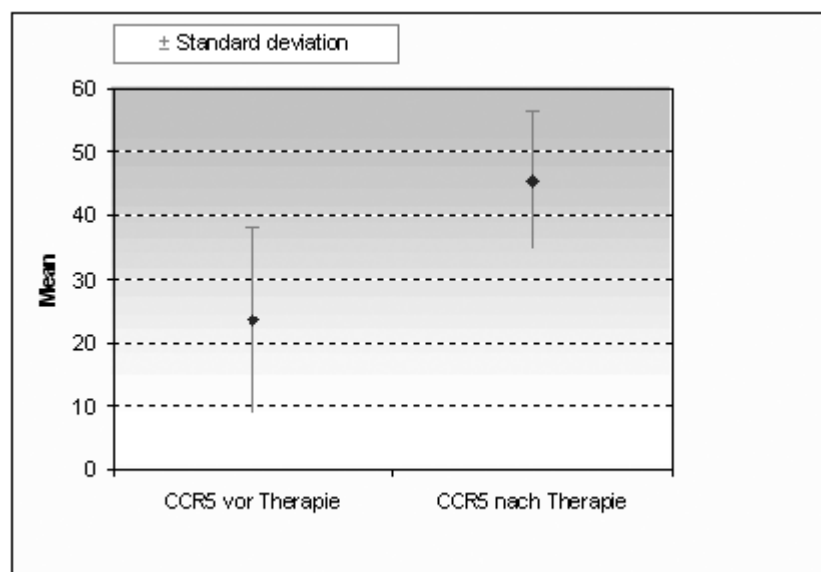


Abbildung 3-60: Postoperativ erhöhte Expression von CCR5 bei SCCHN-Patienten ($p=0,0416$)

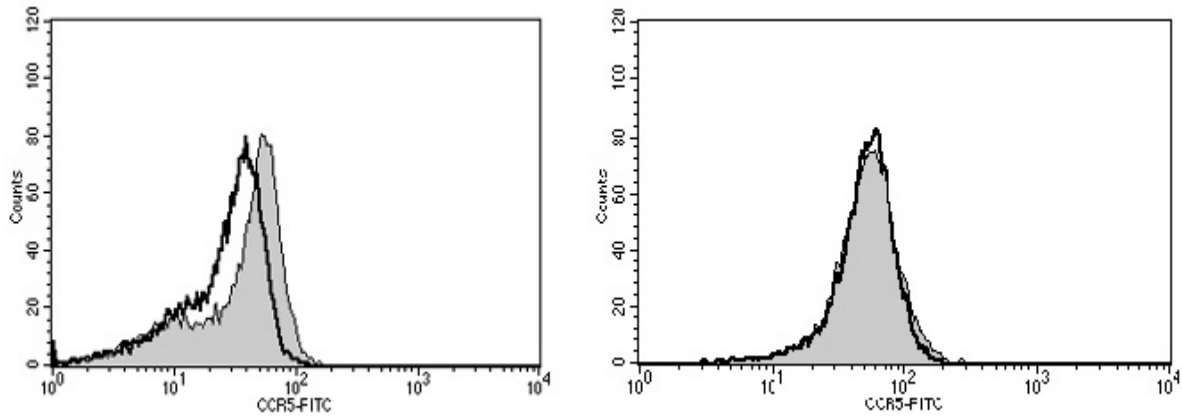


Abbildung 3-61: Auf Monozyten der Kontrolle lässt sich nach Inkubation in Serum von Tumorpatienten postoperativ (rechts) keine Herabregulation von CCR5 mehr feststellen

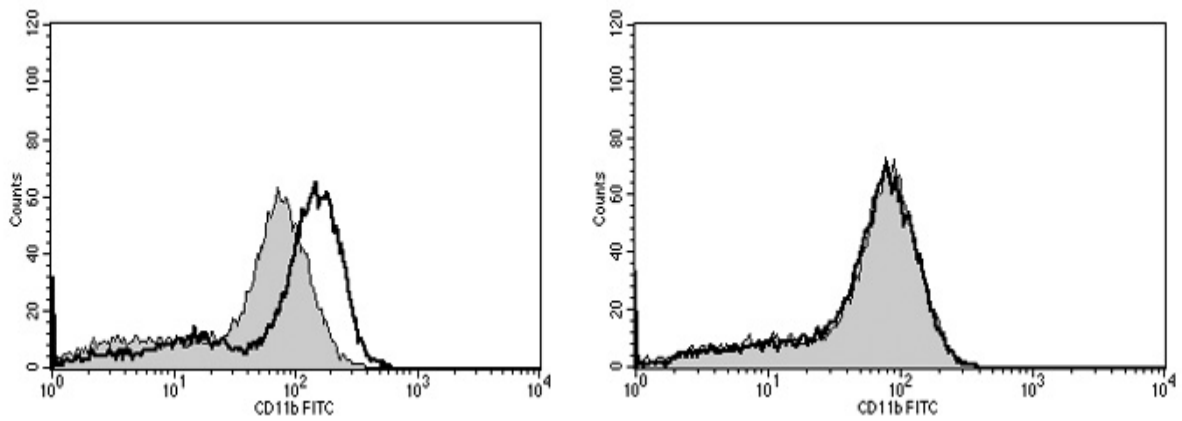


Abbildung 3-62: Auf Monozyten der Tumorpatienten lässt sich postoperativ (rechts) nach Inkubation in Serum der Kontrolle keine Heraufregulation mehr feststellen

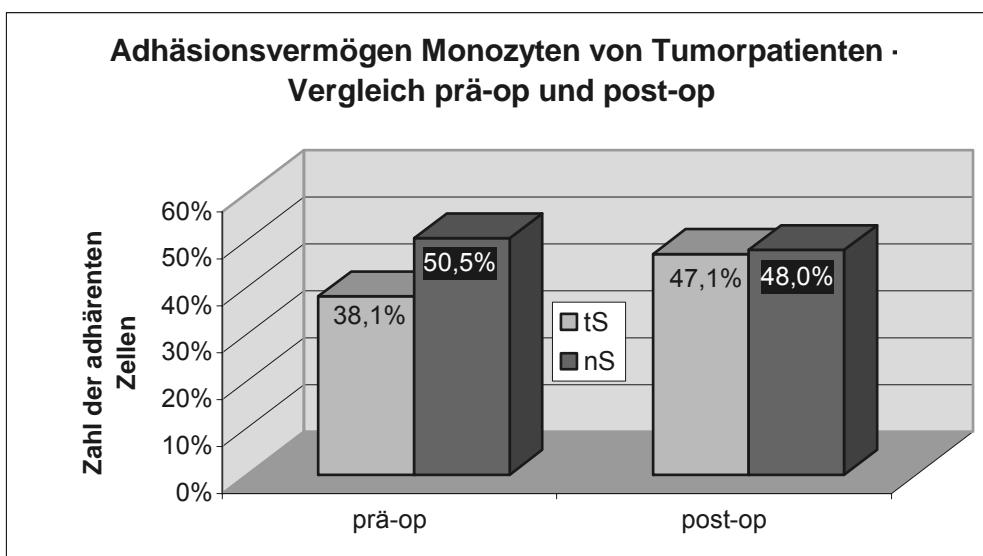


Abbildung 3-63: Nach Tumorresektion kein eingeschränktes Adhäsionsvermögen und keine „Heraufregulation“ nach Inkubation in Serum gesunder Spender

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Nochmals können die wesentlichen Ergebnisse dieser Untersuchung zusammengefasst werden:

- 1) Der Chemokinrezeptor CCR5 wird auf Monozyten gesunder Probanden signifikant stärker exprimiert als auf Monozyten von Karzinompatienten; die CCR5-Expression ist umso geringer, je weiter fortgeschritten die Tumorerkrankung ist, abhängig von den Faktoren Tumorgröße, Lymphknotenbefall und Differenzierungsgrad des Karzinoms. Durch Inkubation von Monozyten dieser Tumorpatienten mit Serum gesunder Probanden wird die Rezeptordichte an CCR5 signifikant erhöht. Diese Heraufregulation der CCR5-Rezeptordichte durch gesundes Serum ist umso stärker ausgeprägt, je weiter fortgeschritten das Stadium des Karzinoms der betreffenden Patienten ist.
- 2) Durch Inkubation von Monozyten gesunder Probanden mit Serum von Karzinompatienten wird die Rezeptordichte von CCR5 erniedrigt. Diese Herabregulation an CCR5 durch Tumorserum ist umso stärker ausgeprägt, je größer das Stadium des Karzinoms des Patienten ist, mit dessen Serum die gesunden Monozyten behandelt werden.
- 3) Der Chemokinrezeptor CCR2 wird auf Monozyten gesunder Probanden geringgradig stärker exprimiert als auf Monozyten von Tumorpatienten. Die Rezeptordichte auf Monozyten der Karzinompatienten ist signifikant vom Tumorstadium abhängig, ein fortgeschrittenes Tumorstadium geht mit einer erniedrigten Rezeptordichte einher. Durch Inkubation mit Serum gesunder Probanden ließ sich die Rezeptordichte auf Monozyten von an fortgeschrittenem SCCHN Erkrankten (Tumorstadium pT3 oder pT4 mit positivem Lymphknotenbefall) signifikant erhöhen.
- 4) Es lässt sich eine signifikant höhere CD11b-Rate bei Gesunden nachweisen, eine Heraufregulation von Mac-1 bei Tumorpatienten nach

Inkubation in Serum von gesunden Spendern war ebenfalls eindeutig, jedoch zeigte sich nur eine geringe Herabregulation auf gesunden Monozyten nach Inkubation in Serum von Karzinompatienten.

- 5) Es zeigen sich erhöhte CTLA-4-Werte bei Gesunden, jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede bei den untersuchten Oberflächenrezeptoren CD28, TCR-zeta, CTLA-4 auf Lymphozyten festgestellt werden.
- 6) Die Fähigkeit zur Adhäsion an rekombinant hergestelltes ICAM ist bei Monozyten von Tumorpatienten vermindert im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, nach Inkubation von „Tumormonozyten“ mit Serum gesunder Spender stieg die Adhäsionsfähigkeit signifikant an. Dieser Effekt der Upregulation ist signifikant stärker ausgeprägt, wenn es sich um ein fortgeschrittenes Tumorstadium handelt. Nach Inkubation mit Serum von Tumorpatienten sinkt die Fähigkeit zur Adhäsion gesunder Monozyten.
- 7) Postoperativ war eine komplette Erholung der präoperativ supprimierten CCR5- sowie CD11b-Expression nachzuweisen. Darüber hinaus lag auch das Adhäsionsvermögen von Monozyten, isoliert von Patienten nach Tumorresektion, auf dem Niveau gesunder Probanden, d.h. die Inkubation mit autologem Serum führte postoperativ nicht mehr zu der präoperativ beobachteten Suppression der Adhäsionsfähigkeit.

4.2 Hintergrund der Untersuchungen

Tumorentwicklung und Tumorwachstum werden begünstigt durch abgeschwächte spezifische immunologische Reaktionen wie z.B. schwache Proliferation von Immunzellen oder herabgesetzte Aktivität zytolytischer T-Lymphozyten (Choi 1998). Obwohl neueste Erkenntnisse verschiedene Wirkmechanismen des Tumors auf das Immunsystem nachweisen, so sind die wahren Gründe für einen Immundefekt bei mit Tumor belasteten Organismen noch immer nicht klar und die klinische Bedeutung der bisher erhaltenen Ergebnisse noch ungewiss.

Die verschiedenen Bestandteile des menschlichen Immunsystems wurden unter Kapitel 1.2 kurz aufgeführt. Klar ist, dass Phagozyten als direkte „Entsorger“ identifizierter Tumorzellen einen wesentlichen Baustein der immunologischen Tumorabwehr darstellen. Diese Elimination scheint bei fortgeschrittenen bösartigen Tumorerkrankungen abgeschwächt zu sein (Janeway 2000), daher lag eine Untersuchung der Monozyten, die die im Blut zirkulierende Form der Phagozyten darstellen, nahe. Verschiedene Faktoren beeinflussen die Wanderung der Blutmonozyten ins Gewebe, wobei der Mechanismus der Chemotaxis entscheidend für die zielgerichtete Wanderung der Effektorzellen ist.

Hierbei spielen die bei Entzündungsreaktionen und auch bei Auftreten von Tumoren freigesetzten Chemokine eine entscheidende Rolle (Sallusto 1998, Rollins 1997). Eine Schlüsselrolle der Chemokinrezeptoren konnte in letzter Zeit bei diversen Erkrankungen (HIV, Typ-1-Diabetes, Autoimmunerkrankungen; Luster 1998) nachgewiesen werden und somit erscheinen diese besonders interessant für neueste Untersuchungen. Nachdem Zeidler et al zeigen konnten, dass (von Tumoren produziert) Prostaglandin E₂ die Monozytenfunktion durch Hemmung der CCR-5-Expression auf Monozyten beeinflusst (Zeidler 2000), sollte in dieser Arbeit der CCR-5 und weitere Rezeptoren bei an einem Karzinom Erkrankten näher untersucht werden. Weiterhin wurden mit Überprüfung der Adhäsionsfähigkeit von Monozyten die Erkenntnisse der strukturellen immunologischen Defizite um eine funktionelle Untersuchung erweitert.

Mit der Überprüfung auf strukturelle Defekte auf Lymphozyten wurde ein zweiter Mechanismus der immunologischen Tumorabwehr untersucht, da in den letzten Jahren mehrere Arbeiten über lymphozytäre Rezeptordefekte bei Malignomerkrankungen veröffentlicht wurden (Sikora 2001, Radoja 2000, Bronte 2003, Onishi 2002).

Nachdem sich bei den Monozytenanalysen hochsignifikante Ergebnisse darstellten, war es sehr interessant zu untersuchen, inwiefern sich nach kompletter Resektion des Malignoms die strukturellen und funktionellen Defizite wieder normalisierten. Hierzu wurden Patienten nach erfolgter Operation mit kompletter Resektion des Tumors (R0), die nach 6 Monaten rezidivfrei waren, nochmals in das Klinikum einbestellt und die Untersuchungen noch einmal durchgeführt.

4.3 Bedeutung der Oberflächenmoleküle

Monozyten entwickeln sich im speziellen Mikromilieu des Knochenmarks über verschiedene proliferierende Vorläuferstufen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Als reife Monozyten treten sie in den Blutstrom ein und verbleiben ca. zwei bis drei Tage in der Zirkulation. Ihr Anteil an den weißen Blutkörperchen (Leukozyten) beträgt normalerweise zwei bis acht Prozent. Zusammen mit den Makrophagen sind sie die klassischen Effektorzellen der angeborenen Immunität. Sie zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zur Phagozytose und durch ihr breites Spektrum an Sekretionsprodukten aus.

Auf zum Teil noch unbekannt Signale hin adhären sie am Endothel der Blutgefäße und transmigrieren in das darunter liegende Gewebe. Bei Entzündungsreaktionen (wie auch bei Vorhandensein eines Tumors) werden Monozyten durch bestimmte Chemokine angelockt, die, am Ort der Entzündung produziert, einen chemotaktischen Gradienten ausbilden. Weniger klar ist, durch welche Signale die konstitutive Auswanderung in gesundes Gewebe gesteuert wird.

Prinzipiell können Monozyten im Gewebe zu Makrophagen, Dendritischen Zellen oder sogar zu mehrkernigen Osteoklasten differenzieren. Über den genauen Differenzierungsweg entscheiden wahrscheinlich lokale

gewebespezifische Faktoren (z.B. Pathogene, lösliche Mediatoren, extrazelluläre Matrixmoleküle oder Oberflächenmoleküle benachbarter Zellen).

Die verschiedenen Chemokinrezeptoren an der Oberfläche der Monozyten sind in Abbildung 1-3 in Kapitel 1.5.3 ausführlich dargestellt. Der Chemokinrezeptor CCR-5 mit seinen Liganden MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES stellt einen effektiven Steuerungsmechanismus der Chemotaxis dar und erlangte aktuell besondere Beachtung nach Identifikation als Co-Rezeptor bei der HIV-Infektion (Baggiolini 1997). Thivierge et al zeigten eine Herabregulation der CCR-5-Dichte nach Gabe von Prostaglandinen und postulierten hierzu eine erniedrigte Infektionsrate mit dem HI-Virus. (Thivierge 1998). Zeidler zeigte eine herabgesetzte CCR-5-Expression auf Monozyten nach Inkubation in Prostaglandinen sowie erhöhte Prostaglandinkonzentrationen im Serum bei Karzinompatienten (Zeidler 2000).

Das heterodimere Integrin MAC-1 (auf Monozyten und Granulozyten exprimierbar) mit den Komponenten CD11b und CD18 vermittelt durch Bindung an den Endothelzellrezeptor ICAM-1 die Adhäsion der jeweiligen Leukozyten an das Endothel und die Transmigration der Phagozyten zum Entzündungsherd (Makgoba 1988). Durch Bindung an MAC-1 werden die Zellen am Ort der Entzündungsreaktion gehalten und aktiviert (Burns 1994). Neue Untersuchungen zeigen, dass das Vorhandensein von Mac-1 ein entscheidender Faktor zur Zytotoxizität der Leukozyten ist (van Spriel 2001).

4.4 Kritische Beurteilung der Ergebnisse und mögliche klinische Relevanz

Im Rahmen der Untersuchungen stellten sich oben nochmals zusammengefasste Ergebnisse dar. Hierbei wurde deutlich, dass der Vorgang der Chemotaxis und der Transmigration bei den monozytären Effektorzellen des Immunsystems durch die erniedrigte Dichte an benötigten Oberflächenrezeptoren entscheidend erschwert ist. Durch die erniedrigte

Expression des Chemokinrezeptors CCR-5 können chemotaktische Signale schlechter wahrgenommen werden, somit ist die zielgerichtete Orientierung der Monozyten gestört und die Phagozytoserate aufgrund des geringeren Auftretens von Phagozyten, welche aus den Monozyten hervorgehen, gegenüber einem gesunden Organismus erniedrigt.

Die CD11b-Kette des Mac-1-Integrins zur Endotheladhäsion ist bei Karzinompatienten vermindert, durch die funktionelle Untersuchung der Adhäsionsfähigkeit konnte in dieser Arbeit erstmalig ein Funktionsverlust in der Immunantwort zur Tumorbekämpfung direkt bewiesen werden. Hierbei wird klar, dass aufgrund der verminderten Fähigkeit der Monozyten, an das Endothel zu adhären und weiter in das Gewebe zu migrieren, ein entscheidender Mechanismus der supprimierten Immunantwort aufgeschlüsselt werden konnte. In Folgeuntersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten die erhaltenen Erkenntnisse nochmals bestätigt werden (Lang 2003).

Besonders interessant erscheint die Feststellung, dass nach erfolgter kompletter Tumoresektion und Lymphknotendissektion und einem rezidivfreien Zeitraum von 6 Monaten die zuvor supprimierte Immunfunktion sich wieder normalisiert hatte. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass auf Monozyten von gesunden Probanden durch Inkubation in Serum von Tumorpatienten eine supprimierte Immunfunktion hervorgerufen wird. Somit liegt der Schluss nahe, dass im Serum vom Tumorpatienten gewisse Metaboliten vorhanden sind, die unter anderem auch die Expression der untersuchten Oberflächenrezeptoren auf Monozyten unterdrücken und somit über eine erschwerte körpereigene Bekämpfung ein Fortschreiten der Tumorerkrankung fördern. Verschiedene Arbeiten konnten beispielsweise erhöhte Spiegel an Prostaglandinen im Rahmen von Kopf und Halskarzinomen nachweisen (Snyderman 1994, Klapan 1991, Milanovich 1995), verschiedene andere Faktoren sind derzeit Gegenstand der heutigen Untersuchungen. Schwierig dürfte die Unterscheidung sein, ob

immunsuppressiv wirksame Metaboliten von den Tumorzellen selbst produziert werden können, oder ob diese im komplexen immunologischen Regelkreis als Antwort auf das Vorhandensein eines Tumors vom eigenen Körper hergestellt werden und somit als eine Art Auto-Immunreaktion aufzufassen sind.

Natürlich erscheint der Versuch attraktiv, medikamentös in diese immunsuppressiven Stoffwechselfvorgänge einzugreifen, wie es mit der selektiven Inhibition der Cyclooxygenase-2 in ersten klinisch Studien bereits erfolgt ist, jedoch bedarf es noch einer Vielzahl an genauen Erkenntnissen, bevor ein wirklich wirksamer Eingriff in diesen Regelkreis bewiesen werden kann.

Dennoch stellen die in dieser Arbeit veröffentlichten Ergebnisse eine große Motivation zur weiteren Untersuchung der Immunologie im Rahmen von Karzinomerkrankungen dar, da mit den derzeitigen etablierten Behandlungsverfahren die kurativen Möglichkeiten oftmals leider stark eingeschränkt sind.

4.5 Rückblick und Ausblick

Wie bereits erwähnt ist trotz verbesserter chirurgischer Techniken, der Einführung neuer Bestrahlungsverfahren und des Einsatzes adjuvanter Chemotherapeutika die Prognose von Hals- und Kopfkarzinomen in den letzten 30 Jahren unverändert schlecht.

Eine typische Anamnese eines Patienten mit einem Hals- oder Kopfkarzinom besteht in chronischem Nikotinabusus in Verbindung mit einer langen Episode an Alkoholmissbrauch sowie damit verbundener Mangelernährung. Tabakkonsum konnte als Hauptursache für das Auftreten von Lungenkrebs, Ösophaguskarzinomen und Malignomen im Kopf- und Halsbereich identifiziert werden. Neben seinem direkten karzinogenen Einfluss kann Tabakkonsum

darüber hinaus ebenso Veränderungen der zellulären und humoralen Immunität bedingen (Vlock 1991). So haben Zigarettenraucher z. B. auch deutlich erniedrigte Ig-A Konzentrationen im Speichel (Barton 1990). Ebenso kann dem Alkoholkonsum eine Rolle bei der Karzinomentstehung nachgewiesen werden, eine Verstärkung der Kanzerogenität wird bei Missbrauch von beidem beobachtet (Bross 1976, Herity 1982). Chronischer Alkoholmissbrauch wiederum führt zu einer Immunsuppression durch erniedrigte Konzentrationen der Lymphozyten (Palmer 1978). Weiterhin begünstigt eine Mangelernährung eine verschlechterte immunologische Abwehrlage (Law 1973).

Anhand verschiedener epidemiologischer Studien konnte gezeigt werden, dass durch drei entscheidende Verhaltensweisen eine Verringerung des Neuauftretens von SCCHN um circa 75% erreicht werden kann: Aufgeben des Rauchens, Reduzierung des Alkoholkonsums (vor allem hochprozentiger Getränke) und verstärkter Verzehr von Obst und Gemüse. Es ist klar geworden, dass man durch gezielte Prävention einen Grossteil der Krebsleiden im Kopf- und Halsbereich verhindern kann. Somit sollte die gezielte Information der Bevölkerung zur Prävention eine der epidemiologischen Hauptanliegen sein (Boyle 1992).

Derzeit werden verschiedene Methoden zur Krebsbekämpfung bei Versagen der chirurgischen Möglichkeiten untersucht, am meisten Erfolg versprechend erscheint zur Zeit die Entwicklung neuer immuntherapeutischer Verfahren. Ein möglicherweise aussichtsreicher Ansatz basiert auf der intravenösen Applikation bispezifischer Antikörper, die Immunzellen an Tumorzellen dirigieren, ein anderer Ansatz befasst sich mit der intratumoralen Applikation eines für IL-2 kodierenden Gens, um die aufgrund der Malignomerkrankung supprimierten Effektorpopulationen zu reaktivieren. Erste Resultate wie z.B. eine erhöhte Tumorzelllyse durch NK-Zellen nach Aktivierung durch appliziertes Interleukin-2 (Whiteside 1996) zeigen kleine Teilerfolge, doch müssen viele weitere Schritte erfolgen (Kastenbauer 1999).

Daneben gibt es viel versprechende Ansätze der effektiven Chemoprävention mit einer Vielzahl an untersuchten Substanzen, deren weitere Entwicklung sicher in der Zukunft ein weiterer Schritt zur Krebsbekämpfung sein wird (Boyle 1992). Verschiedene Autoren konnten eine erhöhte Synthese der Arachidonmetaboliten durch eine erhöhte Expression von Cyclooxygenase-2 im Rahmen von Malignomerkrankungen nachweisen (Panje 1981, Eberhart 1994, Murata 1999, Wolff 1999), welches unterschiedliche Bereiche der immunologischen Abwehr schwächt. Nach Gabe von selektiven COX-2-Inhibitoren waren einerseits die erhöhten Konzentrationen des Arachidonsäure-Stoffwechselprodukte wie auch die dadurch bedingten immunologischen Defizite reversibel (Morecki 1998, Taketo 1998, Schiff 1999). Cross et al wiesen nach Gabe eines Prostaglandinsynthetasehemmers eine höhere Zahl von Immunzellen in der Tumormasse nach (Cross 1992). Durch die gleichzeitige Verabreichung von Gabe von Indometacin, Cyclophosphatid und Zink konnten eine erhöhte Infiltration des Tumorgewebes mit Lymphozyten und eine erhöhte Tumorzelllyse bewiesen werden (Hadden 1994). Die Gabe von COX-2-Hemmern ist jedoch wie bei anderen NSAID mit gastrointestinalen Nebenwirkungen verbunden. Zu den häufigsten genannten Nebenwirkungen für beide Arzneimittel zählen gastrointestinale Blutungen, Magenulkus, Duodenalulkus, Ulkusperforation und Gastritis (Silverstein 2000), weshalb eine prophylaktische Gabe eines COX-Hemmers wieder in den Hintergrund gerückt ist. Eine aktuelle Arbeit von Lang et al kann jedoch nachweisen, dass die eingeschränkte monozytäre Funktion bei Karzinompatienten durch die Gabe eines spezifischen COX-2-Inhibitors wieder restauriert werden kann (Lang 2003), weitere Arbeiten stehen noch aus.

Ein anderer Ansatz der Chemoprävention basiert auf der Erkenntnis, dass eine Leukoplakie der Schleimhaut eine präkanzeröse Läsion darstellt (z.B. Reibel 2003), in ca. 18% dieser Läsionen entwickelt sich ein Karzinom, je nach Schwere der Dysplasie besteht das Risiko der malignen Entartung bei bis zu 43% (Papadimitrakopoulou 2002). Durch die Gabe von Retinoiden können diese Läsionen zurückgebildet oder zumindest ein Fortschreiten vermindert

werden, wobei oftmals nach Absetzen der Medikation die Dysplasien an gleicher Stelle wieder auftreten (Gorsky 2002). Hong et al konnten in einer doppelblinden, Placebo kontrollierten Studie nachweisen, dass nach Gabe von 13-cis-Retinoinsäure nach durchschnittlich 32 Monaten nur bei 4% der Patienten mit Leukoplakien ein Plattenepithelkarzinom entstand im Vergleich zu 24% bei der Kontrollgruppe (Hong 1997). Jedoch bestehen die Probleme der Retinoinsäure in Ihrer Toxizität, wobei vor allem Leberzellschäden, Hautaustrocknung und eine teratogene Wirkung im Vordergrund stehen (Shin 2001).

Immuntherapeutische Anstrengungen beim Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereiches sollte T-Zell-Adjuvantien, Immunrestauration sowie die sog. Kontrasuppression (Unterdrückung tumorbedingter immunsuppressiver Mechanismen) beinhalten. Eine unspezifische Stimulation z.B. mittels BCG-Impfung (Bacillus-Calmette-Guérin-Impfung (BCG) mit einem lebenden, attenuierten Stamm von Mycobacterium bovis) oder Levamisol hatte keinen nachweislichen Effekt. Wie bereits erwähnt haben erste Untersuchungen in Studien mit Indomethacin (ein nicht-selektiver COX-Inhibitor) und Plasmapherese ermutigende Ergebnisse gezeigt. Frühe Versuche mit lokaler Verabreichung von niedrig dosiertem Interferon-alpha und Interleukin-2 konnten Teilremissionen ohne wesentliche Toxizität durch ausgeprägte Infiltration des Tumorgewebes mit Leukozyten nachweisen (Hadden 1997).

Weitere Anstrengungen müssen unternommen werden, um die Mechanismen und die bestimmten Antigene darzustellen, die im Rahmen dieser Immunreaktionen beteiligt sind. Durch diese Arbeit konnten zumindest zwei wesentliche Bausteine der unterdrückten Immunabwehr durch die Tumorerkrankung identifiziert werden, nämlich die verminderte Fähigkeit der immunologischen Effektorzellen zur Chemotaxis und zur Haftung am Endothel im Rahmen des Migrationsprozesses. Ziel weiterführender Untersuchungen sollte sein, die für Immunsuppression verantwortlichen Metaboliten und deren Entstehung im Rahmen von Malignomerkrankungen zu identifizieren, was

jedoch noch einen lang andauernden Prozess darstellen wird. Interessante Veränderungen in der Sichtweise und neue Modellversuche dürften durch die neuesten genetischen Erkenntnisse eintreten.

Bis dahin muss ein wesentliches Anliegen die Karzinomprophylaxe durch konsequente Aufklärung der Bevölkerung über Risikoverhalten und die damit verbundene Schädigung des Organismus liegen. Im Falle des Auftretens eines Kopf- und Halsmalignoms dürfte die chirurgische Sanierung bis auf Längeres die einzige nachgewiesenermaßen erfolgreiche Methode zur Heilung darstellen.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Untersuchung wurde zwischen August 1999 und September 2002 an der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München durchgeführt. Diese Studie ist Teil eines Projektes, welches Zusammenhänge zwischen Malignomerkrankungen im Kopf- und Halsbereich und immunologischen Abwehrmechanismen bzw. der Suppression ebendieser untersucht und in der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke im Klinikum München Großhadern stattfindet. Insgesamt wurden für diese Studie 57 Patienten untersucht, die sich zur Behandlung einer diagnostizierten Krebserkrankung im Fachgebiet vorstellten, des Weiteren wurde eine Kontrollgruppe aus 41 freiwilligen und gesunden Probanden zusammengestellt.

Von peripherem Venenblut wurden die peripheren mononukleären Blutzellen gewonnen und mittels mononukleären farbmarkierten Antikörpern die Expression verschiedener für die Immunabwehr entscheidender Oberflächenrezeptoren untersucht. Überprüft wurde die These, dass sich die Expressionsgrade auf Zellen von Karzinompatienten und gesunden Probanden unterscheiden. Ebenso wurde untersucht, ob sich nach Inkubation in Serum gesunder Spender die Rezeptorexpression wieder erholte und ob sich nach Inkubation in Serum von Karzinompatienten auf Zellen gesunder Spender ebenso supprimierte Expressionsgrade nachweisen ließen. Weiterhin erfolgte eine Untersuchung auf Unterschiede in der Fähigkeit zur Adhäsion an rekombinant hergestelltes interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1). Einige Patienten wurden zu Kontrollen nach erfolgter Karzinomresektion und mindestens 6-monatiger Rezidivfreiheit wieder einbestellt.

Nachweisbar war zum einen eine erniedrigte Expression des für die Chemotaxis wichtigen Chemokinrezeptors CCR-5 auf Monozyten von SCCHN-Patienten, die Rezeptordichte war mit zunehmendem Tumorstadium umso geringer, zum zweiten zeigte sich eine Erholung der verminderten

Rezeptoren nach Inkubation in Serum gesunder Spender. Weiterhin wurde die Rezeptordichte auf Monozyten bei Gesunden nach Inkubation in Serum von Tumorpatienten herabreguliert. Auch ein zweiter Chemokinrezeptor CCR-2 war bei fortgeschrittener Tumorerkrankung in seiner Expression reduziert. Die Untersuchung des für die Endotheladhäsion im Rahmen der Immunantwort wichtigen Integrins CD11b zeigte eine verminderte Fähigkeit der Monozyten von Tumorpatienten zur Adhäsion sowohl auf molekularer als auch auf funktioneller Ebene. Die monozytäre Adhäsionsfähigkeit bei gesunden Spendern konnten nach Inkubation in Serum von Tumorpatienten ebenfalls herabreguliert werden. Eine Untersuchung nach erfolgter Tumoresektion konnte eine Erholung der präoperativ verminderten Immunkompetenz nachweisen.

Aus den Hinweisen dieser Untersuchung lässt sich schließen, dass im Serum von Karzinompatienten gewisse Metaboliten gelöst sind, welche eine effektive körpereigene immunologische Tumorbekämpfung behindern. Verschieden Substanzen konnten in den letzten Jahren identifiziert werden, darunter auch das Prostaglandin E₂. Gegenstand weiterer Untersuchungen sollte eine genauere Identifizierung dieser Immunsuppressiva und deren Entstehung sein, um durch gezielte Immunmodulation eine effektive medikamentöse Behandlung von Karzinomen ermöglichen zu können.

6 Literaturverzeichnis

Abbas 2003: ABBAS AK, LICHTMAN AH, POBER JS: Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunders Company 2003

Alleva 1995: ALLEVA DG, WALKER TM, ELGERT KD: Induction of macrophage suppressor activity by fibrosarcoma-derived transforming growth factor-beta 1: contrasting effects on resting and activated macrophages. J Leukoc Biol 57, 919-928, 1995

Ara 1996: ARA G, TEICHER BA: Cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors in cancer therapy. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 54(1), 3-16, 1996

Araki 2001: ARAKI T, MIKI C, KUSUNOKI M: Biological implications of circulating soluble intercellular adhesion molecule-1 in colorectal cancer patients. Scand J Gastroenterol 36(4) 399-404, 2001

Argiris 2002: ARGIRIS A: Update on chemoradiotherapy for head and neck cancer. Curr Opin Oncol 14(3), 323-329, 2002

Arnaout 1990: ARNAOUT MA: Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. Blood 75(5), 1037-1050, 1990

Balm 1984: BALM FJ, VON BLOMBERG VAN DEFLIER BM, DREXHAGE HA, DE HAAN MEULMAN M, SNOW GB: Mononuclear phagocyte function in head and neck cancer: depression of murine macrophage accumulation by low molecular weight factor derived from head and neck carcinomas. Laryngoscope 94, 223-227, 1984

Baggiolini 1997: BAGGIOLINI M, DEWALD B, MOSER B: Human chemokines: an update. Annu Rev Immunol 15, 675-705, 1997

Barnes 1989: BARNES L: Pathology of the head and neck: general considerations in MYERS EN, SUEN JY: Cancer of the head and neck, 75-99, 1989

Baskar 1993: BASKAR S, NABAVI N, GLIMCHER LD, ROSENBERG S: Tumor cells expressing major histocompatibility complex class II and B7 activation molecules stimulate potent tumor-specific immunity. J Immunother 14,209-215, 1993

Berlinger 1984: BERLINGER NT: Deficient immunity in head and neck cancer due to excessive monocyte production of prostaglandins. *Laryngoscope* 94, 1407-1410, 1984

Bluestone 1997: BLUESTONE JA: Is CTLA-4 a Master Switch for Peripheral T Cell Tolerance?, *J Immunol* 158(5):1989-1993, 1997.

Boyle 1992: BOYLE P, MACFARLANE GJ, ZHENG T, MAISONNEUVE P, EVSTIFEEVA T, SCULLY C: Recent advances in epidemiology of head and neck cancer. *Curr Op Oncol* 4, 471-477, 1992

Bronte 2003: BRONTE V, SERAFINI P, DE SANTO C : IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* 170, 270-278, 2003

Bross 1976: BROSS IDJ, COOMBS J: Early onset of oral cancer among women who drink and smoke. *Oncology* 33, 136ff, 1976

Burnet 1971: BURNET FM: Immunological surveillance in neoplasia. *Transplant Rev* 7, 1971

Burns 1994: BURNS AR, DOERSCHUK CM: Quantitation of L-selectin and CD18 expression on rabbit neutrophils during CD18-independent and CD18-dependent emigration in the lung. *J Immunol*, 153(7), 3177-3188, 1994

Carlos 1994: CARLOS TM, HARLAN JM: Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84, 2068-2101, 1994

Carrol 1998: CARROLL RG, RILEY JL, LEVINE BL: The role of co-stimulation in regulation of chemokine receptor expression and HIV-1 infection in primary T lymphocytes. *Semin Immunol* 10, 195-202, 1998

Chen 1993: CHEN L, LINSLEY PS, HELLSTRÖM KE: Costimulation of T cells for tumor immunity. *Immunol Today* 14, 483-486, 1993

Choe 1996: CHOE H, FARZAN M, SUN Y. SULLIVAN M, ROLLINS B, PONATH PD, WU L, MACHAY CR, LAROSA G, NEWMAN W, GERARD N, GERARD C, SODROSKI J: The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 84, 1135-1148, 1996

Choi 1998: CHOI SH, CHUNG EJ, WHANG DY: Alteration of signal-transducing molecules in tumor-infiltrating lymphocytes and peripheral blood T lymphocytes from human colorectal carcinoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 45(6) 299-305, 1998

Cohnheim 1889: COHNHEIM J: Lectures on general pathology: A handbook for practitioners and students. (1889), The New Sydenham Society, London.

Cross 1992: CROSS AS, PLATT JL, JUHN SK, BACH FH, ADAMS GL: Administration of a prostaglandin synthetase inhibitor associated with a increased immune cell infiltrate in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 118, 526-528, 1992

Cummings 1996: CUMMINGS CW: Is reengineering of head and neck cancer treatment indicated? – Absolutely! *Arch Otolaryngol* 122, 1155-1156, 1996

De Haas 1994: DE HAAS M, KERST JM, VAN DER SCHOOT CE, CALAFAT J, HACK CE, NUIJENS JH, ROOS D, VAN OERS RH, VON DEM BORNE AE: Granulocyte colony-stimulating factor administration to healthy volunteers: analysis of the immediate activating effects on circulating neutrophils. *Blood* 84, 3885-3894, 1994

Denfeld 1995: DENFELD RW, DIETRICH A, WUTTIG C, TANCZOS E, WEISS JM, VANSCHIEDT W, SCHOPF E, SIMON JC: In situ expression of B7 and CD28 receptor families in human malignant melanoma: relevance for T-cell-mediated anti-tumor immunity. *Int J Cancer* 62, 259-265, 1995

Dibbert 1997: DIBBERT B, SIMON HU: The molecular mechanism of apoptosis. Report of the 4th European Conference on Apoptosis. *Dtsch Med Wochenschr* 122, 523-526, 1997

Dimery 1993: DIMERY IW, HONG WK: Overview of combined modality therapies for head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 85, 95-111, 1993

Eberhart 1994: EBERHART CE, COFFEY RJ, RADHIKA A: Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 107(4), 1183-1188, 1994

Eccles 1974: ECCLES SA, ALEXANDER P: Macrophage content of tumours in relation to metastatic spread and host immune reaction. *Nature* 250, 667-669, 1974

Elsbach 1980: ELSBACH P: Degradation of microorganisms by phagocytic cells. Rev Inf Dis 2, 106-128, 1980

Fallarino 1998: FALLARINO F et al.: B7-1 Engagement of Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 Inhibits T Cell Activation in the Absence of CD28, J. Exp. Med. 1998

Foxman 1997: FOXMAN EF, CAMPBELL JJ, BUTCHER EC: Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. J Cell Biol 139, 1349-1360, 1997

Frydecka 2001: FRYDECKA I, BOCKO D, KOSMACZEWSKA A: The effect of peripheral blood lymphocyte stimulation on zeta chain expression and IL-2 production in Hodgkin's disease. Br J Cancer 84(10), 1339-1343, 2001

Funkhouser 1995: FUNKHOUSER EM, SHARP GB: Aspirin and reduced risk of esophageal carcinoma. Cancer 76, 1116-1119, 1995

Gahmberg 1997: GAHMBERG CG: Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. Curr Opin Cell Biol Oct 9, 643-650, 1997

Gardiello 1995: GARDIELLO FM, OFFERHAUS GJA, DUBOIS RN: The role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer prevention. Eur J Cancer 31A, 1071-1076, 1995

Garoud 1988: GAROUD O, FAUCHER A, LEGRAND E: Impairment of monocyte functions in advanced head and neck cancer. Immunol Lett 28,213-218, 1988

Gorsky 2002: GORSKY M, EPSTEIN JB: The effect of retinoids on premalignant oral lesions: focus on topical therapy. Cancer 95(6), 1258-1264, 2002

Grabbe 1995: GRABBE S, BEISSERT S, SCHWARZ T, GRANSTEIN RD: Dendritic cells as initiators of tumor immune responses: a possible strategy for tumor immunotherapy? Immunol Today 16, 117-121, 1995

Graham 1989: GRAHAM IL, GRESHAM HD, BROWN EJ: An immobile subset of plasma membrane CD11b/CD18 (Mac-1) is involved in phagocytosis of targets recognized by multiple receptors. J Immunol, 142(7), 2352-2358, 1989

Grau 1997: GRAU JJ, CUCHI A, TRASERRA J, FIRVIDA JL, ARIAS C, BLANCH JL, ESTAPE J: Follow-up study in head and neck cancer. Cure rate according to tumor location and stage. *Oncology* 54, 38-42, 1997

Greenberg 1991: GREENBERG PD: Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. *Adv Immunol* 49, 281-355, 1991

Guerder 1989: GUERDER S, MATZINGER P: Activation versus tolerance: a decision made by T helper cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54,799-805, 1989

Guinan 1994: GUINAN EC, GRIBBEN JG, BOUSSIOTIS VA, FREEMAN GJ, NADLER LM: Pivotal role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity. *Blood* 84, 3261-3282, 1994

Hadden 1994: HADDEN JW, ENDICOTT J, BACKEY P, SKIPPER P, HADDEN EM: Interleukins and contrasuppression induce immune regression of head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 120, 395-403, 1994

Hadden 1997: Hadden JW: The immunopharmacology of head and neck cancer: an update. *Int J Immunopharmacol* 19(11-12), 629-644, 1997

Herity 1982: HERITY B, MORIARTY M, DALY L: The role of tobacco and alcohol in the aetiology of lung and larynx cancer, *Br J Cancer* 46, 961ff, 1983

Von Hoff 1994: Head and Neck Cancer. In STEIN JH: *Internal Medicine*, Mosby Year Book, 943-947, 1994

Hoffmann 1998: HOFFMAN HT, KARNELL LH, FUNK GF, ROBINSON RA, MENCK HR: The National Cancer Data Base Report on Cancer of the Head and Neck, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 124, 951-962, 1998

Hombach 2001: HOMBACH A, WIECZARKOWIECZ A, MARQUARDT T: Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 zeta signalling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 zeta signalling receptor molecule. *J Immunol* 167(11), 6123-6131, 2001

Hong 1997: HONG WK, SPORN MB: Recent advances in chemoprevention of cancer. Science 278, 1073-1077, 1997

Isomaki 2001: ISOMAKI P, PANESAR M, ANNENKOV A: Prolonged exposure of T cells to TNF down-regulates TCR zeta and expression of the TCR/CD3 complex at the cell surface. J Immunol 166(9), 5495-5507, 2001

Janeway 2001: JANEWAY C, TRAVERS P, WALPORT M, SHLOMCHICK M: Immunobiology. The immune system in health and disease. Current Biology Ltd., Garland Publishing Inc, London 2001

Jiang 1992: JIANG Y, BELLER DI, FREN DL G, GRAVES DT: Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. J Immunol 148, 2423, 1992

Julius 1993: JULIUS M, MAROON CR, HAUGN L: Distinct roles for CD4 and CD8 as co-receptors in antigen receptor signalling. Immunol Today 14, 177-183, 1993

Kaplan 1992: KAPLAN G, WALSH G, GUIDO LS, MEYN P, BURKHARDT RA, ABALOS RM, BARKER J, FRINDT PA, FAJARDO TT, CELONA R, ET AL.: Novel responses of human skin to intradermal recombinant granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor: Langerhans cell recruitment, keratinocyte growth, and enhanced wound healing. J Exp Med 175,1717-1728,1992

Kastenbauer 1999: KASTENBAUER E, WOLLENBERG B: Auf der Suche nach neuen Behandlungsstrategien beim Kopf-Hals-Karzinom. Laryngo-Rhino-Otol 78, 31-35, 1999

Kersey 1973: KERSEY JH, SPECTOR BD, GOOD RA: Primary immunodeficiency diseases and cancer: The immunodeficiency cancer registry. Int J Cancer 12, 333ff, 1973

Kirman 1999: KIRMAN J, MCCOY K, HOOK S: CTLA-4 blockade enhances the immune response induced by mycobacterial infection but does not lead to increased protection. Infect Immun 67(8) 3786-3792, 1999

Khatab 1999: KHATTAB, J., URBA, S. Chemotherapy in head and neck cancer. Hematology/Oncology Clinics of North America 13, 753-766, 1999

Klapan 1991: KLAPAN I, KATIC V, ČULO F, ČUK V: Prognostic significance of plasma prostaglandin E concentration in patients with head and neck cancer, *J Cancer Res Clin Oncol* 118, 308-313, 1991.

Lang 1999: LANG S; WHITESIDE TL; LEBEAU A; ZEIDLER R; MACK B; WOLLENBERG B: Impairment of T-Cell activation in head and neck cancer in situ and in vitro: : strategies for an immune restoration. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 125, 82-88

Lang 2000: LANG S: Experimentelle Untersuchungen zu Gentherapie und Gentransfer bei Kopf-Hals-Karzinomen im Rahmen eines multimodalen Therapiekonzeptes. *Laryngorhinotologie*, 81(7), 534-536, 2002

Lang 2000b: LANG S, ATARASHI Y, NISHIOKA Y, STANSON J, MEIDENBAUER N, WHITESIDE TL: B7.1 on human carcinomas: co-stimulation of T cells and enhanced tumor-induced T cell death. *Cellular Immunology* 201, 132-143, 2000

Lang 2002: LANG S, WOLLENBERG B, DELLIAN M, STEUER-VOGT MK, SCHWENZER K, SAUTIER W, CHUCHOLOWSKI M, ECKEL R, FAAS I, WILMES E, EHRENFELD M, ARNOLD W, KASTENBAUER E, HOELZEL D: Clinical and epidemiological data of patients with malignomas of the head and neck, *Laryngorhinotologie* 81(7),499-508, 2002

Lang 2003: LANG S, LAUFFER L, CLAUSEN C, LÖHR I, SCHMITT B, HÖLZEL D, WOLLENBERG B, GIRES O, KASTENBAUER E, ZEIDLER R: Impaired monocyte function in cancer patients: Restauration with a cyclooxygenase-2 inhibitor. *FASEB J* 17(2), 286-288, 2003

Lapointe 1992: LAPOINTE H, LAMPE H, BANERJEE D: Head and neck squamous cell carcinoma cell line-induced suppression of in vitro lymphocyte proliferative responses. *Otolaryngol Head Neck Surg* 106(2), 149-158, 1992

Larson 1983: LARSON DL, LINDBERG RD, LANE E, GOEPFERT H: Major complications of radiotherapy in cancer of the oral cavity and oropharynx. A ten year retrospective study. *Am J Surg* 146,531-536, 1983

Law 1973: LAW DK, DUDRICK SJ, ABDU NI: Immunocompetence of patents with protein-calorie malnutrition. *Ann Intern Med* 79, 545-552, 1973

Leitlinien: Aus den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie, AWMF-Leitlinien-Register Nr 017/067.2, Juni 1999, <http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/hno-l672.htm>

Leng 2001: LENG Q, BORKOW G, WEISMAN Z: Immune activation correlates better than HIV plasma viral load with CD4 T-cell decline during HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 27, 389-397, 2001

Lin 1997: LIN RH, HWANG YW, YANG BC, LIN CS: TNF receptor-2-triggered apoptosis is associated with the down-regulation of Bcl-xL on activated T cells and can be prevented by CD18 co-stimulation. *J Immunol* 158, 598-603, 1997

Luce 1988: LUCE D, GUENEL P, LECLERC A, BRUGERE J, POINT D, RODRIGUEZ, J.: Alcohol and tobacco consumption in cancer of the mouth, pharynx and larynx: a study of 316 female patients. *Laryngoscope* 98,313-316,1988

Lundy 1974: LUNDY J, WANEBO H, PINSKY C, STRONG E, OETTGEN H: Delayed hypersensitivity reactions in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Am J Surg* 128, 530-533, 1974

Luster 1998: LUSTER AD: Chemokines - chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338, 436-445, 1998

Maeda 1993: MAEDA N, SAGARA Y: Analysis of immunosuppressive mechanisms to cytotoxic T lymphocyte generation in patients with advanced cancer. *Asia Oceania J Obstet Gynaecol* 19,309-318,1993

Maier 1988: MAIER H, BORN IA, MALL G: Effects of chronic ethanol nicotine consumption on the function and morphology of the salivary glands. *Klin Wochenschr* 66 (Suppl) 11,140-150, 1988

Makgoba 1988: MAKGOBA MW, SANDERS ME, GINTHER LG, DUSTIN ML, SPRINGER TA, CLARK EA, MANNONI P, SHAW S: ICAM-1 a ligand for LFA-1-dependent adhesion of B, T and myeloid cells. *Nature*, 331(6151), 86-88, 1988

Mann 1994: MANN EA, SPIRO JF, CHEN LL, KREUTZER DL: Phospholipid metabolite expression by head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 120, 763-769, 1994

McKay 1996: MCKAY CR: Chemokine receptors and T cell chemotaxis. *J Exp Med* 187, 799, 1996

Miceli 1993: MICELI MC, PARNES JR: Role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. *Adv Immunol* 53, 59-122, 1993

Mickel 1988: MICKEL RA, KESSLER DJ, TAYLOR JM, LICHTENSTEIN A: Natural killer cell cytotoxicity in the peripheral blood, cervical lymph nodes, and tumor of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 48, 5017-5022, 1988

Milanovich 1995: MILANOVICH MR, SNYDERMAN CH, WAGNER R, JOHNSON JT: Prognostic significance of prostaglandin E2 production by mononuclear cells and tumor cells in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Laryngoscope* 105, 61-65, 1995

Mizel 1989: MIZEL S: The interleukins. *FASEB J* 3, 2379-2388, 1989

Morecki 1998: Morecki S, Yacovlev L, Slavin S: Effect of indomethacin on tumorigenicity and immunity induction in a murine model of mammary carcinoma. *Int J Cancer* 75, 894-899, 1998

Morisaki 1991: MORISAKI T, TORISU M: Enhanced adherence activity of OK-432-induced peritoneal neutrophil to tumor cells correlates to their increased expression of CD11b/CD18. *Clin Immunol Immunopathol* 59, 474-486, 1991

Morgan 1976: MORGAN DA, RUSCETTI FW, GALLO R: Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193, 1007-1008, 1976

Mulder 1997: MULDER WM, BLOEMENA E, STUKART MJ: T cell receptor-zeta and granzyme B expression in mononuclear cell infiltrates in normal colon mucosa and colon carcinoma. *Gut* 40, 113-199, 1997

Murata 1999: MURATA H, KAWANO S, TSUJI S: Cyclooxygenase-2 overexpression enhances lymphatic invasion and metastasis in human gastric carcinoma. *Am J Gastroenterol* 94(2), 451-455, 1999

O'Hanlon 2002: O'HANLON DM, FITZSIMONS H, LYNCH J: Soluble adhesion molecules (E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1) in breast carcinoma. *Eur J Cancer* 38(17), 2252-2257, 2002

Ondrey 1996: ONDREY FG, JUHN SK, ADAMS GL: Inhibition of head and neck tumor cell growth with arachidonic acid metabolism inhibition. *Laryngoscope* , 106 129-134, 1996

Onishi 2002: ONISHI H, MORISAKI T, BABA E: Dysfunctional and short-lived subsets in monocyte-derived dendritic cells from patients with advanced cancer.

Clin Immunol 105(3), 286-295, 2002

Ortega 1987: ORTEGA IS, NIETA CS, FORCELEDO MFF, GOMIS JE: Lymph node response and its relationship to prognosis in carcinoma of the head and neck. *Clin Otolaryngol* 12, 241-247, 1987

Ozer 2003: OZER G, ALTINEL M, KOCAK B: Potential value of soluble intercellular adhesion molecule-1 in the serum of patients with bladder cancer.

Urol Int (Switzerland), 2003, 70(3) p167-71

Palmer 1978: PALMER DL: Alcohol consumption and cellular immunocompetence.

Laryngoscope 88 (8), 13-18, 1978

Panje 1981: Panje WR: Regression of head and neck carcinoma with a prostaglandin-synthesis inhibitor. *Arch Otolaryngol* 107(11), 658-663, 1981

Papadimitrakopoulou 2002: Papadimitrakopoulou VA: Chemoprevention of head and neck cancer: an update. *Curr Opin Oncol* 14(3), 318-322, 2002

Paul 1999: PAUL WE: *Fundamental Immunology*, Lippincott Williams & Wilkins, 1999

Picker 1992: PICKER LJ, BUTCHER EC: Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu Rev Immunol* 10, 561-91, 1992

Radoja 2000: RADOJA S, FREY AB: Cancer-induced defective cytotoxic T lymphocyte effector function: another mechanism how antigenic tumors escape immune-mediated killing. *Mol Med* 6, 465-479, 2000

Raport 1996: RAPORT CJ, GOSLING J, SCHWEICKHART VL, GRAY PW, CHARO IF: Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP1-beta, and MIP-1alpha. *J Biol Chem* 271, 17161-17166, 1996

Reibel 2003: REIBEL J: Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med* 14, 47-62, 2003

Roitt 1995: ROITT I, BROSTOFF J, MALE D: Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Thieme-Verlag Stuttgart, New York, 1995

Rollins 1997: ROLLINS BJ: Chemokines. *Blood* 90, 909-928, 1997

Sallusto 1998: SALLUSTO F, LANZAVECCHIA A, MACKAY CR: Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 19, 586-574, 1998

Schantz 1991: SCHANTZ SP, ORDONEZ NG: Quantitation of natural killer cell function and risk of metastatic poorly differentiated head and neck cancer. *Nat Immun Cell Growth Regul* 10 5, 278-28, 1991

Schuller 1980: SCHULLER DW, MCGUIRT WF, MCCABE BF: The prognostic significance of metastatic cervical lymph nodes. *Laryngoscope* 90, 557-570, 1980

Schwartz 1992: SCHWARTZ RH: Costimulation of T lymphocytes : the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 71, 1065-1068, 1992

Sikora 2001: SIKORA J, DWORACKI G, ZEROMSKI J: Expression of TCR zeta chain of tumor associated lymphocytes from malignant pleural effusions. *Adv Exp Med Biol* 495, 325-329, 2001

Silverstein 2000: SILVERSTEIN FE, FAICH G, GOLDSTEIN JL, SIMON LS: Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis. The CLASS Study: a randomized controlled trial. *JAMA* 284, 1247-1255, 2000

Simon 1997: SIMON HU: Programmed cell death. *Dtsch Med Wochenschr* 122, 167-168, 1997

Singer 1983: SINGER A, HODES R: Mechanism of T-cell-B-cell-interaction. *Ann Rev Immunol* 1, 211-241, 1983

Shiff 1999: SHIFF S, RIGAS B: The role of cyclooxygenase inhibition in the antineoplastic effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Exp Med* 190, 445-450, 1999

Shin 2001: SHIN DM, KHURI FR, MURPHY B: Combined interferon-alfa, 13-cis-retinoic acid, and alpha-tocopherol in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma: novel bioadjuvant phase II trial. *J Clin Oncol* 19, 3010-3017, 2001

Snyderman 1994: SNYDERMAN CH, KLAPAN I, MILANOVICH M: Comparison of in vivo and in vitro prostaglandin E2 production by squamous cell carcinoma of the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg* 111 (3 Pt 1), 189-196, 1994

Socinski 1988: SOCINSKI MA, CANNISTRA SA, SULLIVAN R, ELIAS A, ANTMAN K, SCHNIPPER L, GRIFFIN JD: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces the expression of the CD11b surface adhesion molecule on human granulocytes in vivo. *Blood* 72, 691-697, 1988

van Spriël 2001: van SPRIEL AB, LEUSEN JH, VAN EGMOND M: Mac-1 (CD11b/CD18) is essential for Fc receptor-mediated neutrophil cytotoxicity and immunologic synapse formation. *Blood* 97(8), 2478-2486, 2001

Springer 1994: SPRINGER TA: Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76(2), 301-14, 1994

Springer 1995: SPRINGER TA: Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 57, 827-872, 1995

Statistisches Bundesamt: Todesursachen, Säuglingssterblichkeit und Schwangerschaftsabbrüche, <http://www.statistik-bund.de>

Steinbach 2000: STEINBACH G, LYNCH PM, PHILLIPS RKS, WALLACE MH, HAWK E, GORDON GB, WAKABAYASHI N, SAUNDERS B, SHEN Y, FUJIMURA T, S ULK, LEVIN B: The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 342, 1946-1952, 2000

Steiner 1999: STEINER K, WAASE I, RAU T: Enhanced expression of CTLA-4 (CD152) on CD4+ T cells in HIV infection. *Clin Exp Immunol* 115, 451-457, 1999

Strieter 1995: STRIETER RM, POLVERINI PJ, KUNKEL SL: Role of C-X-C chemokines as regulators of angiogenesis in lung cancer. *J Leukoc Biol* 57, 752-762, 1995

Taketo 1998: TAKETO MM: Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (Part I and II). *J Natl Cancer Inst* 90, 1529-1536 and 1609-1620, 1998

Thivierge 1998: THIVIERGE M, LE GOUILL C, TREMBLAY MJ : Prostaglandin E2 induces resistance to human immunodeficiency virus-1 infection in monocyte-derived macrophages: downregulation of CCR5 expression by cyclic adenosine monophosphate. *Blood* 92(1), 40-45, 1998

Trujillo 1994: TRUJILLO MA, GAREWAL HS, SAMPLINER RE: Nonsteroidal anti-inflammatory agents in chemoprevention of colorectal cancer – at what cost? *Digestive Diseases and Sciences* 39, 2260-2266, 1994

Tsuji 1995: TSUJII M, DUBOIS RN: Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 83, 493-501, 1995

Tsuji 1998: TSUJII M, KAWANO S, TSUJI S, SAWAOKA H, JORI M, DUBOIS RN: Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 96, 705-715, 1998

Vaddi 1994: VADDI K, NEWTON RC: Regulation of monocyte integrin expression by β -family chemokines. *J Immunol* 153, 4721, 1994

Varner 1996: VARNER JA, CHERISH DA: Integrins and cancer. *Curr Op Cell Biol* 8, 724-730, 1996

Vlock 1991: VLOCK DR: Immunobiologic aspects of head and neck cancer. Clinical and laboratory correlates. *Hematol Oncol Clin North Am* 5, 797-820, 1991

Vujanovic 1993: VUJANOVIC NL, RANINOWICH H, LEE YJ, JOST L, HERBERMAN RB, WHITESIDE TL: Distinct phenotypic and functional characteristics of human natural killer cells obtained by interleukin-2-induced adherence to plastic. *Cell Immunol* 151, 133-157, 1993

Wamego 1975: WANEBO HJ, JUN MY, STRONG EW, OETTGEN H: T-cell deficiency in patients with squamous cell cancer of the head and neck. *Am J Surg* 130, 445-451, 1975

Waterhouse 1995: WATERHOUSE P, PENNINGER JM, TIMMS E: Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient CTLA-4, *Science* 270(5238), 985-988, 1995

Weiss 1994: WEISS A, LITTMAN DR: Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76(2):263-274, 1994

Whiteside 1996: WHITESIDE TL, CHIKAMATSU K, NAGASHIMA S, OKADA K: Antitumoral effects catalytic T lymphocytes and natural killer cells in head and neck cancer. *Anticancer Res* 16, 2357-2364, 1996

Whiteside 1998: Whiteside TL: Immune cells in the tumor microenvironment, mechanisms responsible for functional and signalling defects. *Adv Exp Med Biol* 451, 167-171, 1998

Wolf 1986: WOLF GT, HUDSON JL, PETERSON KA, MILLER HL, MCCLATCHEY KD: Lymphocyte subpopulations infiltrating squamous carcinomas of the head and neck: correlations with extent of tumor and prognosis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 95, 142-152, 1986

Wolff 1999: WOLFF H, SAUKKONEN K, ANTTILA S: Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res* 58(22), 4997-5001, 1999

Wustrow 1996: WUSTROW TPU, MAHNKE CG: Causes of immunosuppression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Research* 16, 2433-2468, 1996

Young 1996: YOUNG MR, WRIGHT MA, LOZONA Y, MATTHEWS JP, BENEFIELD J, PRECHEL M: Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: influence on the immune infiltrate of the cancer. *In J Cancer* 67, 333-338, 1996

Zeidler 2000: ZEIDLER R, CSANADY M, GIRES O, LANG S, SCHMITT B, WOLLENBERG B: Tumor cell-derived prostaglandin E2 inhibits monocyte function by interfering with CCR5 and Mac-1. *FASEB J*, 14, 661-668, 2000

Zimmermann 1997: ZIMMERMAN GA, MCINTYRE TM, PRESCOTT SM: Adhesion and signalling in vascular cell-cell-interactions. *J Clin Invest* 98, 1699-1701, 1997

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1-1: T-Klassifikation Pharynxkarzinom</i>	11
<i>Abbildung 1-2: T-Klassifikation glottischer Larynx-Karzinome</i>	11
<i>Abbildung 1-3: T-Klassifikation subglottischer Larynx-Karzinome</i>	12
<i>Abbildung 1-4: T-Klassifikation Lippen- und Mundhöhlen-Karzinome</i>	12
<i>Abbildung 1-5: T-Klassifikation Oropharynx-Karzinome</i>	12
<i>Abbildung 1-6: N-Klassifikation Kopf-Hals-Tumoren</i>	13
<i>Abbildung 1-7: UICC-Einteilung zur Festlegung des Tumorstadiums</i>	13
<i>Abbildung 1-8: Therapieschema Kopf- und Halskarzinom</i>	14
<i>Abbildung 1-9: Übersicht über die Immunglobulinklassen</i>	21
<i>Abbildung 1-10: Überblick über die Lymphozytopoese</i>	23
<i>Abbildung 1-11: Der leukozytäre Migrationsprozess</i>	30
<i>Abbildung 1-12: Übersicht über die Chemokinrezeptoren</i>	32
<i>Abbildung 2-1: Überblick der den Monozytenanalysen zugrunde liegenden Patientendaten</i>	39
<i>Abbildung 2-2: Zusammensetzung der Kontrollgruppe</i>	39
<i>Abbildung 2-3: Inkubationsschema Monozyten</i>	41
<i>Abbildung 3-1: Die Expression von CCR5 liegt bei der gesunden Kontrollgruppe höher</i>	48
<i>Abbildung 3-2: Signifikant höhere Rezeptorexpression für CCR5 auf Monozyten der gesunden Kontrollgruppe</i>	48
<i>Abbildung 3-3: Beispielhafte Darstellung der Upregulation CCR5 auf Tumormonozyten</i>	49
<i>Abbildung 3-4: Nach Inkubation von Monozyten von Tumorpatienten mit Serum gesunder Normalspender war die CCR5-Expression signifikant erhöht</i>	50
<i>Abbildung 3-5: Hochregulation CCR5 bei Monozyten von Karzinompatienten mit histologisch kleinen Tumoren</i>	51
<i>Abbildung 3-6: Stark ausgeprägter Effekt der Heraufregulation von CCR5 bei Monozyten von mit großen Karzinomen belasteter Patienten</i>	52
<i>Abbildung 3-7: Vergleich des Grades der Heraufregulation von CCR5 bei Tumorpatienten abhängig von der Tumorgroße</i>	52
<i>Abbildung 3-8: Nur geringgradige Upregulation von CCR5, wenn noch keine Lymphknotenmetastasen nachzuweisen waren</i>	53
<i>Abbildung 3-9: Upregulation des CCR5 bei lymphonodulär-positiven Karzinompatienten</i>	54

<i>Abbildung 3-10: Signifikant stärkere Heraufregulation ($p=0,0091$) von CCR5 auf Monozyten von Karzinompatienten, sofern bereits Lymphknotenbefall nachgewiesen werden konnte</i>	54
<i>Abbildung 3-11: Mäßige Heraufregulation von CCR5 bei Grading G1 oder G2</i>	55
<i>Abbildung 3-12: Stark ausgeprägte Heraufregulation von CCR5 bei entdifferenzierten Tumoren</i>	56
<i>Abbildung 3-13: Der Effekt der Upregulation von CCR5 nach Inkubation der Monozyten in Serum gesunder Spender war deutlich stärker bei schlecht differenzierten Tumoren</i>	56
<i>Abbildung 3-14: Beispielhafte Downregulation CCR5 auf Monozyten der Kontrolle</i>	57
<i>Abbildung 3-15: Verminderte Expression von CCR5 nach Inkubation gesunder Monozyten in Tumors Serum</i>	58
<i>Abbildung 3-16: Signifikant erniedrigte CCR5-Rezeptorexpression nach Inkubation in Serum von Karzinompatienten mit großen Tumoren</i>	59
<i>Abbildung 3-17: Signifikant größere Herabregulation des CCR5-Rezeptors nach Inkubation in Serum von Patienten mit großer Tumormasse</i>	59
<i>Abbildung 3-18: Nur minimale Herabregulation der CCR5-Dichte auf Monozyten gesunder Spender nach Inkubation mit Serum von Tumorpatienten, bei denen noch keine befallenen Lymphknoten nachgewiesen wurden</i>	60
<i>Abbildung 3-19: Signifikante Herabregulation der CCR5-Dichte nach Inkubation gesunder Monozyten in Serum von Tumorpatienten, bei denen ein LK-Befall nachgewiesen wurde</i>	61
<i>Abbildung 3-20: Signifikant stärkere Herabregulation der CCR5-Expression nach Inkubation mit Serum von Tumorpatienten mit positivem Lymphknotenbefall</i>	61
<i>Abbildung 3-21: Auf Monozyten eines gesunden Probanden ließen sich nach Inkubation keine Unterschiede der CCR5-Expression zwischen dem eigenen Serum und dem vier anderer gesunder Probanden nachweisen</i>	62
<i>Abbildung 3-22: CCR5-Expression auf Monozyten eines Tumorpatienten nach Inkubation in eigenem Serum und Serum 4 anderer Tumorpatienten.</i>	63
<i>Abbildung 3-23: Herunterregulation der CCR5-Expression auf Monozyten eines gesunden Probanden nach Inkubation in Serum eines Tumorpatienten. Kein Unterschied hingegen zwischen der Inkubation in autologem Serum und in allogenen Serum eines anderen gesunden Probanden.</i>	63
<i>Abbildung 3-24: Erhöhte CCR5-Expression auf Monozyten eines Tumorpatienten durch Serum eines gesunden Probanden, hingegen bleibt die Rezeptordichte gleich niedrig nach Inkubation in autologem Serum oder allogenen Serum eines anderen Tumorpatienten</i>	64

<i>Abbildung 3-25: Erhöhter Grad der CCR2-Rezeptorexpression auf Monozyten gesunder Probanden</i>	65
<i>Abbildung 3-26: Beispielhaft eine Upregulation CCR2 auf Tumormonozyten</i>	66
<i>Abbildung 3-27: Erhöhte Expression von CCR2 auf Monozyten von Tumorpatienten nach Inkubation mit Serum gesunder Probanden</i>	66
<i>Abbildung 3-28: Die Expression von CCR2 auf Monozyten von Tumorpatienten lag bei größeren Tumoren deutlich tiefer als bei kleinen Tumoren</i>	67
<i>Abbildung 3-29: Deutlich stärkerer Effekt der Upregulation von CCR2 nach Inkubation in Serum gesunder Spender, sofern ein größeres Karzinom vorlag</i>	68
<i>Abbildung 3-30: Upregulation von CCR2 nur bei positivem Lymphknotenbefall</i>	68
<i>Abbildung 3-31: Signifikante geringere Expression von CCR2 bei fortgeschrittenem Tumorstadium</i>	69
<i>Abbildung 3-32: Signifikante Heraufregulation von CCR2 nach Inkubation mit Serum gesunder Spender bei fortgeschrittenem Tumorstadium</i>	70
<i>Abbildung 3-33: Die Heraufregulation der CCR2-Dichte auf Monozyten von Tumorpatienten konnte durch Inkubation in Serum gesunder Probanden signifikant stärker heraufreguliert werden, wenn ein fortgeschrittenes Tumorstadium vorlag</i>	70
<i>Abbildung 3-34: Verminderte CCR2-Expression bei entdifferenzierten Tumoren</i>	71
<i>Abbildung 3-35: Auf Monozyten von Tumorpatienten konnte durch Inkubation mit Serum gesunder Spender die CCR2-Expression stärker heraufreguliert werden, wenn es sich um schlecht differenzierte Tumoren handelte</i>	71
<i>Abbildung 3-36: Downregulation von CCR2 bei der gesunden Kontrollgruppe</i>	72
<i>Abbildung 3-37: Deutliche Herabregulation der „gesunden“ Monozyten nach Inkubation in Serum von Karzinompatienten</i>	72
<i>Abbildung 3-38: Die CCR2-Expression auf Monozyten gesunder Spender wurde signifikant stärker herunterreguliert nach Inkubation mit Serum von Patienten mit großen Tumoren</i>	73
<i>Abbildung 3-39: Signifikante Herabregulation von CCR2 auf Monozyten gesunder Spender nach Inkubation in Serum von Tumorpatienten, die mit LK-Metastasen belastet waren</i>	74
<i>Abbildung 3-40: Die Expression von CD11b nach Inkubation in eigenem Serum lag bei den Tumorpatienten signifikant niedriger</i>	75
<i>Abbildung 3-41: Auch in der MFIR zeigte sich die verminderte Expression von CD11b auf Monozyten im Vergleich zu den gesunden Probanden</i>	76
<i>Abbildung 3-42: Beispielhafte Upregulation von CD11b auf Tumormonozyten</i>	76

<i>Abbildung 3-43: Nach Inkubation in Serum gesunder Probanden zeigte sich eine Erhöhung der CD11b-Expression auf Monozyten von Tumorpatienten</i>	77
<i>Abbildung 3-44: Keine wesentliche Herabregulation von CD11b auf Monozyten gesunder Spender nach Inkubation in Serum von Tumorpatienten</i>	78
<i>Abbildung 3-45: Erhöhte Expression von CTLA-4 auf Lymphozyten der Kontrollgruppe</i>	80
<i>Abbildung 3-46: Geringfügig erhöhte CTLA-4-Expression nach Inkubation in Serum gesunder Probanden</i>	81
<i>Abbildung 3-47: Herunterregulation von CTLA-4 auf Lymphozyten der gesunden Kontrollgruppe nach Inkubation in Tumor-Serum</i>	81
<i>Abbildung 3-48: Verminderte Expression von TCR-zeta auf Lymphozyten der gesunden Kontrollgruppe</i>	82
<i>Abbildung 3-49: Herabregulation TCR-zeta nach Inkubation in Serum gesunder Spender</i>	83
<i>Abbildung 3-50: Auf Lymphozyten der gesunden Probanden erbrachte die Inkubation in mit Serum von Tumorpatienten ebenfalls eine Erniedrigung der Rezeptordichte</i>	83
<i>Abbildung 3-51: Kein signifikanter Unterschied an gelöstem ICAM-1 i.S. zwischen den Patienten und der Kontrollgruppe</i>	85
<i>Abbildung 3-52: Reduziertes Adhäsionsvermögen nach Inkubation in autologem Serum bei Monozyten von Tumorpatienten im Vergleich zu Monozyten von gesunden Probanden</i>	86
<i>Abbildung 3-53: Die Fähigkeit der Monozyten zur Adhäsion an ICAM ist größer bei der gesunden Kontrollgruppe als bei Tumorpatienten, jedoch keine statistische Signifikanz</i>	86
<i>Abbildung 3-54: Gesteigerte Adhäsionsfähigkeit an ICAM-1 von Monozyten von Tumorpatienten nach Inkubation in Serum gesunder Spender</i>	87
<i>Abbildung 3-55: Der Anteil der an ICAM-1 adhärenen Monozyten der Tumorpatienten liegt signifikant höher nach Inkubation mit Serum gesunder Spender</i>	87
<i>Abbildung 3-56: Nach Inkubation in Serum gesunder Spender konnte die Fähigkeit zur Adhäsion deutlich stärker heraufreguliert werden, wenn es sich um Zellen eines mit einem großen Tumor belasteten Patienten handelte</i>	88
<i>Abbildung 3-57: Nach Inkubation in Serum gesunder Spender konnte die Fähigkeit zur Adhäsion stärker wiederhergestellt werden, wenn bereits ein Lymphknotenbefall vorlag</i>	89
<i>Abbildung 3-58: Ebenso war dieser Effekt größer, wenn es sich um einen entdifferenzierten Tumor handelte, keine statistische Signifikanz</i>	89
<i>Abbildung 3-59: Herabregulation der Adhäsionsfähigkeit nach Inkubation gesunder Monozyten in Serum von Tumorpatienten</i>	90
<i>Abbildung 3-60: Postoperativ erhöhte Expression von CCR5 bei SCCHN-Patienten</i>	91

Abbildung 3-61: Auf Monozyten der Kontrolle lässt sich nach Inkubation in Serum von Tumorpatienten postoperativ keine Herabregulation von CCR5 mehr feststellen _____ 92

Abbildung 3-62: Auf Monozyten der Tumorpatienten lässt sich postoperativ nach Inkubation in Serum der Kontrolle keine Heraufregulation mehr feststellen _____ 92

Abbildung 3-63: Nach Tumorresektion kein eingeschränktes Adhäsionsvermögen und keine „Heraufregulation“ nach Inkubation in Serum gesunder Spender _____ 92

7.2 Abkürzungsverzeichnis

APC	= antigen presenting cells
CCR	= CC chemokine receptor
CD	= cluster of differentiation
cm	= Zentimeter
cpm	= counts per minute
CTL	= cytotoxic t-lymphocytes
DC	= dendritic cells
DNA	= desoxyribonucleic acid
ELISA	= enzyme-linked immunosorbent assay
ERND	= Erweiterte radikale Neck dissection
Fas	= Fas-Rezeptor
FasL	= Fas-Ligand
FCS	= Fetales Kälberserum
FITC	= Fluoreszein-Isothiozyanat
GCSF	= Human granulocyte colony stimulating factor
GMCSF	= Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HLA	= human leukocyte antigen
ICAM	= intercellular adhesion molecule
IFN	= Interferon
IL	= Interleukin
MCP	= monocyte chemoattractant protein
MHC	= major histocompatibility complex
min	= Minuten
MIP	= macrophage inflammatory protein
ml	= Milliliter
mm	= Millimeter
MNP	= mononuclear phagocytes
MRND	= Modifizierte radikale Neck dissection
NB	= nicht bestimmt

NSAIDs	= nonsteroidal anti-inflammatory drugs
PBL	= peripheral blood leukocytes
PBMC	= peripheral blood mononuclear cells
PBS	= phosphate buffered saline
PGE2	= Prostaglandin 2
RANTES	= regulated upon activation, normal T expressed and secreted
RND	= Radikale Neck dissection
rpm	= rounds per minute
RT	= Raumtemperatur
SD	= standard deviation
SND	= Suprahyoidale Neck dissection
SCCHN	= squamous cell carcinoma of the head and neck
SEM	= standard error of mean
TNF	= Tumornekrosefaktor

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Stephan Lang und Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Reinhard Zeidler für die thematische Beratung und für die intensive Betreuung der Arbeit. Insbesondere danke ich Ihnen auch für die Unterstützung, die Sie mir während unserer Zusammenarbeit gewährt haben und für die Ansprechbarkeit und Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit.

Ein spezieller Dank für die große Kollegialität und ständige Hilfsbereitschaft gilt dem gesamten Team des HNO-Forschungslabors, namentlich an Herrn Dr. rer. nat. Olivier Gires, Frau Dr. rer. nat. Tanja Hofmann, Herrn Cuong Kien, Herrn Dr. rer. nat. Andreas Moosmann und Herrn Dr. rer. nat. Markus Münz.

Ganz besonders hervorheben möchte ich die Tätigkeit von Frau Bärbel Schmitt, die mit großer Hingabe meine Einweisung in die Methodik übernahm und darüber hinaus wertvolle Vorarbeiten leistete, dafür danke ich Ihr sehr. Die Zusammenarbeit mit den genannten Personen hat mir große Freude bereitet.

Ich danke Herrn Professor Dr. med. emeritiert Ernst Kastenbauer als Direktor der HNO-Klinik dafür, das Forschungslabor mit seinen Einrichtungen für meine Untersuchungen zur Verfügung gestellt zu haben.

9 Tabellarischer Lebenslauf

Name: Christoph Clausen

Anschrift: Bereiteranger 8, 81541 München

Geboren: 19. März 1974 in München

1980 – 1984:	Grundschule Baldham
1984 – 1993:	Gymnasium Vaterstetten, Abitur
1993 – 1995:	Zivildienst im Chirurgischen OP des Klinikum rechts der Isar der TU München
1995 – 2002:	Studium der Humanmedizin an der LMU München
WS 1996 / 97:	Teilnahme am Erasmus-Austauschprogramm der Universidad d´Alacant (Universität Alicante - Spanien)
Juli 1997	Ärztliche Vorprüfung
August 1998	1. Staatsexamen Humanmedizin
1998 – 2000	Famulaturen in den Bereichen Anästhesie und Chirurgie im KKH Prien, in Dermatologie im Centro Dermatológico de la Pascua, Mexico DF, HNO an der LMU München.
April 2001	2. Staatsexamen Humanmedizin
2001 – 2002	Praktisches Jahr an der LMU München, Hospital de Clinicas Buenos Aires, KH München Harlaching
Mai 2002	3. Staatsexamen Humanmedizin
08/02 – 01/04	AiP in der Abteilung für Allgemein- und Visceralchirurgie KH München Neuperlach
1. Februar 2004	Approbation als Arzt

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich, Christoph Clausen, geb. 19.03.1974 in München, die vorgelegte Dissertation mit dem Titel

„Immunsuppression durch strukturelle und funktionelle immunologische Defizite bei Patienten mit Karzinomen aus dem Kopf- und Halsbereich“

selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und dass ich die Arbeit noch keinem anderen Fachbereich oder keiner anderen Fakultät zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt habe. Alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, wurden als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen. Weiterhin erkläre ich, dass gegen mich kein strafrechtliches Ermittlungsverfahren schwebt.

München, 7. Mai 2004