

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

**Analyse der Prostaglandin E2-induzierten
Immunsuppression von Monozyten
durch Tumorzellen**

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

vorgelegt von
Adriana Eftimescu
aus Timisoara

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Stephan Lang

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. D. Schendel

Priv. Doz. Dr. med. P. Kufer

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. rer. nat. Reinhard Zeidler

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

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2004

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1 Einleitung.....	4
1.1 Epidemiologie der Kopf-Hals-Karzinome.....	4
1.2 Karzinogenese.....	5
1.3 Die spezifische Immunantwort.....	5
1.4 Immunogenität von Tumoren	7
1.5 Immunevasion.....	7
1.6 Tumorantigene	9
1.7 Monozyten/Makrophagen	10
1.7.1 Chemokine und CCR5	10
1.7.2 Das Plasminogen Aktivator System und uPAR	11
1.8 Tumorassoziierte Makrophagen und tumorinfiltrierende Lymphozyten.....	12
1.9 PGE2, Cox und NSAIDs	13
1.10 Immunsuppression durch Tumore	16
1.11 Tumorzell-Sphäroide.....	17
1.12 Studienziel	18
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Zelllinien.....	20
2.2 Antikörper.....	21
2.3 Chemikalien, Geräte und Sonstiges.....	21
2.4 Zellkultur	23
2.4.1 Kultivierung permanenter Zelllinien	23
2.4.2 Zellzahlbestimmung	23
2.4.3 Aufbewahrung von Zelllinien	24
2.4.4 Reaktivierung eingefrorener Zellen	24
2.4.5 Generieren von Zellkultur-Überständen.....	24
2.5 Isolierung von Monozyten	24
2.5.1 Buffy Coats	24
2.5.2 Aufbereitung der PBMCs.....	25

2.5.3	Anreicherung von Monozyten.....	25
2.6	FACS-Analysen-extrazelluläres FACS.....	25
2.7	Westernblot (Immunblot).....	26
2.8	Enzymimmunoassay (ELISA)	26
2.9	Tumorzell-Sphäroide	26
2.9.1	Generierung von Tumorzellsphäroiden.....	26
2.9.2	Kokultivierung von Tumorzell-Sphäroiden und Immunzellen.....	27
2.9.3	Einbettung und Verarbeitung von Sphäroiden	27
2.9.4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	27
2.9.5	Immunhistochemische Färbungen.....	28
3	<i>Ergebnisse</i>	29
3.1	Etablierung eines zellulären Systems zur Untersuchung von Tumor-induzierten Veränderungen in Monozyten.....	29
3.2	Immunblot zum Nachweis der Cox1- und Cox2-Expression in transfizierten ANT1- Zellen.....	31
3.3	PGE2-ELISA zur Messung von PGE2 in Tumorüberständen.....	32
3.4	Regulation des CCR5-Rezeptors auf Monozyten durch konditionierte Karzinomzell- Überstände und Cox1-, Cox2-transfizierte Zelllinien	36
3.5	Regulation des Urokinase-Rezeptors uPAR auf Monozyten durch konditionierte Karzinomzell-Überstände und Cox1-, Cox2-transfizierte Zelllinien.....	39
3.6	Restauration der CCR5- und uPAR-Expression auf Monozyten durch NSAIDs.....	42
3.7	Untersuchungen am Sphäroid-Modell	46
3.7.1	Etablierung des Sphäroid-Modells	46
3.7.2	Histologische/immunhistochemische Charakterisierung der Sphäroide	47
3.7.3	Infiltrationsverhalten von Immunzellen in Sphäroide	48
3.7.4	Infiltrat nach Inkubation von Sphäroiden mit PBMCs und NSAIDs	49
4	<i>Diskussion</i>	54
4.1	Tumor-induzierte Veränderungen in Monozyten	54
4.1.1	Immune Escape durch die Produktion von PGE2	54
4.1.2	Konditionierte Karzinomzell-Überstände beeinflussen die Expression von CCR5 und uPAR auf Monozyten	55
4.2	Restauration der CCR5- und uPAR-Expression auf Monozyten durch NSAIDs.....	57

4.3	Charakterisierung des Infiltrationsverhaltens von Immunzellen am Tumorzell-Sphäroid-Modell in Anwesenheit von NSAIDs	58
5	<i>Zusammenfassung</i>.....	62
	Abkürzungsverzeichnis.....	64
	Literaturverzeichnis.....	66
	Danksagung.....	71

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der Kopf-Hals-Karzinome

In der Bundesrepublik Deutschland erkranken jährlich ca. 350 000 Menschen an Krebs (Lang, Wollenberg et al. 2002). Plattenepithelkarzinome stellen mit ca. 85% den überwiegenden Anteil der malignen Tumore des Kopf-Hals-Bereiches (SCCHN) dar, mit steigender Inzidenz und Mortalität. Wesentliche Risikofaktoren für die Entstehung sind der chronische Nikotin- und Alkoholabusus. Trotz Fortschritte in Diagnostik und Therapie hat sich die Prognose in den letzten Jahren nicht verbessert (Kastenbauer and Wollenberg 1999).

Die insgesamt ungünstige Prognose hängt im Einzelfall von folgenden Faktoren ab:

- Lokalisation des Primärtumors
- Tumorstadium und Ausmaß der lokoregionären und generalisierten Metastasierung (TNM Klassifikation)
- Histopathologischer Differenzierungsgrad (G – Grading; je undifferenzierter, desto schlechter)
- Residualtumor nach erfolgter Therapie (R-Faktor)

Im Vergleich zu anderen soliden Tumoren sind lokoregionäre Rezidive häufig: bei 50% der Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium kommt es nach erfolgter Therapie zu Rezidiven oder Fernmetastasen (Lang, Wollenberg et al. 2002).

Unter den Kopf-Hals-Karzinomen besitzen die Larynxkarzinome die beste Prognose; die 5-Jahres-Überlebensrate in diesem Fall wird mit 60% angegeben (Lang, Wollenberg et al. 2002) (Hussey, Latourette et al. 1991), wobei insbesondere bei glottischen Karzinomen günstige Prognosen verzeichnet werden. Ungünstiger stellt sich die Situation bei den supraglottischen Larynxkarzinomen und den Hypopharynxkarzinomen, bei denen sehr frühzeitig Halslymphknotenmetastasen auftreten; dies führt zu einer schlechten 5-Jahres-Überlebensrate, die unter 30% liegt (Lang, Wollenberg et al. 2002).

1.2 Karzinogenese

Die Genese bösartiger Tumoren ist ein komplexer Prozeß, wobei die klinische Phase, in der der Tumor wahrgenommen wird, die letzte in einer Reihenfolge von drei Phasen (die Initiierungsphase, die Latenzphase und die klinische Phase) ist, die sich über einen Zeitraum von bis zu 15 Jahren erstrecken kann (Hanahan und Weinberg, 2000). In dieser Zeit treten komplexe genetische Veränderungen in der Zelle auf, wie chromosomale Aberrationen und Mutationen, die letztendlich zur Entartung der Zelle und zu unkontrolliertem und aggressivem Wachstums- und Teilungsverhalten führen.

Die aktuelle Standardtherapie besteht prinzipiell in der radikalen chirurgischen Exstirpation des Primärtumors bis ins gesunde Gewebe und in der Dissektion der lokoregionären Lymphknoten in kurativer Absicht und bestmöglichem funktionellem Organerhalt, gefolgt von Radio- oder Radiochemotherapie (vgl. Leitlinie Onkologie des Kopf-Hals-Bereiches, 2000). Im Falle inoperabler Tumoren stehen Radio- bzw. Radio/Chemotherapie im Vordergrund. Ungefähr 50% der Patienten mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium entwickeln nach dem primären chirurgischen Eingriff und postoperativer Radio/Chemotherapie Rezidive, lokoregionäre Metastasen oder Fernmetastasen. Der Grund dafür liegt vermutlich darin, dass bereits zum Zeitpunkt der Operation eine Disseminierung von Tumorzellen stattgefunden hat, so dass es trotz der Radikalität des Eingriffs zum Verbleib residualer Tumorzellen kommt, die als „**minimal residual disease**“ (mrd) bezeichnet werden (Wollenberg, Ollesch et al. 1994) (Gath and Brakenhoff 1999). Diese Zellen sind durch bildgebende und histopathologische Routineverfahren nicht erkennbar; ihre Eliminierung jedoch könnte möglicherweise Rezidiven und Metastasen vorbeugen. Vor diesem Hintergrund werden derzeit immuntherapeutische Strategien entwickelt im Sinne einer spezifischen Aktivierung des Immunsystems gegen diese disseminierten Zellen, so dass diese auch in weiter Entfernung vom Primärtumor durch die Immunabwehr erkannt und beseitigt werden.

1.3 Die spezifische Immunantwort

Das menschliche Immunsystem ist ein komplexes Abwehrsystem, das im Laufe des Lebens lernt, fremde Strukturen wie Bakterien und Viren zu eliminieren, wogegen es

gegen körpereigene Proteine tolerant bleibt. Viele Erreger werden durch die angeborene, unspezifische Immunantwort (Monozyten/Makrophagen und neutrophile Granulozyten) vernichtet, andere jedoch haben Wege gefunden, sich davor zu schützen. Für deren Bekämpfung ist die Induktion einer spezifischen, adaptiven Immunreaktion nötig, deren wichtigste Effektorzellen die T-Lymphozyten sind. Sie erkennen die Erreger nicht selbst, sondern bedürfen der Präsentation eines Erregerspezifischen Antigens durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APCs) in Assoziation mit Molekülen der MHC (major histocompatibility complex)-Klasse I oder II. Ein solcher Peptid/MHC-Komplex kann nur dann von einer spezifischen T-Zelle erkannt werden, wenn folgende Voraussetzungen erfüllt sind:

- Die T-Zelle verfügt über den passenden T-Zellrezeptor, der das immunogene Peptid in Verbindung mit MHC-Molekülen erkennt (1.Signal).
- Die professionelle APC liefert ein zweites Signal in Form eines kostimulatorischen Moleküls.

Zur Aktivierung einer naiven T-Zelle, ihrer anschließenden Proliferation und Differenzierung kommt es nur dann, wenn beide Signale *auf derselben Zelle* präsent sind. Die wichtigsten bekannten APCs sind die dendritischen Zellen, aber auch B-Lymphozyten und Makrophagen wirken als APC. Der erste Kontakt einer spezifischen T-Zelle mit einer APC führt zur Induktion einer primären Immunantwort und zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, wodurch beim erneuten Kontakt mit demselben Antigen eine wesentlich schnellere Reaktion des Immunsystems ermöglicht wird.

Der MHC-Kontext, in dem die Antigene präsentiert werden, entscheidet darüber, welche T-Zellen aktiviert werden:

- Antigene, die über Klasse I präsentiert werden, führen zur Aktivierung von CD8-positiven Zellen, die zu zytotoxischen T-Lymphozyten differenzieren.
- Klasse II Antigene induzieren die Aktivierung von CD4-positiven T-Helferzellen, die sowohl für die Aktivierung von CD8-positiven Zellen, als auch für die Produktion von Antikörpern durch B-Lymphozyten wichtige Signale liefern.

Während nahezu alle Körperzellen MHC-Klasse I besitzen, exprimieren nur APCs auch MHC-Klasse II Moleküle.

B-Lymphozyten differenzieren nach ihrer Aktivierung zu Plasmazellen und produzieren spezifische Antikörper, die entweder Fremdkörper opsonieren, wonach sie von Phagozyten eliminiert werden, oder aber das Komplementsystem aktivieren und so zu einer Lyse des Zielpathogens führen.

1.4 Immunogenität von Tumoren

Dass es zwischen Tumoren und Immunsystem zu einer Interaktion kommt, hat Paul Ehrlich bereits zu Beginn dieses Jahrhunderts vermutet, und zwar werden „aberrante Zellen“, die stets im Organismus gebildet werden, durch das Immunsystem kontrolliert. Diese These wurde später von Burnett und Thomas zur Theorie der *Immunüberwachung* (immune surveillance) ausgearbeitet, die postuliert, dass das Immunsystem ständig den Körper nach entarteten Zellen absucht und sie zerstört, noch bevor diese klinisch apparent werden.

Trotzdem kommt es häufig zur Bildung von Tumoren und die Ursache, weshalb das Immunsystem in manchen Fällen maligne Zellen nicht quantitativ zu entfernen vermag, liegt in der **geringen Immunogenität von Tumorzellen**. Denn obwohl im zellulären Infiltrat von Tumoren Immunzellen vorhanden sind, die *in vitro* gegen Tumorzellen aktiviert werden können, versteht es der Tumor, ihre Aktivierung *in vivo* zu verhindern. Diese spezifische Inhibierung des Immunsystems durch Tumorzellen wird als ***Immune Escape*** oder ***Immunevasion*** bezeichnet.

1.5 Immunevasion

Tumore sind wenig immunogen, d.h. sie werden vom Immunsystem nicht als *fremd* erkannt und induzieren somit keine effiziente Immunantwort. Die bisher bekannten Mechanismen, die Tumorzellen benützen, um sich der Elimination durch das Immunsystem zu entziehen, sind vielfältig (Maudsley and Pound 1991; Palayoor, Bump et al. 1998; Ploegh and Watts 1998).

- Tumore sind oft genetisch instabil und können Zellvarianten bilden, die dem Immunsystem dadurch entgehen, dass immunogene Peptide durch Mutation verändert (sogenannte „escape-Mutanten“- (Maeurer, Gollin et al. 1996); (Gilboa 1999) oder nicht mehr exprimiert werden. Die Antigenausstattung von Primärtumoren und Metastasen kann unter Umständen unterschiedlich

sein (Natali, Giacomini et al. 1983), so dass Metastasen einer antigenspezifischen Immunabwehr ausweichen können.

- Tumorzellen exprimieren häufig sehr wenig bzw. keine Moleküle der MHC-Klasse I. So kommt es in geringerem Ausmaß zur Präsentation immunogener Peptide (Hicklin, Kageshita et al. 1996).
- T-Zellen benötigen zu ihrer effizienten Aktivierung neben MHC-präsentierten Peptiden ein kostimulatorisches Signal (die wichtigsten kostimulatorischen Moleküle sind Mitglieder der B7-Familie, CD80 und CD86, die mit dem Liganden CD28 auf T-Zellen interagieren). Tumore exprimieren jedoch üblicherweise keine solche Moleküle. Dann führt die Interaktion zwischen T-Zelle und Tumorzelle nicht zu einer Aktivierung, sondern zu einer funktionellen Anergisierung der Immunzelle (Janeway and Bottomly 1994),(Lang, Whiteside et al. 1999).
- Tumore produzieren immunsupprimierende Faktoren, wie die Zytokine TGF- β (Partridge, Green et al. 1989), (Anzano, Rieman et al. 1989) und IL-10 (Gruss, Brach et al. 1992) (Lin, Fernandes et al. 1992) oder PGE2 (Plescia, Grinwich et al. 1976), (Zeidler, Csanady et al. 2000).
- T-Zellen verändern unter dem Einfluß von Tumoren ihren Phänotyp und werden so funktionell gestört (z.B. Herabregulation der TCR-assoziierten ζ -Kette und dadurch eine verminderte Signaltransduktion – (Whiteside 1999); (Radoja and Frey 2000).
- Tumorzellen exprimieren Oberflächenmoleküle, wie den Fas-Liganden (CD95L), die Immunzellen in Apoptose treiben (Moers, Warskulat et al. 1999).
- Die Expression sogenannter decoy-Rezeptoren auf Tumorzellen verhindert die Bindung eines Liganden an seinen physiologischen Rezeptor und unterbricht so Signalwege. Damit entziehen sich maligne Zellen z.B. apoptotischen Signalen (Ashkenazi and Dixit 1999).

Tumorzellen, die eine maligne Entartung durchlaufen, sind ständig einem Selektionsdruck seitens des Immunsystems ausgeliefert. Jene, die es schaffen, durch rechtzeitige Modifizierungen des Phänotyps, dem Eingriff der Immunabwehr zu entkommen, reifen zu Tumoren heran. Die neuen immunologischen Therapieansätze

konzentrieren sich genau auf die Unterstützung des Immunsystems im Kampf gegen Tumoren. Gerade die antiimmunogene Selektionsstrategien der Tumorzellen kompliziert ihre Bekämpfung durch das Immunsystem. Dennoch gibt es Oberflächenmoleküle, die die maligne Zelle als solche für das Immunsystem erkennbar machen können, die sogenannten **Tumor-assoziierten Antigene (TAAs)**; diese bieten sich als Zielmoleküle für immunologische Strategien an.

1.6 Tumorantigene

Proteine, die mit einer gewissen Spezifität für Tumorentitäten charakteristisch sind, werden als *tumorspezifische* oder *tumorassoziierte Antigene* bezeichnet. Im Falle der HNO-Tumoren sind dies z.B. das Zelladhäsionsmolekül EpCAM (*epidermal cell adhesion molecule*), das SCC-Antigen (*squamous cell carcinoma*), oder das CE-Antigen (*carcioembryonic antigen*).

TAAs lassen sich in verschiedene Kategorien einteilen (Rosenberg, 1999):

- Fremdproteine, vor allem virale Proteine (z.B. E6 und E7 des humanen Papillomavirus – HPV, im Falle von Zervixkarzinomen, oder LMP1 vom Epstein-Barr-Virus – EBV, im Falle von Nasopharynx-Karzinomen), die bei Virus-assoziierten Tumoren an der Zelloberfläche erscheinen (Cheung, Leung et al. 1998), (Cornelison 2000).
- Mutierte zelleigene Proteine, z.B. das Zellzyklusprotein cdk 4, Caspase 8 (Mandrizzato, Brasseur et al. 1997), (Castelli, Rivoltini et al. 2000), das Onkogen ras (Linard, Bezieau et al. 2002), oder posttranslational verändert prozessierte Proteine, wie Mucin (MUC 1) bei Mamma-Karzinomen (Taylor-Papadimitriou, Burchell et al. 1999).
- Überexprimierte, bzw. de novo exprimierte Proteine, wie der EGF-Rezeptor (epidermal growth factor) (Stumm, Eberwein et al. 1996), das auf vielen Karzinomen vorhandene EpCAM (Litvinov, van Driel et al. 1996), oder eine Untereinheit der Telomerase (Vonderheide, Hahn et al. 1999).
- Proteine der Differenzierungsphase, die in hochdifferenzierten, reifen Gewebezellen nicht mehr exprimiert sind, z.B. CEA (carcioembryonic antigen), oder ektop exprimierte, gewebsspezifische Antigene, wie z.B. NY-ESO-1, das üblicherweise nur in Testes vorkommt, sich jedoch auch auf

Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes finden lässt (Chen, Scanlan et al. 1997).

Die Produktion mutierter Proteine, die Überexpression unveränderter Proteine, das ektopische Auftreten gewebsspezifischer Antigene oder Fremdproteine viraler Herkunft, all diese Aberrationen werden vom Immunsystem als *fremd* betrachtet und sollten die Induzierung einer Immunantwort bewirken. Der Grund, weshalb es trotz Expression immunogener Proteine nicht zu einer effizienten Immunreaktion gegen den Tumor mit anschließender Eliminierung kommt, liegt in den meisten Fällen an der Art und Weise, wie Tumorzellen diese Antigene dem Immunsystem präsentieren (Mechanismen der Immunevasion). Die Interaktion der malignen Zelle mit einer spezifischen T-Zelle führt, anstatt zu einer Aktivierung, in den meisten Fällen zur Induktion einer bestimmten Form von Toleranz, der Anergie. Hinzu kommt auch die Tatsache, dass Tumorpatienten einen geschwächten Allgemeinzustand und oft eine supprimierte Immunabwehr aufweisen.

1.7 Monozyten/Makrophagen

Monozyten sind wichtige zelluläre Bestandteile des Immunsystems, zirkulieren fortwährend im Blut und differenzieren zu Makrophagen, sobald sie in Gewebe einwandern. Makrophagen sind neben den neutrophilen Granulozyten die Phagozyten des Körpers und stellen somit wichtige Effektorzellen der angeborenen, unspezifischen Immunantwort dar. Makrophagen spielen wichtige Rollen auch in der adaptiven Immunantwort, und zwar einerseits durch Sekretion von Zytokinen, ausgelöst von der Wechselwirkung zwischen Phagozyten und Pathogenen, und andererseits durch das Fungieren als APCs. Durch ihre Funktion als APCs werden phagozytierte Antigene prozessiert und präsentiert, wodurch T-Zellen spezifisch aktiviert werden, die dann ihrerseits durch Zytokinproduktion zur Aktivierung von Makrophagen beitragen, so dass diese selbst eine antitumorale Aktivität ausüben können.

1.7.1 Chemokine und CCR5

Chemokine sind eine Familie der Zytokine, die als lösliche Faktoren als Reaktion auf die phagozytierten Pathogene von den Phagozyten freigesetzt werden. Chemokine wirken als chemische Lockstoffe und ziehen Immunzellen aus dem Blut zu den Infek-

tionsherden an (Chemotaxis). Eine Untergruppe der Chemokine sind die CC-Chemokine, die die Monozytenmigration unterstützen. Ein Beispiel hierfür ist der *human macrophage chemoattractant factor* (MCAF); dieser unterstützt die Adhäsion der Monozyten an Endothelzellen, das Durchwandern ins Gewebe und dirigiert Monozyten entlang eines steigenden Konzentrationsgradienten zum Infektionsherd. Hier werden sie aktiviert, zur respiratorischen Entladung (respiratory burst) angeregt, wodurch Sauerstoffradikale und Stickstoffoxide freigesetzt werden.

CC-Chemokine binden an Chemokin-Rezeptoren, die das Signal für Chemotaxis weiterleiten. Der Chemokin-Rezeptor CCR5 ist auf Monozyten und bestimmten Lymphozyten exprimiert und bindet Chemokine wie MIP1 α (*macrophage inflammatory protein alpha*), MIP1 β und RANTES (*regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted*). CCR5 wurde identifiziert auch als Fusionskofaktor für HIV mit Tropismus für Makrophagen. CCR5 spielt eine wichtige Rolle in der Aktivierung und Migration von Monozyten.

1.7.2 Das Plasminogen Aktivator System und uPAR

Das Plasminogen Aktivator System besteht aus zwei Proteasen, u-PA (*urokinase-type plasminogen activator*, Urokinase) und t-PA (*tissue-type plasminogen activator*). Beide Proteasen werden bei der Auflösung von extrazellulärer Matrix aktiv. Eine Migration von Monozyten durch die Blutgefäßwand und innerhalb eines Gewebes setzt die Auflösung der extrazellulären Matrix voraus. Monozyten besitzen den **Urokinase Plasminogen Aktivator Rezeptor (uPAR)**, der die Pro-Urokinase bindet, die zu aktiver Urokinase umgewandelt wird und somit die Umsetzung des inaktivem Zymogens Plasminogen in proteolytisch aktives Plasmin katalysiert oder weitere zymogene Proteasen, wie Prokollagenase, aktiviert. Plasmin bewirkt eine extrazelluläre Proteolyse von Fibrinogen, extrazellulärer Matrix (EZM) und Adhäsionsproteinen (Proteoglykane, Vitronektin, Fibronectin), wodurch Monozyten in der Lage sind, das Endothel zu durchbrechen und zu migrieren. Das Plasminogen Aktivator System hat eine große Bedeutung in physiologischen Prozessen, wie Entzündung, Wundheilung, Auflösen von Gewebe, usw. uPAR spielt somit eine Schlüsselrolle in diesem System. Protease-Systeme wie das Plasminogen Aktivator System können jedoch häufig auch in Prozessen wie Tumorwachstum und Metastasebildung involviert sein (DeClerck, Imren et al. 1997); (Andreasen, Egelund

et al. 2000), da die Zersetzung der EZM in der direkten Umgebung des Tumors eine effizientere Streuung der Tumorzellen zur Folge haben kann. Krebszellen exprimieren auch uPAR und es besteht ein Zusammenhang zwischen der uPAR-Expression und dem invasiven Potential dieser Zellen: je mehr uPAR vorhanden, desto aggressiver invadieren maligne Zellen (Andreasen, Kjoller et al. 1997); (Nozaki, Endo et al. 1998); (Ertongur et al., 2002).

Die Proteasen u-PA und t-PA werden von Plasminogen Aktivator Inhibitoren (PAI-1 und PAI-2) und Nexin-1 inhibiert. PAI-2 ist hauptsächlich der Inhibitor der Urokinase und wird von Monozyten produziert. Man vermutet, dass PAI-2 eine wichtige Rolle in der Regulierung der lokalen Proteolyse bei der Migration von Monozyten in Richtung Infektionsherd und der Invasion von Tumorzellen spielt.

uPAR und das Plasminogen Aktivator System erleichtern den Monozyten das Durchwandern durch das Endothel und die Migration ins Gewebe. Dieser Prozeß wird durch die Adhäsion an das Endothel initiiert, die u.a. durch das Adhäsionsmolekül Mac-1 vermittelt wird. Sitrin et al. zeigten, dass es zwischen uPAR und Mac-1 Zusammenhänge gibt, wonach beide Proteine komplementär die Zellmotilität bewirken, indem die adhäsiven Funktionen von Mac-1 durch dessen Assoziation mit uPAR beeinflusst werden (Sitrin et al., 1996). Zusammenfassend sind Sitrin et al. zur Schlußfolgerung gekommen, dass uPAR und das Plasminogen Aktivator System Mac-1 bei der Monozytenadhäsion kontrolliert.

1.8 Tumorassoziierte Makrophagen und tumorinfiltrierende Lymphozyten

Im Tumordinfiltrat findet man Makrophagen (**TAM** – *tumorassoziierte Makrophagen*) und Lymphozyten (**TIL** – *tumorinfiltrierende Lymphozyten*), die unter dem Einfluß von Tumoren stehen. Einerseits sind TAMs durch Präsentation von Tumorantigenen und Zytotoxizität schädlich für den Tumor (Herbermann et al., 1979), (Bonta and Ben-Efraim 1993), andererseits sind sie häufig in die Tumorangio-genese involviert, die für das Wachstum des Tumors unentbehrlich ist. TAMs werden vom Tumor angeregt, Zytokine zu produzieren, die die Angiogenese direkt fördern (Lin, Nguyen et al. 2001), oder stimulieren Tumorzellen, angiogene Zytokine wie das VEGF (vascular endothelial growth factor) zu sezernieren (Liss et al., 2001).

Über die Rolle der TILs ist wenig bekannt, es wird jedoch angenommen, dass es zwischen Tumor und Wirt zu Interaktionen kommt, die die Proliferation des Tumors

beeinflussen. Die Intensität der Tumorerinfiltration korreliert mit der Prognose von Tumorpazienten: im Falle von Blasenkarzinomen (Lipponen, Eskelinen et al. 1992), Zervixkarzinomen (Nakano, Oka et al. 1992), Prostatakarzinomen (Vesalainen, Lipponen et al. 1994), Mammakarzinomen (Marrogi, Munshi et al. 1997) und Kolonkarzinomen (Naito, Saito et al. 1998) wurde eine reiche Tumorerinfiltration mit besseren Prognosen assoziiert.

All diese Voraussetzungen geben Anlass zu weiteren Studien, die die Interaktion von Immunzellen mit Tumorzellen beschreiben, so wie das auch in der vorliegenden Arbeit der Fall ist.

1.9 PGE₂, Cox und NSAIDs

Prostaglandin E₂ (PGE₂) ist ein Metabolit der Arachidonsäure und das wichtigste Eicosanoid. Das Schlüsselenzym für die Produktion von Prostaglandinen ist die Cyclooxygenase (Cox), die in drei Isoformen vorkommt, Cox1, Cox2, Cox3. Während Cox1 konstitutiv in vielen Geweben exprimiert wird und Prostaglandine synthetisiert, die wichtige physiologische Vorgänge regulieren (gastrointestinale Zytoschutz, vaskuläre Homeostase und Nierenfunktion), ist Cox2 induzierbar und bevorzugt in stimulierten inflammatorischen Zellen, wie Monozyten (Lee and Smithies 1995), aber auch in malignen Zellen (DuBois, Tsujii et al. 1994); (Tucker, Dannenberg et al. 1999) zu finden. Cox3 ist eine Acetaminophen-sensitive Variante und induzierbare, kürzlich entdeckte Isoform von Cox1, die im Gehirn und Herzmuskel hoch exprimiert (Chandrasekharan, Dai et al. 2002). Die Cyclooxygenase reguliert auch die Synthese anderer Metaboliten der Arachidonsäure, außer Prostaglandinen, z.B. Thromboxan A₂, das ebenfalls in der Karzinogenese involviert sein soll (Nie et al., 2000, Rodrigues et al., 2001).

Für die Synthese von PGE₂ aus Arachidonsäure ist die enzymatische Aktivität der Cyclooxygenasen Voraussetzung. Cyclooxygenasen sind Schlüsselenzyme bei der Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandinen, Prostacyclinen und Thromboxanen (Abb.1).

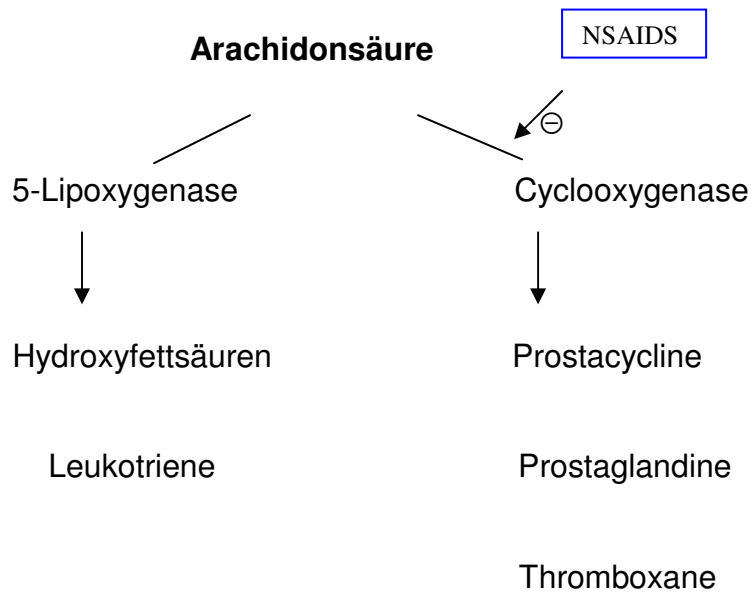


Abbildung 1: Die Metabolisierung der Arachidonsäure führt zur Produktion der Eicosanoide. Schlüsselenzyme sind die 5-Lipoxygenase und die Cyclooxygenase, die in drei Isoformen vorkommt, deren Formen von nichtsteroidalen Stoffen wie Indomethacin, Aspirin gehemmt werden.

Cox2 wird in vielen prämaligen Läsionen (z.B. kolorektale Polypen, Familiäre Adenomatöse Polyposis = FAP, Baretts Ösophagus, bronchiale Metaplasien und oralen Leukoplakien) und Krebsarten hochreguliert.

Ein anderer wichtiger Mechanismus von Cox2 in der Karzinogenese ist die Inhibierung der Apoptose, wodurch das Zellwachstum unterstützt wird. Cox2 fördert zudem die Tumorangiogenese, das zum Tumorwachstum beiträgt, dadurch, dass es die Produktion von VEGF induziert. Zusammenfassend werden die Konsequenzen der Cox2-Expression in verschiedenen Zellen in der folgenden Tabelle dargestellt:

Zellart	Wirkung	Referenz
Karzinomzellen	Produktion von VEGF	(Eibl, Bruemmer et al. 2003)
Epithelzellen	Apoptose-Resistenz Gesteigerte Adhäsion an ECM Verlängerte G1-Phasen des Zellzyklus Reduzierte Aktivität der RB-Kinase	(Tsuji and DuBois 1995; DuBois, Shao et al. 1996)

Dendritische Zellen	Produktion von IL-10	(Kalinski, Hilkens et al. 1997; Harizi, Juzan et al. 2002)
Darmkrebs	Erhöhung der Angiogenese Steigerung des metastatischen Potentials	(Tsuji, Kawano et al. 1997; Tsuji, Kawano et al. 1998)
Brustdrüsen	Tumorgenese	(Liu, Chang et al. 2001)

Tabelle 1: Konsequenzen der Cox2-Expression in verschiedenen Zellen

Nicht-steroidale antiinflammatorische Stoffe (NSAIDs) wie Aspirin und Indomethacin blockieren die Cox-Enzyme und hemmen dadurch die PGE₂-Synthese.

Cox2-spezifische Hemmer inhibieren das Zellwachstum von Haut-, Kolon-, Ösophagus- und Pankreastumoren (Gupta and Dubois 2001), (Ding, Tong et al. 2001), (Howe and Dannenberg 2002; Lin, Subbaramaiah et al. 2002), entsprechend einem antineoplastischen Effekt der Cox2-Hemmer.

Cox2-spezifische Hemmer induzieren Apoptose in verschiedenen Krebszellen, wie Kolon-, Magen-, Lungenkarzinomen (Cao and Prescott 2002), (Lin, Subbaramaiah et al. 2002). Ding et al. zeigten 2000, dass Celecoxib, ein spezifischer Cox2-Hemmer, das Volumen eines pankreatischen Tumors, der subkutan einer Maus implantiert wurde, signifikant reduzierte.

Die Induktion von VEGF wurde von einem Cox2-spezifischen Hemmer, NS-398, inhibiert (Masferrer, Koki et al. 1999), (Gately 2000), (Fosslie 2001).

Cox-Hemmer reduzieren die Migration und Adhäsion von malignen Zellen, sowie die Invasivität von Tumoren (Rozic, Chakraborty et al. 2001), (Cao and Prescott 2002), (Lin, Subbaramaiah et al. 2002).

Auch klinische Studien haben gezeigt, dass NSAIDs das Tumorstadium inhibieren und gleichzeitig die Prognose von Tumorkranken verbessern können (Baron and Sandler 2000). Auch wurde beobachtet, dass Cox-Inhibitoren das Ansprechen auf Chemo- und Bestrahlungstherapie verbessern (Altorki, Keresztes et al. 2003), (Davis, O'Neal et al. 2004). Neben den bekannten entzündungshemmenden Eigenschaften, die hauptsächlich auf die Blockierung der Prostaglandinsynthese zurückzuführen sind, wirken NSAIDs über weitere Cox-abhängige Mechanismen antineoplastisch, ja es wurden sogar Cox-unabhängige Mechanismen beschrieben

(Grosch, Tegeder et al. 2001), (He, Chan et al. 1999), (Skopinska-Rozewska, Piazza et al. 1998), (Zhang, Morham et al. 1999).

Aus diesem Grund wurden NSAIDs auch für die Onkologen interessant, wobei es von Vorteil wäre, Cox2-spezifische Hemmer (z.B. Celecoxib) im Sinne einer Chemoprävention einzusetzen (wie sie schon für die Vorbeugung von Kolonkarzinomen eingeführt wurde). Zum einen um unerwünschte Nebenwirkungen nicht-selektiver Cox-Hemmer (z.B. Indomethacin) zu vermeiden, zum anderen um die Aktivität der konstitutiven Cox1 möglichst nicht zu beeinflussen.

Eingesetzt zur *Chemoprävention* wurde für das Auftreten von Malignomen des Ösophagus, des Magens, des Kolons und der Mamma nach regelmäßiger Einnahme von NSAIDs ein um bis zu 90% reduziertes Risiko beschrieben (Funkhouser and Sharp 1995; Harris, Beebe-Donk et al. 2002).

Außer den klassischen Cox-Hemmern wurden Pflanzenextrakte, wie z.B. Curcumin auf Cox2-inhibitorischen Effekte untersucht und in einer klinischen Studie den Patienten mit fortgeschrittenem Kolonkarzinom oral, im Sinne einer Chemoprävention verabreicht (Plummer, Hill et al., 2001). Es wurde die PGE2-Konzentration im Blut der Patienten gemessen; Je höher die verabreichte Dose Curcumin war, umso niedriger war die PGE2-Konzentration. Es stellte sich heraus, dass Curcumin Cox2-hemmende Effekte besitzt und es zukünftig prophylaktisch bei Tumorpatienten eingesetzt werden könnte, als möglicher Ersatz für synthetische Cox-Inhibitoren.

Aufgrund dieser Daten wird diskutiert, inwiefern sich Cox-Inhibitoren zur Tumorprävention bei Risikopatienten, wie etwa Raucher mit Präkanzerosen des Mund-Rachenraums oder der Lunge oder auch bereits operierte Tumorpatienten eignen. Insbesondere die neu entwickelten Cox-2 Inhibitoren ('Super-Aspirine') mit deutlich reduzierten gastrointestinalen Nebenwirkungen geben diesen Diskussion neuen Aufschwung. Um eine solche prophylaktische Verwendung von Cox-Inhibitoren zu rechtfertigen, muss ihre Wirkung in Patienten besser untersucht werden.

1.10 Immunsuppression durch Tumore

PGE2 ist ein potenter Immunsuppressor; Krebszellen produzieren PGE2 und zusätzlich Faktoren, wie IL-10, die Monozyten und Makrophagen selbst zur PGE2-Synthese animieren. Von PGE2 ist bekannt, dass es die Produktion von

proinflammatorischen Lymphokinen wie TNF α inhibiert, die Produktion des immunsuppressiven Zytokins IL-10 induziert und die Proliferation von T- und B-Zellen sowie die Zytotoxizität von NK-Zellen hemmt (Ceuppens and Goodwin 1981), (O'Byrne and Dalglish 2001).

Die Interaktion von Immunzellen mit dem Tumor stellt, wie erwähnt, einen extrem wichtigen Aspekt dar, der zum Verständnis der Karzinogenese beiträgt. Zeidler et al. zeigten 2000, dass primäre Monozyten durch Tumorzellen supprimiert werden. Die Expression von CCR5, der Chemokinrezeptor für die Chemokine MIP-1 α , - β und RANTES, der für die Chemoattraktion von Monozyten wichtig ist, wird nach Inkubation der Monozyten in Tumorzell-Überstand vermindert.

Migrationsversuche mit MIP-1 β als Chemoattraktans zeigten, dass die verminderte Expression von CCR5 zu einer reduzierten Migration der Monozyten führte. Zeidler et al. konnten auch zeigen, dass die Expression eines Adhäsionsmoleküls auf Monozyten, Mac-1, durch Inkubation primärer Monozyten in Tumorzell-Überstand supprimiert wurde. *In vivo* bedeutet dies, dass Monozyten schlechter an Endothelzellen adhären, weniger ins Gewebe einwandern und schlechter migrieren. Für die supprimierte Expression von CCR5 und Mac-1 konnte PGE2 in Überständen von Tumorzelllinien verantwortlich gemacht werden (Zeidler, Csanady et al. 2000).

Dieselben Effekte konnte die Arbeitsgruppe auch *in vivo* nachweisen: Die verminderte Expression von CCR5 auf Monozyten bei Tumorpatienten und die Restauration der CCR5-Expression nach operativer Entfernung des Tumors, sowie durch medikamentöse Inhibierung der PGE2-Synthese mittels eines Cox2-spezifischen Hemmers (Rofecoxib – Vioxx®), wodurch die Migration der Monozyten im Sinne einer Immunrestauration auf Werte gesunder Normalspender gebracht werden konnte (Lang, Lauffer et al. 2003).

1.11 Tumorzell-Sphäroide

Üblicherweise werden *in vitro*-Untersuchungen mit Tumorzellen in zweidimensionalen Zellkulturmodellen durchgeführt. Diese Monolayer-Systeme haben den Nachteil, dass sie die Morphologie von disseminierten Tumorzellen nicht repräsentieren und damit für die Situation *in vivo* nur wenig verlässliche Daten liefern. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit das Modell der Tumorzell-

Sphäroide (**tumor-cell-spheroids**, **TCS**) (Sutherland 1988) in unserem Labor etabliert und eingesetzt. Sphäroide imitieren in ihrer dreidimensionalen Struktur die „Realität“ von disseminierten Tumorzellen besser als herkömmliche Zellkulturverfahren (Haas and Koldovsky 1996). Es stellte sich heraus, dass die Expression bestimmter Proteine in Tumorzell-Sphäroiden nach ähnlichen Modellen wie *in vivo* reguliert wird, zum Unterschied zu Monolayerkulturen (Waleh, Gallo et al. 1994). Auch reagieren Zellen eines Sphäroidverbandes anders auf antitumorale Verfahren als Zellen in Monolayerform (z.B. mit Resistenz gegenüber Bestrahlung, Olive und Durand, 1994). Tumorzell-Sphäroide werden zu verschiedenen Zwecken in der Tumorforschung eingesetzt:

- An TCS läßt sich die Penetrationsfähigkeit von therapeutischen Substanzen untersuchen (z.B. Antikörper, (Kwok, Cole et al. 1988).
- In Sphäroiden kann die Interaktion zwischen Tumor- und Immunzellen in einem gewebeähnlichen Umfeld studiert werden (Audran, Dazord et al. 1994).
- Sphäroide eignen sich zur Untersuchung von Effekten der Strahlentherapie (Santini, Rainaldi et al. 1999) oder Radioimmuntherapie (Essand, Gronvik et al. 1995).

1.12 Studienziel

Trotz Fortschritte in der Therapie maligner Erkrankungen hat sich die Prognose für Patienten mit Karzinomen der Kopf-Hals-Region nicht wesentlich verbessert. Limitierend für die Prognose ist das Vorhandensein disseminierter Tumorzellen (minimal residual disease, mrd), die chirurgisch nicht erreichbar sind und wahrscheinlich für Metastasen und Rezidiven verantwortlich sind. Die Proliferation dieser Zellen *in vivo* stützt sich unter anderem auch auf deren Kapazität, dem Immunsystem zu entkommen. Dieses Phänomen wird als *Immune Escape* bezeichnet.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit liegt daher in der molekularbiologischen Charakterisierung der Immunevasion, wobei einer der *Immune Escape* Mechanismen näher beschrieben werden soll. Im Einzelnen wurde untersucht:

- Die Synthese von Prostaglandin E2 durch Karzinomzellen und dessen immunsupprimierenden Effekte auf Monozyten.
- Die immunrestaurierende Wirkung von NSAIDs auf Immunzellen.
- Die Etablierung von Tumorzell-Sphäroiden als dreidimensionales Kulturmodell, das das *in vivo* Verhalten von Tumoren besser widerspiegelt.
- Das Infiltrationsverhalten von Immunzellen, die mit Tumorzell-Sphäroiden kokultiviert wurden.
- Der Einfluß von NSAIDs auf die Interaktion von Tumorzellen und Immunzellen.

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

Zelllinie	Herkunft	Referenz
A375	Melanom	ATCC
22A	Hypopharynx- Karzinom	ATCC
ANT1	Hypopharynx- Karzinom	1998 in unserem Labor etabliert
ANT1- Cox1	Hypopharynx- Karzinom	Cox1-transfiziert
ANT1- Cox2	Hypopharynx- Karzinom	Cox2-transfiziert
ANT1- pcDNA	Hypopharynx- Karzinom	Kontrolle zu ANT1-Cox1 und ANT1-Cox2 (enthält Leervektor pcDNA3.1)
FaDu	Hypopharynx- Karzinom	ATCC
GHD1	Hypopharynx- Karzinom	1998 in unserem Labor etabliert
Monomac- 6	Monozytenzelllinie (Monoblastische Leukämie)	Ziegler-Heitbrock et al., 1988
PCI1	Hypopharynx- Karzinom	Pittsburgh Cancer Institute
PCI13	Hypopharynx- Karzinom	Pittsburgh Cancer Institute

Tabelle 2: Verwendete Zelllinien

2.2 Antikörper

Folgende Antikörper wurden in den Versuchsreihen eingesetzt:

Antikörper	Herkunft	Bezugsquelle
α -Cox1(sc-7299)	Maus/IgG1	Santa Cruz, Kalifornien (USA)
α -Cox2(sc-1745)	Ziege/IgG	Santa Cruz, Kalifornien (USA)
HRP α	Kaninchen/IgG	Dako, Glostrup (DK)
FITC-Isotypkontrolle	Ziege/IgG	Dianova Hamburg
α -UPAR	Kaninchen/IgG	Santa Cruz, Kalifornien (USA)
α -CCR5	Maus/IgG	PharMingen International
α -CD3	Maus/IgG	Dako, Glostrup (DK)
α -CD68	Maus/IgG	Dako, Glostrup (DK)

Tabelle 3: Verwendete Antikörper

FITC: Fluorescein-Isothiocyanat; α -anti; HRP: Meerrettich-Peroxidase

2.3 Chemikalien, Geräte und Sonstiges

Artikel	Bezugsquelle
Acrylamid, Protogel ultra pure	Schröder Diagnostics, Stuttgart
Agarose	Boehringer/Roche, Mannheim
Anorganische Salze, Säuren, Basen	Merck, Darmstadt
Antibiotika (Penicillin, Streptomycin)	Roche, Mannheim
BCA Proteinassay	Pierce, Rockford (USA)
Blocklösung, Roti-Block	Roth, Karlsruhe
Curcumin	Sigma
ECL Westernblotting System	Amersham Biosciences, Freiburg

Einbettungsschälchen	Miles Inc. Diagnostics Division(IN)
Einmal-Artikel	Eppendorf (Hamburg)
Enzymimmunoassays (ELISAs)	R&D Systems, Wiesbaden (PGE2)
Ficoll/Hypaque	Biochrom KG (Berlin)
Fötales Kälberserum	Seromed/Biochrom, Berlin, Chargen
Glasflaschen Schott	Roth, Karlsruhe
Glycin	Serva, Heidelberg
Hygromycin B	Calbiochem, Frankfurt/Main
Milchpulver	Serva, Heidelberg
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Objektträger	Menzel-Gläser
PBS-Tabletten	Gibco BRL, Karlsruhe
Röntgenfilme	Amersham Biosciences, Freiburg
TissueTek O.C.T.4583 Compound	Fa.Sakura Finetek Inc. (Torrance/CA)
Tween	Serva, Heidelberg
Zählkammern	Madaus Diagnostic (Köln)
Zellkulturmedien und Zusätze	Seromed/Biochrom, Berlin

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Artikel	Bezugsquelle
Elektrophoresekammer	Amersham Biosciences, Freiburg
Durchflußzytometer „FACS Calibur“	Becton Dickinson, Heidelberg
ELISA-Reader	Bio-Tek Instruments, Winooski (USA)
Filmkassetten	Amersham Biosciences, Freiburg
Inkubator für Zellkultur, CO2- begast	Heraeus, München
Mikroskop	Zeiss, Oberkochen

Pipetten, Mikroliter-	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifugen	Beckmann Coulter, Unterschleißheim
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 5: Verwendete Geräte

Buffy Coats

Die verwendeten Buffy Coats wurden von der Landeslinik für Transfusionsmedizin und Gruppenserologie in Salzburg bezogen.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Kultivierung permanenter Zelllinien

Alle Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kultiviert, das mit 10% fötalem Kälberserum (FKS), Natriumpyruvat (1mM), Antibiotika (100µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin) und N-Acetylalanylglutamin (1mg/ml) supplementiert wurde. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre gehalten. Das Kulturmedium für stabil transfizierte ANT1 Zelllinien wurde zur Selektion mit steigender Konzentration Hygromycin B (Calbiochem), beginnend mit 100µg/ml und mit einer maximalen Konzentration von 300µg/ml supplementiert.

Zur Subklonierung adhärenter Zellen wurde das Serum mit PBS ausgewaschen, die Zellen mit 0.05% Trypsin/0.02% EDTA (Biochrom) aus dem Monolayerverband von der Kulturflasche gelöst, mit Medium (10% FKS) gewaschen und in der gewünschten Dichte neu ausplattiert. Suspensionszellen wurden abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und je 1:5 verdünnt erneut ausplattiert. Die Zentrifugationsschritte zum Waschen oder Aufkonzentrieren der Zellen erfolgten in 50ml Einmal-Zentrifugenröhrchen bei 350xg für 5-10min und 20°C.

2.4.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellen wurden in einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Um tote von lebenden Zellen zu unterscheiden, wurde jeweils ein Zellaliquot (20µl) mit einem Volumen

einer 0,2%igen Trypanblaulösung (in PBS) gemischt. Tote Zellen nahmen den Farbstoff auf und waren daher im Mikroskop an ihrer Blaufärbung zu erkennen.

2.4.3 Aufbewahrung von Zelllinien

Zur Aufbewahrung von Zellen wurden 1×10^7 Zellen abzentrifugiert in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, in Einfrierröhrchen (NUNC-CryotubeTM) gegeben und für 10 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen bei -80°C bis zum nächsten Gebrauch gelagert, für eine längere Lagerung wurden die mindestens über eine Nacht bei -80°C gelagerten Zellen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren (Einfriermedium: DMEM, 10% FKS, 10% DMSO).

2.4.4 Rekultivierung eingefrorener Zellen

Zur Wiederverwendung wurden die Zellen in warmem Kulturmedium mit 10% FKS (Raumtemperatur) resuspendiert und 1:20 verdünnt in Medium abzentrifugiert (5 min, $300 \times g$, 20°C). Die pelletierten Zellen wurden anschließend in frischem Medium resuspendiert und ausplattiert.

2.4.5 Generieren von Zellkultur-Überständen

Für die Gewinnung der zur Inkubation von Monozyten verwendeten Zellkulturüberstände wurden verschiedene Zelllinien (FaDu, PCI1, ANT1 Transfektante und parentale Zellen) in einer Dichte von je 10^5 Zellen/ml Medium ausplattiert. Nach zweitägiger Kultur wurden die Überstände abgenommen und nicht-adhärenente Zellen sowie Zelldebries durch scharfe Zentrifugation ($2200 \times g$) entfernt. Die Überstände gleicher Zelllinien wurden gesammelt und sofort zur Inkubation von Monozyten eingesetzt.

2.5 Isolierung von Monozyten

2.5.1 Buffy Coats

Buffy Coats fallen bei der Blutspende an und enthalten u.a. nach Separation des Blutplasmas und der Erythrozyten, die für die Fremdblut-Empfänger benötigt werden, die gesamten Leukozyten aus 500 ml Vollblut. Die Buffy Coats wurden über die

Landesclinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin in Salzburg bezogen und waren alle für Forschungszwecke freigegeben.

2.5.2 Aufbereitung der PBMCs

Der Inhalt eines Buffy Coats wurde mit einem Volumen PBS vermischt und je 25ml des Gemisches auf je 15ml Ficoll (Biochrom KG, Gradient 1.077) in Zentrifugenröhrchen aufgeschichtet. Bei anschließender Zentrifugation (950xg, 25 min, RT, ohne Bremse) wurden die Zellen in dem Gradienten aufgetrennt. Die vier hierbei entstehenden Schichten bestanden aus (1) Granulozyten und Erythrozyten (rot), (2) Ficoll (klar, durchsichtig), (3) PBMCs (weißer, trüber Ring) und (4) Serum (gelb). Der PBMC-Anteil wurde jeweils abgenommen, mit 2 Volumina PBS verdünnt abzentrifugiert (350xg, 10 min, RT) und zwei- bis dreimal mit PBS gewaschen.

2.5.3 Anreicherung von Monozyten

Die PBMCs wurden in DMEM ohne FKS aufgenommen, auf 4-6 Petri-Schalen (Φ 135mm) je Buffy Coat ausplattiert und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Dabei adhärten Monozyten an den Boden der Petri-Schalen. Nach 20-30min wurden nicht-adhärenente Zellen mit PBS von den Platten gespült und die adhärenenten Monozyten mit den entsprechenden Zellkulturüberständen für ein- bzw. zwei Tage inkubiert.

2.6 FACS-Analysen-extrazelluläres FACS

Proteinexpressionen in Einzelzellen können mit Hilfe spezifischer Antikörper und eines Durchflußzytometers (fluorescence-activated cell sorter, FACS) analysiert werden. Die spezifischen Antikörper müssen dabei entweder direkt mit Fluoreszenzfarbstoff markiert sein oder mit Hilfe markierter Sekundärantikörper abgegriffen werden. Verwendete Primär- und Sekundärantikörper waren mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC, grün) gekoppelt und wurden über ein FACSCalibur Durchflußzytometer (Becton Dickinson) analysiert.

Extrazelluläres FACS: 1×10^6 Zellen wurden pelletiert und in einer 1:50 Verdünnung des jeweiligen Antikörpers (200µg/ml) in FACS-Puffer für eine halbe Stunde bei 4°C inkubiert und dann dreimal mit FACS-Puffer gewaschen. Bei Verwendung eines Sekundärantikörpers (α -IgG-FITC) wurden die Zellen anschließend in einer 1:50

Verdünnung des Sekundär-Antikörpers für eine weitere halbe Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde die Oberflächenexpression im Durchflußzytometer bestimmt (FACS-Puffer: PBS + 2% FKS).

2.7 Westernblot (Immunblot)

Die Proteine wurden in 10-15%igen SDS-Polyacrylamidgelen in vertikaler Elektrophorese aufgetrennt (Laufbedingungen: 180V;30mA/Gel) und wurden anschließend auf eine Immobilon-P Transfermembran (Millipore) übertragen (Westernblot; 100V; 500mA, 40-45min). Durch 20-minütige Inkubation der Membranen in 5ml Blockpuffer (Milchpulver in Waschpuffer oder Block-Lösung) wurde die unspezifische Bindung von Antikörpern unterbunden. Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Primärantikörpern (1:100 bis 1:500 in Waschpuffer) und Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern (1:2000).

10x Laufpuffer: 250mM Tris, 2M Glycin, 1% SDS

10x Blotting-Puffer: 250mM Tris, 1,26M Glycin

Waschpuffer: Phosphatgepufferte Saline (PBS) + 0,2%Tween

Milchlösung: 3-5% Milchpulver (SERVA) in Waschpuffer

Blockpuffer: Roti-Block (ROTH) 1:10 in Aqua dest

2.8 Enzymimmunoassay (ELISA)

Zellkultur-Überstände für die Verwendung in ELISA-Messungen wurden abzentrifugiert (13000 rpm, 4°C, 10 min), der Überstand in neue Gefäße aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die ELISA-Kits wurden von den Firmen R&D (PGE2) bezogen und nach den Anleitungen der Hersteller durchgeführt. Die kolorimetrische Messung erfolgte in einem ELISA-Reader (EL_x800; Biotec Instruments, INC).

2.9 Tumorzell-Sphäroide

2.9.1 Generierung von Tumorzellsphäroiden

96-well-Platten wurden mit 100µl 1%iger Agarose (in PBS) bestückt. Zur Generierung der Sphäroide wurden 200µl einer Suspension von 10⁴ Zellen/ml FaDu,

bzw. PCI1 auf die ausgehärtete Agarose gegeben. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C bildeten sich Sphäroide mit einem Durchmesser von etwa 300µm aus, die lichtmikroskopisch evaluiert wurden.

2.9.2 Kokultivierung von Tumorzell-Sphäroiden und Immunzellen

Zur Durchführung von Kokultur-Experimenten wurden Immunzell-Suspensionen mit oder ohne Cox-Inhibitoren auf Sphäroide pipettiert. Sofern nichts anders angegeben, wurden die Immunzellen in einem Verhältnis von 20:1 zu den Tumorzell-Sphäroiden gegeben, die Cox-Inhibitoren in einer Endkonzentration von 13µM Indomethacin, beziehungsweise 5µM Celecoxib eingesetzt.

2.9.3 Einbettung und Verarbeitung von Sphäroiden

Für die histologische Aufarbeitung wurden die Sphäroide von der Agarose genommen und in ein Einbettungsschälchen überführt. Das Kulturmedium wurde komplett entfernt, die Sphäroide mit FCS freiem Medium gewaschen und mit 1µl Eosin angefärbt. Hierauf erfolgte die luftblasenfreie Überschichtung mit Einbettmedium und das Einfrieren in flüssigem Stickstoff. Die Blöcke wurden mit einem Kryostat zu 5µm dünnen Präparaten geschnitten, auf Super Frost Plus Objektträger (Fa. Menzel) aufgezogen, über Nacht luftgetrocknet und anschließend zehn Minuten bei Raumtemperatur in Aceton fixiert. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C.

2.9.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die luftgetrockneten und Aceton-fixierten Schnitte wurden fünf Minuten in 4% Paraformaldehyd vorbehandelt, zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen, dann zehn Minuten mit Hämalaun gefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift folgte die Zytoplasmafärbung mit Eosin (fünf Minuten). Schließlich wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe differenziert (70%ig bzw. 80%ig Ethanol), fixiert (fünf Minuten 96% Ethanol, fünf Minuten 100% Ethanol), zehn Minuten in Xylol ausgehärtet und mit Eukitt (Fa. Kindler, Freiburg) eingedeckt.

2.9.5 Immunhistochemische Färbungen

Zur immunhistochemischen Aufbereitung der Sphäroidschnitte wurde die Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex-Methode (ABC) verwendet.

ABC-Färbung: Bei dieser Methode wird ein biotinylierter, gegen die Spezies des Erstantikörpers gerichteter Zweitantikörper eingesetzt, der mit einem Komplex aus Avidin und biotinylierter Peroxidase (ABC = Avidin-Biotin-Komplex) eine feste Bindung eingeht. Durch die Reaktion der Peroxidase mit Aminoethylcarbazol (AEC) bzw. mit Diaminobenzidin (DAB) in der Färbelösung entsteht die spezifische Farbreaktion.

Nach Auftauen, Fixieren und Lufttrocknen (s.o.) wurden die Präparate fünf Minuten in PBS gestellt, dann zur Blockierung endogener Peroxidasen in derselben Küvette 30 Minuten unter Zusatz von 200µl Wasserstoffperoxid geschwenkt und hierauf wieder zehn Minuten in PBS belassen. Auch hier erfolgten die weiteren Schritte wieder in einer feuchten Kammer. Für die folgenden 25 Minuten wurden die Objektträger in PBS mit normalem Pferdeserum (1:20) inkubiert (Absättigung unspezifischer Bindungen) und anschließend eine Stunde mit Primärantikörper versehen. Nach dreimaligem Waschen durch Schwenken in PBS wurde der biotinylierte Zweitantikörper (1:200) unter Zugabe von 30% humanem AB-Serum 30 Minuten auf die Präparate gegeben, die dann (nach weiteren drei Waschsritten) für eine halbe Stunde mit dem Biotin-Avidin-Peroxidase-Komplex inkubiert, nochmals gewaschen und dann in die AEC- bzw. DAB-Lösung (entsprechend den Anleitungen des Herstellers) gegeben wurden. Zur Beendigung der Färbung wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Kernfärbung erfolgte mit Mayers Hämalaun.

3 Ergebnisse

Immune Escape von Tumorzellen zur Umgehung der Immunantwort ist ein weit verbreitetes Phänomen. Einer der Immune Escape Mechanismen ist die Produktion von immunsupprimierendem PGE₂ durch Tumorzellen, das inhibitorische Auswirkungen auf die Expression wichtiger Oberflächenmoleküle und somit auf die Funktion von Monozyten besitzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst ein zelluläres System zur molekularbiologischen Analyse Tumor-induzierter Effekte auf Monozyten etabliert; anschließend wurde untersucht, inwiefern eine Restauration von Phänotyp und Funktion mit Hilfe von NSAIDs erreicht werden konnte.

3.1 Etablierung eines zellulären Systems zur Untersuchung von Tumor-induzierten Veränderungen in Monozyten

Um die Einflüsse von Tumoren auf Monozyten untersuchen zu können, wurde ein zelluläres *in vitro* System etabliert. In Abb.2 ist der Ablauf der Probenaufbereitung schematisch dargestellt.

Für die Untersuchungen an Monozyten wurden sowohl die aus einer monoblastischen Leukämie entstandene Monozytenzelllinie Monomac-6 (MM6) (Ziegler-Heitbrock, 1994), als auch primäre Monozyten aus *buffy coats* verwendet. Als buffy coat wird die Schicht aus Leukozyten und Thrombozyten bezeichnet, die sich bei Zentrifugation einer Zitrat-behandelten frischen Vollblutkonserve zwischen Plasma und (sedimentierten) Erythrozyten bildet.

Um Monozyten aus buffy coats zu gewinnen, wurden zunächst mit Hilfe einer Dichtezentrifugation über einen Gradienten aus Ficoll die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs, vor allem Lymphozyten und Monozyten) von Granulozyten und Erythrozyten abgetrennt und dann per Plastikadhärenz eine Anreicherung erzielt.

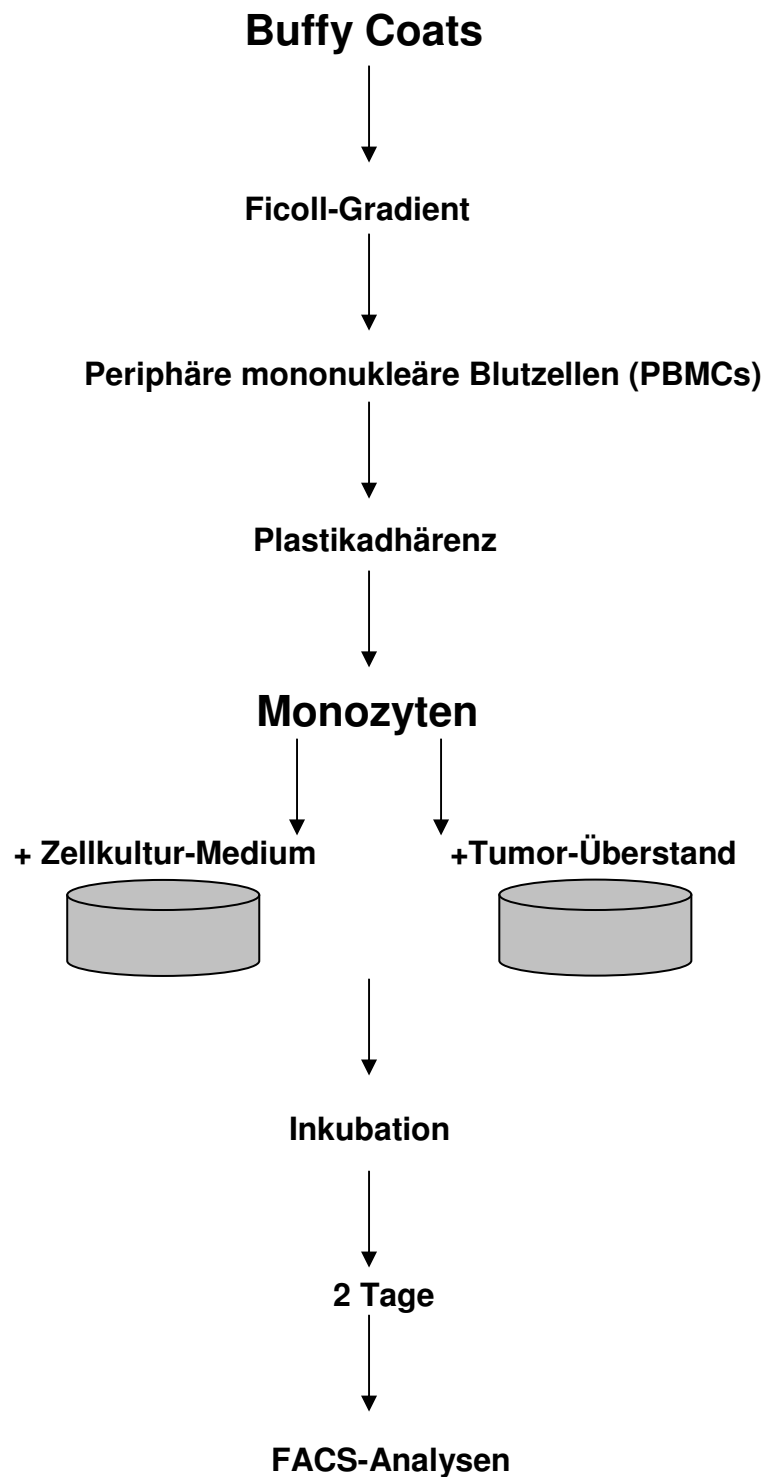


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Probenaufbereitung für FACS-Analysen

Abb.3 zeigt isolierte PBMCs, wie sie sich in der Durchflußzytometrie darstellen. Aufgrund morphologischer Unterschiede lassen sich verschiedene Zellpopulationen unterscheiden. Die Region R1 begrenzt beispielsweise die Monozyten, die größer

sind als andere Blutzellen und eine Granularität aufweisen, die zwischen der von Lymphozyten und der von Granulozyten liegt.

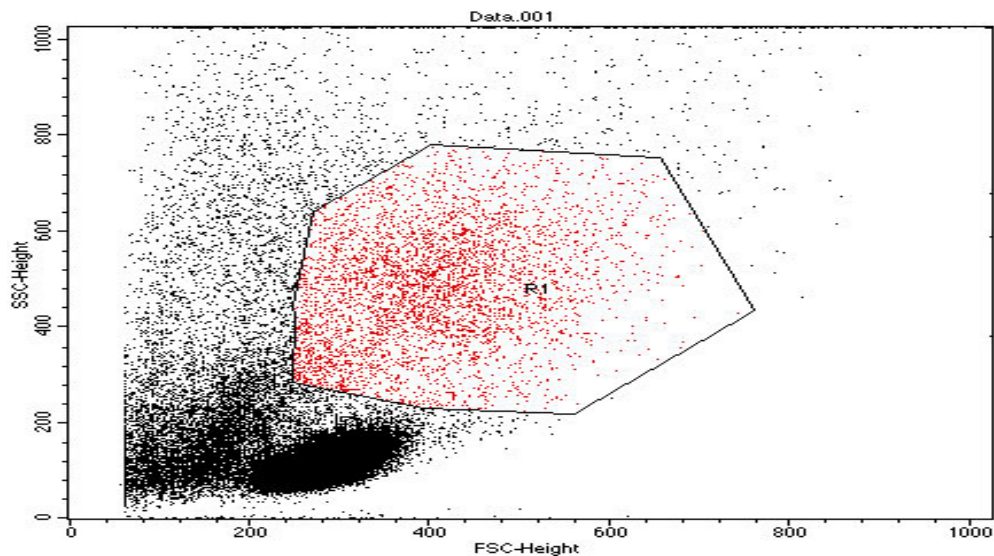


Abbildung 3: Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) nach Isolierung über Ficoll.

Die Zellen in Region R1 können morphologisch aufgrund ihrer Größe (X-Achse, FSC) und ihres Kern/Plasma-Verhältnisses (Granularität, Y-Achse, SSC) als Monozytenpopulation in der Durchflußzytometrie (FACS) abgegrenzt werden.

Zur Generierung von Tumorzell-Überständen wurden Zellen der Karzinomzelllinien FaDu und PCI1 jeweils in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/ml Zellkulturmedium ausgesät; die Tumor-Überstände wurden nach 2 Tagen geerntet.

Um Veränderungen an primären Monozyten feststellen zu können, die durch lösliche Faktoren von Tumorzellen induziert wurden, wurden in diesem System primäre Monozyten aus buffy coats für 48 Stunden in Standard-Zellkulturmedium oder konditioniertem Karzinomzell-Überstand inkubiert, anschließend wurde mit Hilfe von FACS-Messungen die Expression von Oberflächenmolekülen auf den unterschiedlich inkubierten Monozyten verglichen.

3.2 Immunblot zum Nachweis der Cox1- und Cox2-Expression in transfizierten ANT1-Zellen

Zur besseren Untersuchung der Cox-vermittelten Immunsuppression etablierten wir ein zusätzliches zelluläres System.

Wir identifizierten zunächst eine Karzinomzelllinie, die weder Cox1, noch Cox2 in nachweisbaren Mengen exprimiert (ANT1). Durch Transfektion mit einem Cox1-, bzw. Cox2-Expressionsplasmid wurden mit Hygromycin stabile Zellklone selektioniert. Ziel war es, stabil transfizierte Zellen zu erhalten, die Cox1 oder Cox2 *de novo* exprimieren. Zur Kontrolle wurde ANT1 mit dem pcDNA3.1(+)/Hyg-Leervektor transfiziert und ebenfalls mit Hygromycin selektioniert.

Nach Transfektion der ANT1-Zelllinie und Selektion wurden die transfizierten Zellen auf Cox-Expression mittels Immunblot getestet. Der Immunblot zeigte eine erfolgreiche Transfektion, mit dem Ergebnis Cox1-, bzw. Cox2-exprimierenden Zellklonen (Abb.4).

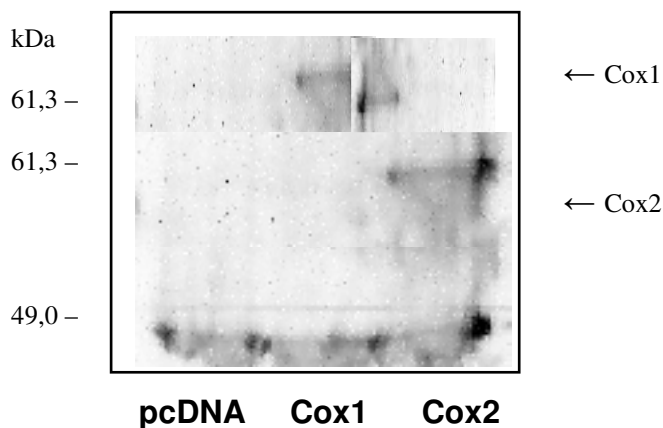


Abbildung 4: Immunblot zum Nachweis der Cox1- und Cox2-Expression in transfizierten ANT1-Zellen. Die Proteine wurden in 10%-igen SDS-Polyacrylamidgelen in vertikaler Elektrophorese aufgetrennt, anschließend auf eine Millipore-Membran übertragen und mit spezifischen Cox1- bzw. Cox2-Primärantikörpern und HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert. Die hier gezeigten ANT1-Zellklone wurden mit dem Leervektor (pcDNA), Cox1 und Cox2 stabil transfiziert.

3.3 PGE2-ELISA zur Messung von PGE2 in Tumorüberständen

Nachdem beschrieben wurde, dass Plattenepithelkarzinome des Kopf-Halsbereiches PGE2 produzieren (Culo et al., 1992; Snyderman et al., 1994) und dass das PGE2 von Tumorzellen immunsupprimierend auf primäre Monozyten wirkt, untersuchten wir daraufhin die PGE2-Produktion verschiedener Zelllinien per ELISA.

Zu diesen Linien gehörten neben verschiedenen HNO-Karzinomzelllinien (FaDu, 22A, PCI1, PCI13, ANT1, GHD1) auch die Melanom-Zelllinie A375 und die Monozytenzelllinie MM6.

<i>Zelllinie</i>	<i>PGE2 (pg/ml)</i>
FaDu	228,3
22A	>1000
PCI1	>1000
PCI13	>1000
ANT1	16,3
GHD1	24,6
A375	>1000
MM6	<7,8

Tabelle 6: PGE2-Produktion in verschiedenen Karzinomzelllinien, per ELISA

gemessen. Zur Bestimmung wurden je 1×10^5 Zellen/ml Zellkulturmedium ausplattiert und je 1ml zellfreier Überstand nach 48 Stunden gesammelt und vermessen.

Die PGE2-Produktion in den stabilen ANT1-Transfektanten (AntpcDNA=Kontrolle mit dem Leervektor, AntCox1=Cox1 transfiziert, AntCox2=Cox2 transfiziert) wurde ebenfalls über eine ELISA-Messung bestimmt; gleichzeitig wurde die PGE2-Produktion von FaDu und PCI1 mitbestimmt, um einen Vergleich zu den „klassischen“ Tumorzelllinien zu haben.

Es wurden je 1×10^5 Zellen/ml Zellkulturmedium ausgesät und nach 24 und 48 Stunden jeweils 1ml des Zellkultur-Überstandes für die ELISA-Messung abgenommen. Die Ergebnisse des ELISAs sind in Abb.5 dargestellt:

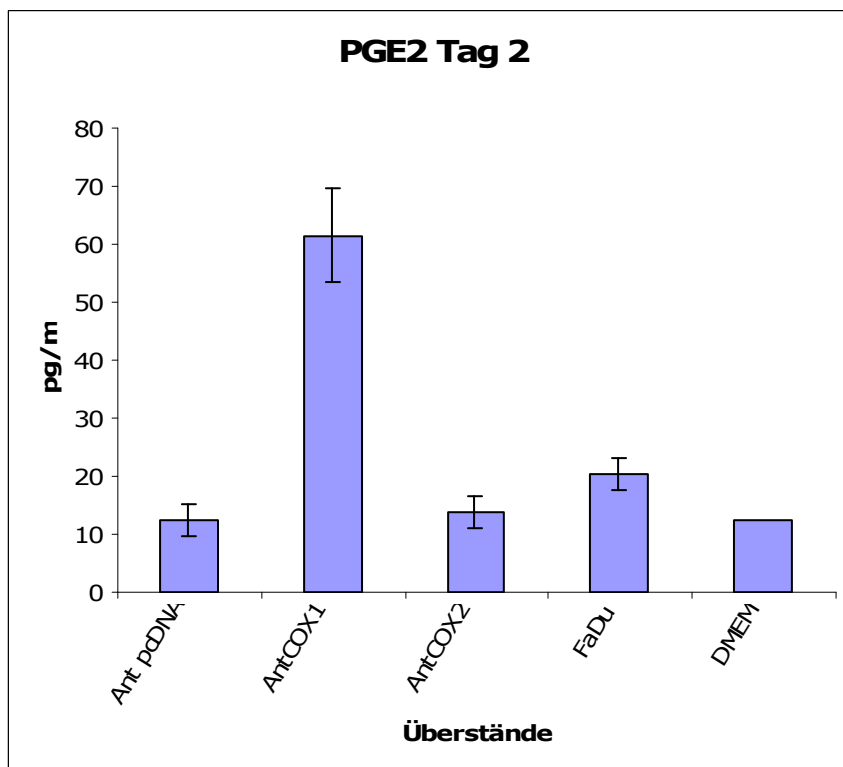
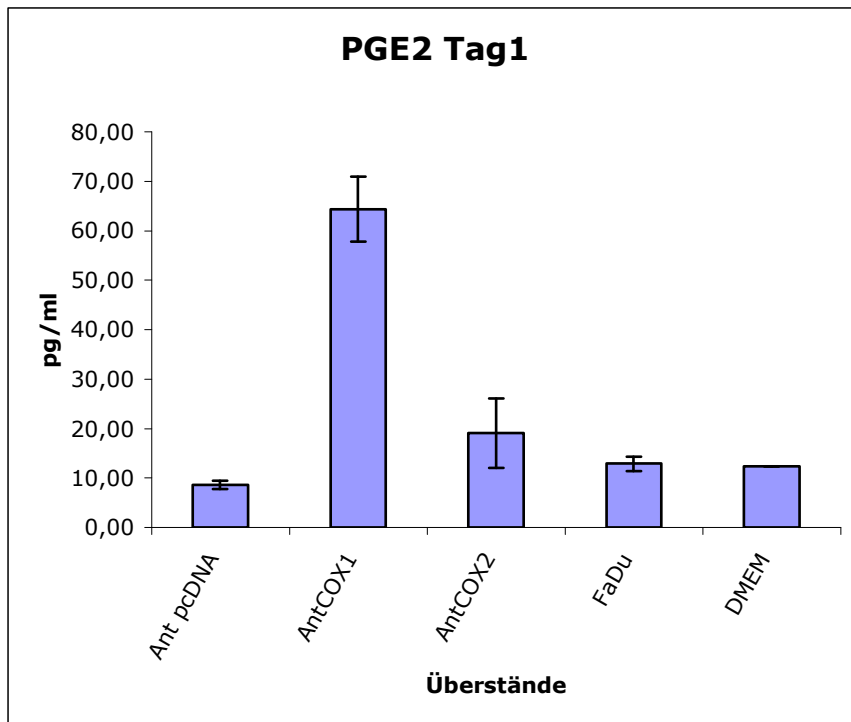


Abbildung 5: PGE2-Produktion transfizierter ANT1-Zelllinien nach 24 und 48 stündiger Inkubation; Bemerkenswert ist, dass die Cox1-transfizierten Zellen weit mehr PGE2 als die Cox2-transfizierten Zellen produzierten. FaDu-Zellen produzierten vergleichbare Mengen PGE2, PCI1 jedoch produzierte weit mehr PGE2 und wird deshalb im nächsten Diagramm dargestellt.

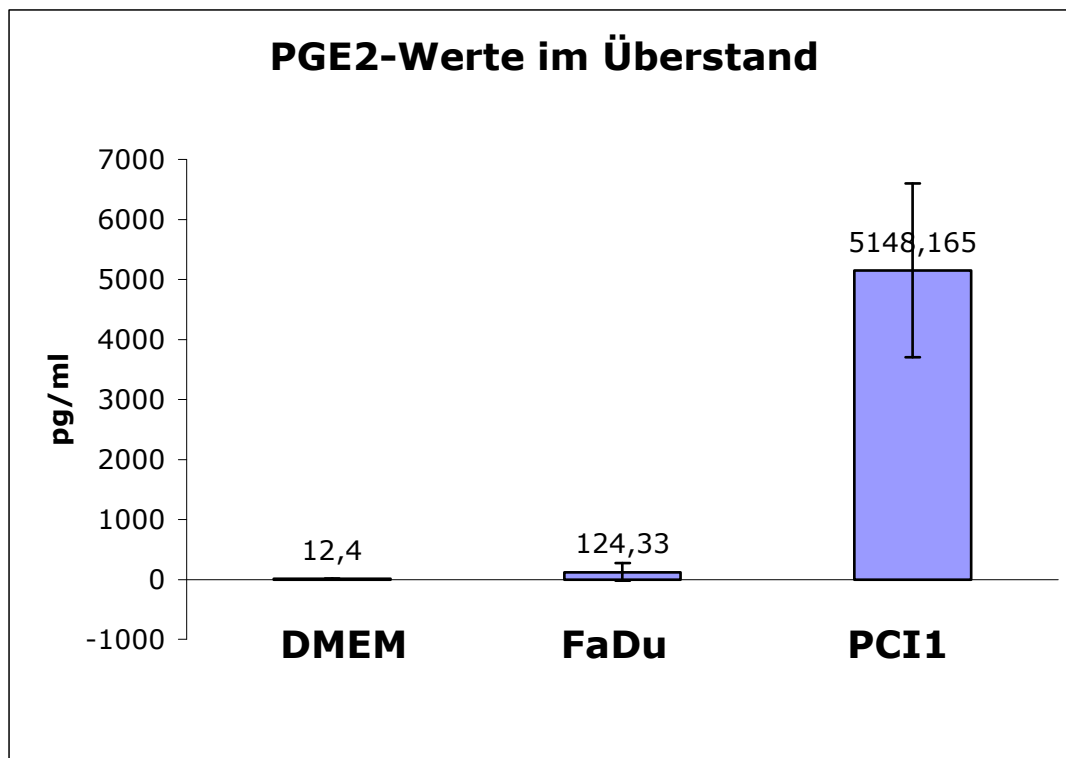


Abbildung 6: PGE2-Produktion von FaDu und PCI1; Hervorzuheben ist der große Unterschied zwischen den beiden Zelllinien.

Wie schon beschrieben, werden aus der Arachidonsäure verschiedene Eicosanoide synthetisiert; dieser Prozess wird von den Cyclooxygenasen katalysiert. Nichtsteroidale antiinflammatorische Substanzen (NSAIDS), zu denen Aspirin, Indomethacin und Ibuprofen gehören, hemmen die Cyclooxygenasen und blockieren somit auch die PGE2-Produktion. Von zunehmender Bedeutung für die Onkologie wurden NSAIDS durch Daten, die zeigten, dass deren Langzeitapplikationen einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum verschiedener Tumorentitäten besitzt (Cross et al., 1997, Ondrey et al., 1996). Bei den PGE2-ELISA, die wir durchführten, wollten wir auch die Effizienz verschiedener Cox-Inhibitoren testen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb.7 dargestellt.

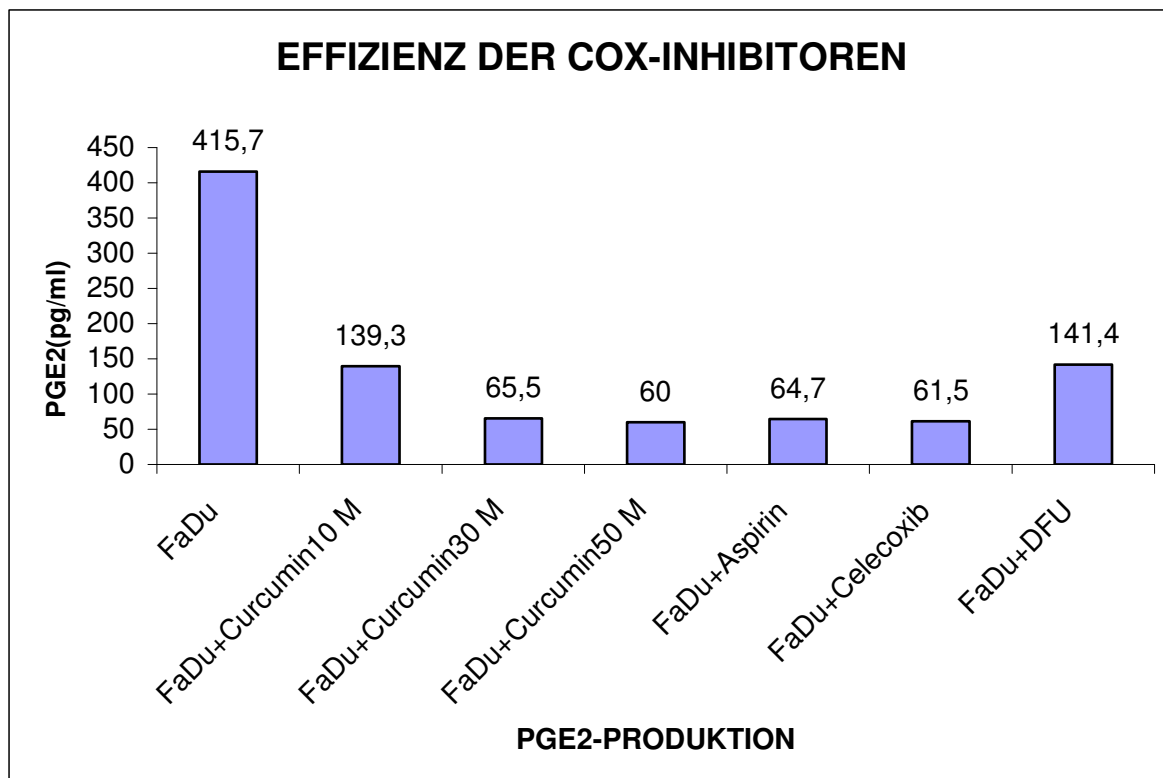


Abbildung 7: Effizienz verschiedener Cox-Inhibitoren, verglichen anhand der PGE2-Werte durch ELISA-Bestimmung.

Es wurde die PGE2-Konzentration im 48-stündigen Überstand einer FaDu Zellkultur bestimmt, sowie auch im Überstand derselben FaDu Zellkultur mit gleichzeitiger Zugabe von verschiedenen, steigenden Konzentrationen Curcumin (eine natürliche Substanz, gewonnen aus der Pflanze *Curcuma sp.*, besitzt Cox2-inhibitorische Eigenschaften). Je höher die Curcumin-Konzentration, desto niedriger der PGE2-Wert; ferner wurden Aspirin als nicht-selektiver, Celecoxib sowie DFU als Cox2-spezifischer Hemmer eingesetzt.

3.4 Regulation des CCR5-Rezeptors auf Monozyten durch konditionierte Karzinomzell-Überstände und Cox1-, Cox2-transfizierte Zelllinien

CCR5 ist ein 7-Transmembrandomänen-, G-Protein-gekoppelter Chemokinrezeptor, der hauptsächlich auf Monozyten und T-Lymphozyten zu finden ist (Loetscher et al., 1998) und spezifisch die Chemokine RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β bindet (Baggiolini et al. 1997). Die Bindung an CCR5 vermittelt die chemotaktische Wirkung dieser

Chemokine, d.h. sie induzieren die Migration der Monozyten in Richtung Entzündungsgewebe, wo Chemokine lokal produziert werden.

In der folgenden Versuchsreihe wurde die Regulation des CCR5-Rezeptors auf Monozyten durch Inkubation in konditionierten Karzinomzell-Überständen und Überständen von Cox1- bzw. Cox2-transfizierten ANT1-Zellen untersucht. Zur Gewinnung von Tumorzell-Überständen wurden jeweils 1×10^5 Zellen/ml FaDu-, PCI1-Zellen sowie transfizierten ANT1-Zellen, nämlich ANT1pcDNA- (Kontrolle), ANT1Cox1- und ANT1Cox2-Zellen ausplattiert und für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Die konditionierten Überstände wurden dann abzentrifugiert (2200g) und der zellfreie Überstand zur Inkubation von Monozyten verwendet. Monomac-6-Zellen (MM6) wurden in Standard-Zellkulturmedium bzw. mit dem Karzinomzell-Überstand oder dem Überstand der transfizierten ANT1-Zellen für 24 bzw. 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die MM6 entnommen und per FACS auf ihre CCR5-Expression analysiert. Die in Abb.8 dargestellten Werte wurden aus dem Quotienten der durchschnittlichen Fluoreszenz-Intensität (*mean fluorescence intensity*, MFI) der gemessenen CCR5-Expression und der gemessenen Isotyp-Kontrolle errechnet (*ratio*). Dieser Quotient gibt das Verhältnis des auf der Oberfläche exprimierten CCR5-Rezeptors zu unspezifischen Bindungen des Sekundärantikörpers wider. Die eingeführten Werte sind jene einer Messung nach 48 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt waren die Effekte des Karzinomzell-Überstandes auf Monozyten stärker ausgeprägt als nach 24 Stunden.

Die ausgeführten Versuche zeigen, dass die Überstände der PGE2-produzierenden Karzinomzelllinien FaDu und PCI1 sowie von ANT1Cox1 bzw. ANT1Cox2 eine Herabregulation von CCR5 induzierten (Abb. 8).

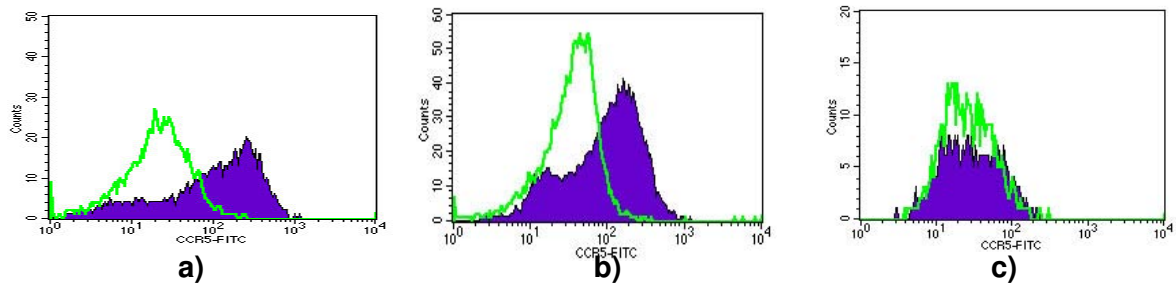
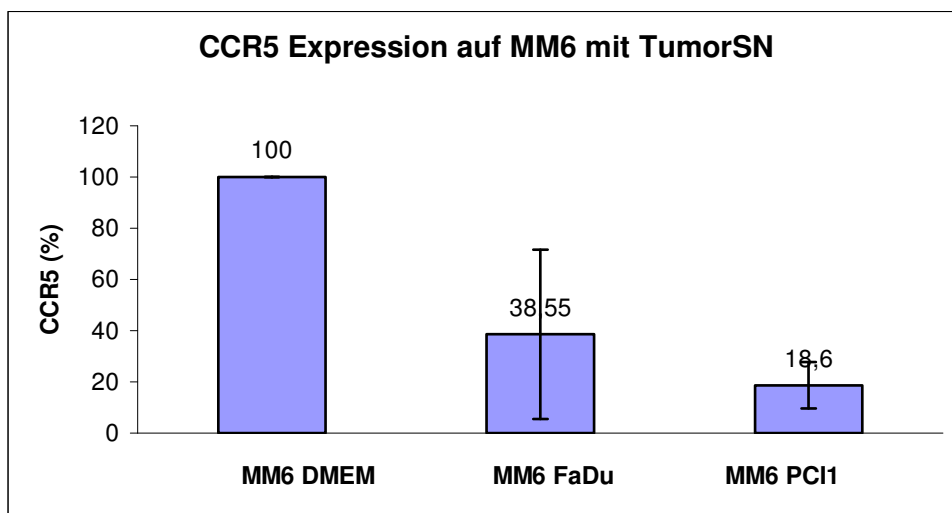


Abbildung 8: Analyse der CCR5-Expression auf MM6-Zellen (in der Durchflußzytometrie) nach Inkubation in a) Zellkulturmedium, b) FaDu-Überständen und c) PCI1-Überständen (grüne Kurve: unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers, blaue Kurve: tatsächliche CCR5-Expression). Die Messung erfolgte mit einem spezifischen CCR5-Antikörper und einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper. Zur Kontrolle wurde nur mit dem Sekundärantikörper gefärbt. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel aus drei unabhängigen Versuchen.

Im Folgenden wird anhand eines Balkendiagramms die Herabregulation von CCR5 auf MM6 durch Karzinomzell-Überständen, bzw. durch Überstände von Cox1- und Cox2-transfizierten ANT1-Zellen gezeigt. Dargestellt sind jeweils prozentuale Werte, wobei als 100% die Expression von CCR5 auf MM6 in Zellkulturmedium (DMEM) angegeben wird, bzw. die Expression von CCR5 auf MM6 in ANT1pcDNA-Überstand, und dazu im Vergleich die CCR5-Expression auf MM6 in FaDu, PCI1, ANT1Cox1 und ANT1Cox2-Überstände. Die prozentualen Werte wurden aus den Verhältnissen zueinander errechnet und sind jeweils Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.



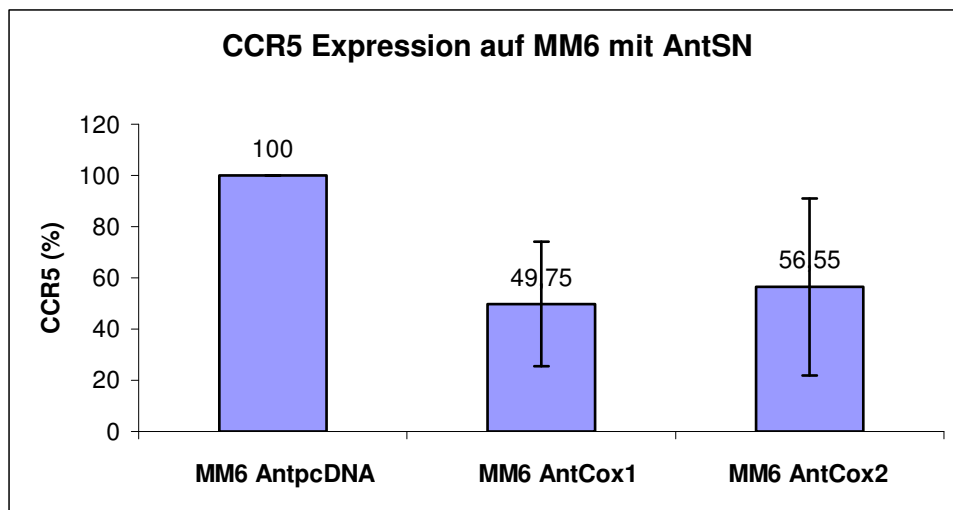


Abbildung 9: Analyse der CCR5-Expression auf MM6 nach Inkubation in verschiedenen Tumorzell-Überständen. CCR5 wird auf MM6 mit FaDu-Überständen signifikant herabreguliert (Student t-Test; $p < 0,005$), ebenfalls mit PCI1-Überständen ($p < 0,0001$), ANTCox1-Überstände ($p < 0,003$) und ANTCox2-Überstände ($p < 0,01$).

Die Herabregulation von CCR5 durch Tumor-Überstände ist bemerkenswert, dabei ist die Expression von CCR5 auf MM6 mit Cox1-Überständen niedriger als mit Cox2-Überständen, was auch der höheren PGE2-Produktion von ANT1Cox1-Zellen im Vergleich zu ANT1Cox2-Zellen entspricht bzw. mit PCI1-Überständen niedriger als mit FaDu-Überständen. Dies entspricht auch der höheren PGE2-Produktion von PCI1 im Vergleich zu FaDu.

Die Herabregulation von CCR5 auf Monozyten hat zur Folge, dass auch die Funktionen der Monozyten negativ beeinflusst werden: Zeidler et al. zeigten 2000, dass primäre Monozyten von Normal Spendern, die in Zellkulturmedium bzw. in Tumorzell-Überständen inkubiert wurden, in Migrationsversuchen deutlich schlechter wanderten. Dadurch konnte belegt werden, dass Tumor-Überstände eine wichtige Funktion der Monozyten, das Migrieren in Richtung auf einen chemotaktischen Stimulus, beeinträchtigen (Zeidler, Csanady et al. 2000).

3.5 Regulation des Urokinase-Rezeptors uPAR auf Monozyten durch konditionierte Karzinomzell-Überstände und Cox1-, Cox2-transfizierte Zelllinien

Das Plasminogen Aktivator System in Monozyten ist ein Komplex, in welchem Plasminogen zu Plasmin umgewandelt wird, um dann die extrazelluläre Proteolyse von Fibrinogen, extrazellulärer Matrix (EZM) und Adhäsionsproteinen zu bewirken.

Dadurch spielt das System eine wichtige Rolle bei der Migration von Immunzellen und der Penetration dieser Zellen durch die EZM.

uPAR ist der Rezeptor für *urokinase-type plasminogen activator (uPA)*, einer der Plasminogen Aktivatoren. Die Reaktionskette der oben genannten Prozesse wird durch Bindung von uPA an uPAR in Gang gesetzt.

Im Folgenden wurde die Regulation des uPAR-Rezeptors auf Monozyten durch Inkubation in konditionierten Karzinomzell-Überständen und Überstände von Cox1-, bzw. Cox2-transfizierten ANT1-Zellen untersucht. Zur Gewinnung von Tumorzell-Überständen wurden 1×10^5 Zellen/ml FaDu-, PCI1-Zellen sowie auch transfizierte ANT1-Zellen, nämlich ANT1pcDNA- (Kontrolle), ANT1Cox1- und ANT1Cox2-Zellen ausgesät und für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Die konditionierten Überstände wurden dann abzentrifugiert (2200g) und der zellfreie Überstand zur Inkubation von Monozyten verwendet. Die MM6 wurden in Standard-Zellkulturmedium bzw. mit dem Karzinomzell-Überstand, oder dem Überstand der transfizierten ANT1-Zellen, für 24 bzw. 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die MM6 per FACS bezüglich der uPAR-Expression analysiert. Die in der Abb.10 aufgeführten Werte wurden aus den Quotienten der durchschnittlichen Fluoreszenz-Intensität (*mean fluorescence intensity*, MFI) der gemessenen uPAR-Expression und der Negativ-Kontrolle errechnet (*ratio*). Die eingeführten Werte sind jene einer Messung nach 48 Stunden, da zu diesem Zeitpunkt die Effekte des Karzinomzell-Überstandes auf Monozyten stärker als nach 24 Stunden waren.

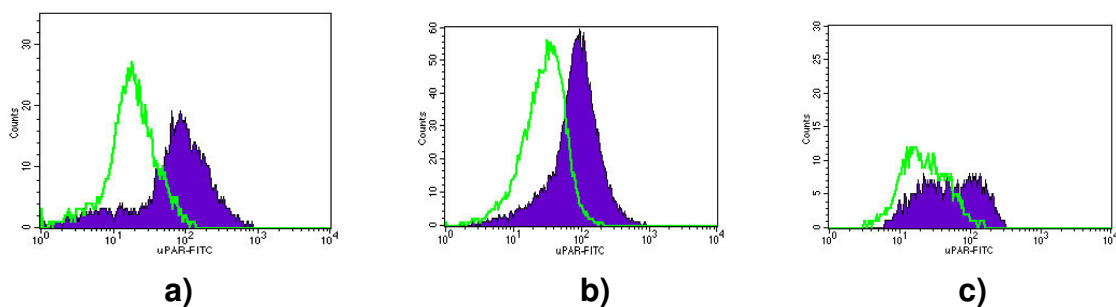


Abbildung 10: Analyse der uPAR-Expression auf MM6-Zellen (in der Durchflußzytometrie) nach Inkubation in a) Zellkulturmedium, b) FaDu-Überständen und c) PCI1-Überständen (grüne Kurve: unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers, blaue Kurve: tatsächliche uPAR-Expression). Die Messung erfolgte mit einem spezifischen uPAR-Antikörper und einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper. Zur Kontrolle wurde nur mit dem Sekundärantikörper gefärbt. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel aus drei unabhängigen Versuchen.

Die durchgeführten Versuche zeigten, dass alle Überstände PGE2-produzierender Karzinomzelllinien (FaDu und PCI1, ANT1Cox1 und ANT1Cox2) eine Herabregulation von uPAR bewirken, nicht jedoch Überstände von ANTpcDNA, die kein PGE2 enthielten.

Im Folgenden dargestellt ist die relative Herabregulation von uPAR auf MM6 durch Karzinomzell-Überstände bzw. durch Überstände von Cox1- und Cox2-transfizierten ANT1-Zellen. Die angegebenen prozentualen Werte wurden aus deren Verhältnis zueinander errechnet und sind jeweils Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen.

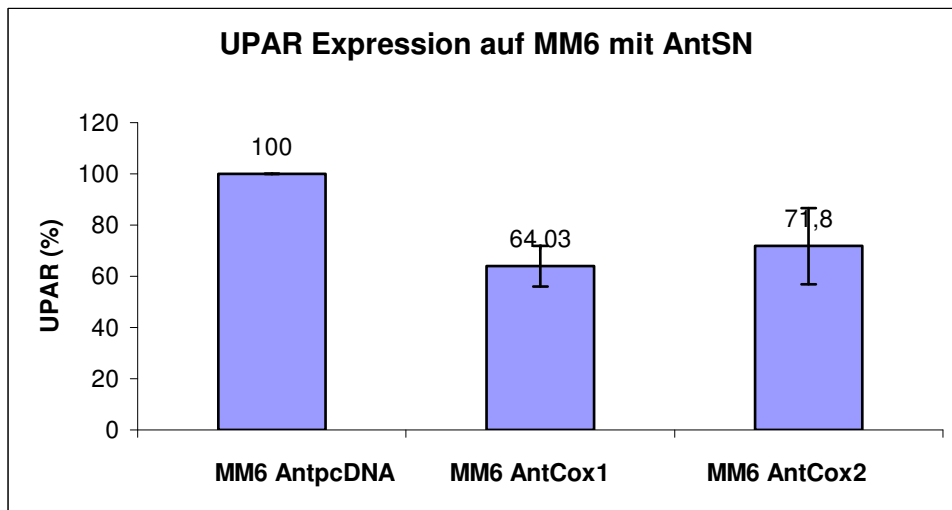
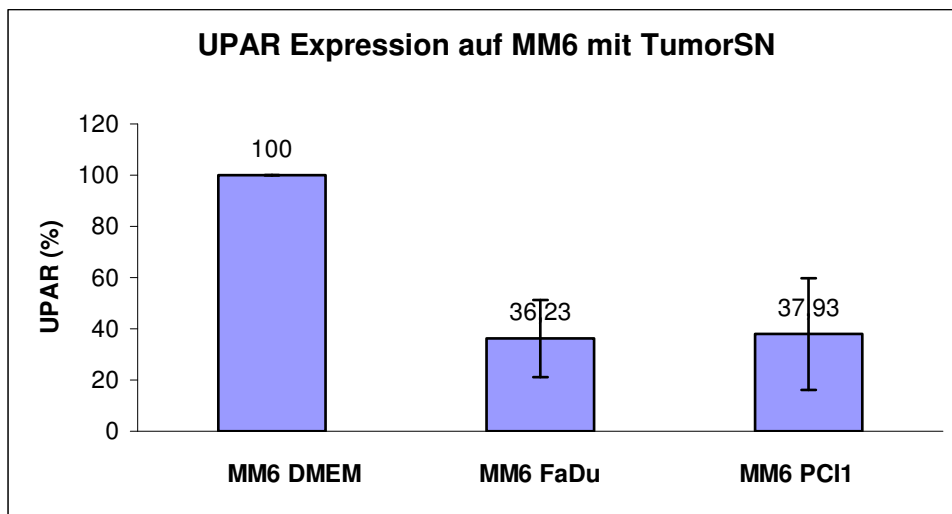


Abbildung 11: Analyse der uPAR-Expression auf MM6-Zellen nach Inkubation in verschiedenen Tumorzell-Überständen. uPAR wird auf MM6 mit FaDu-Überständen signifikant herabreguliert (Student t-Test; $p < 0,0009$), ebenfalls mit PCI1-Überständen ($p < 0,003$), ANT1Cox1-Überstände ($p < 0,0007$) und ANT1Cox2-Überstände ($p < 0,01$).

Die Suppression von uPAR durch Tumor-Überstände ist deutlich erkennbar. Dabei war die Expression von uPAR auf MM6 nach Inkubation mit Cox1-Überständen niedriger als mit Cox2-Überständen, was auch der höheren PGE2-Produktion von ANT1Cox1-Zellen im Vergleich zu ANT1Cox2-Zellen entspricht.

Die Herabregulation von uPAR auf Monozyten hatte zur Folge, dass auch die Migration der Monozyten durch die extrazelluläre Matrix beeinträchtigt wird: Hofmann et al. (persönliche Mitteilung) zeigten 2003 anhand von Matrigel-Versuchen, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen dem verschlechterten Migrationsvermögen durch EZM und der verminderten uPAR-Expression auf mit Tumorzell-Überständen behandelten MM6-Zellen gibt. MM6-Zellen, die mit FaDu, bzw. PCI1-Überständen inkubiert wurden, konnten hinterher signifikant schlechter durch die extrazelluläre Matrix wandern als MM6, die in Zellkulturmedium inkubiert wurden.

Die uPAR-Expression auf Monozyten stellt somit einen weiteren Indikator der Funktionstüchtigkeit von Monozyten dar; weitere Versuche bezüglich des Plasminogen Aktivator Systems, auch *in vivo*, werden sicherlich neue interessante Daten liefern.

3.6 Restoration der CCR5- und uPAR-Expression auf Monozyten durch NSAIDs

Bisher wurde gezeigt, dass PGE2, wie es Tumorzellen sezernieren, die Funktionen der Monozyten beeinträchtigt und u.a. dadurch immunsupprimierend wirkt. Daher stellte sich die Frage, ob Cyclooxygenasehemmer, die die Produktion von PGE2 inhibieren, nicht imstande wären, die beeinträchtigten Funktionen von Monozyten wiederherzustellen. In diesem Sinne haben Zeidler et al. 2000 gezeigt, dass die beeinträchtigten Adhäsions- und Migrationsfunktionen von Monozyten, die in Tumor-Überstand kultiviert wurden, durch Zugabe von 1mM Aspirin bzw. 13µM Indomethacin zumindest teilweise restauriert werden konnten. Lang et al. konnten 2003 anhand von *in vivo* Versuchen nachweisen, dass die eingeschränkte Migrationsfähigkeit von Monozyten von Tumorpatienten durch operative Entfernung des Tumors aber auch präoperativ durch Inhibierung der PGE2-Synthese durch Rofecoxib restauriert wurde.

In der folgenden Versuchsreihe wurde die Expression von CCR5, bzw. uPAR auf primären Monozyten, die in FaDu-, bzw. PCI1-Überstand inkubiert wurden, analysiert

und die Wirkung von NSAIDS (Indomethacin und Celecoxib) darauf im Sinne einer Immunrestauration untersucht. Indomethacin inhibiert unspezifisch beide Cox-Isoenzyme während Celecoxib ein selektiver Cox2-Hemmer ist. Um die PGE₂-Synthese der Tumorzellen zu inhibieren, wurde Indomethacin in einer Endkonzentration von 13µM und Celecoxib in einer Endkonzentration von 5µM jeweils zu Beginn der Versuche zu ausplattierten FaDu bzw. PCI1-Zellen hinzugefügt.

Die durchgeführten Versuche zeigten, dass die Überstände der PGE₂-produzierenden Karzinomzelllinien FaDu und PCI1 eine Herunterregulation von CCR5 und uPAR bewirkten, und dass die Zugabe von Indomethacin diesen Effekt teilweise revertierte. Die in Abb.12 angegebenen Werte sind jene einer Messung nach 48 Stunden. Die Expression von CCR5 und uPAR auf Monozyten in Zellkulturmedium (DMEM) wurde gleich 100% gesetzt. Die prozentualen Werte wurden aus deren Verhältnissen zueinander errechnet und sind Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen.

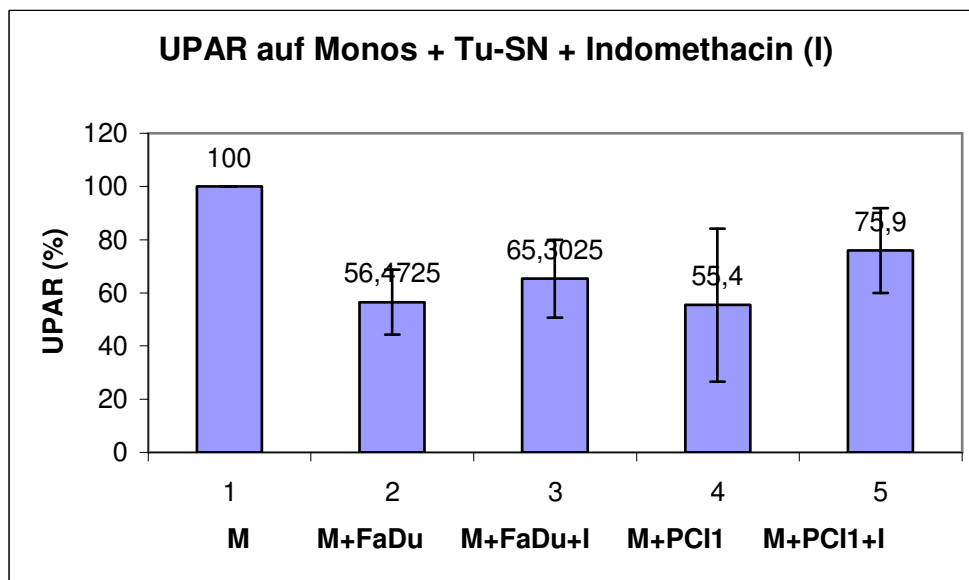
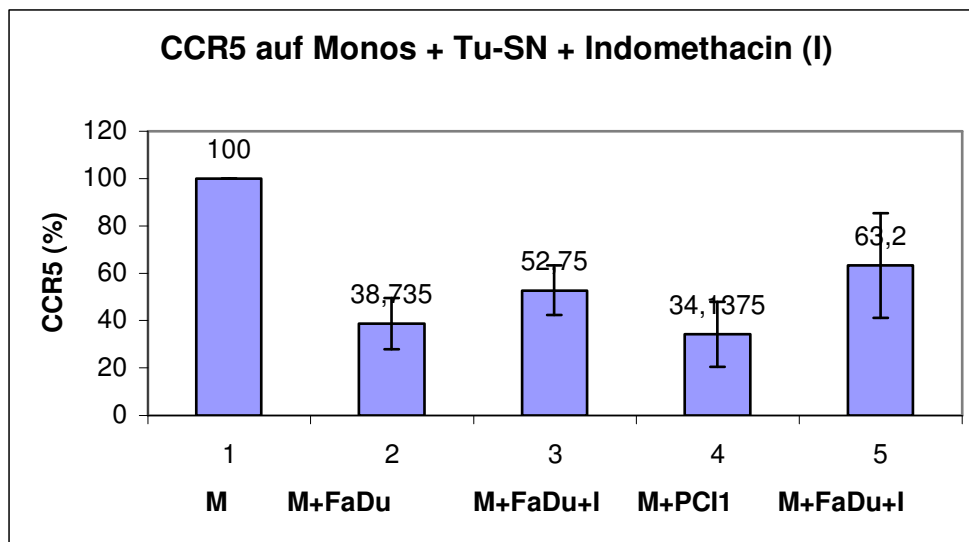


Abbildung 12: Analyse der CCR5 und uPAR-Expression auf Monozyten nach Inkubation in DMEM (entspricht 100%) und Überständen der Zelllinien FaDu und PCI1, die in An- oder Abwesenheit des Cox-Inhibitors Indomethacin generiert wurden. Die Herabregulation von CCR5 und uPAR durch Tumor-Überstände ist deutlich erkennbar, ebenso die teilweise Restaurierung durch Indomethacin, belegt über den Student t-Test (Signifikanz der CCR5-Restoration: $p < 0,05$ im Falle von FaDu-Überständen, $p < 0,03$ im Falle von PCI1-Überständen; Signifikanz der uPAR-Restoration: $p < 0,19$ im Falle von FaDu-Überständen, $p < 0,12$ im Falle von PCI1-Überständen).

Im Folgenden wurde die gleiche Versuchsreihe mit Zugabe von Celecoxib durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass auch dieser spezifische Cox2-Inhibitor die Suppression von CCR5 und uPAR restaurierte, wobei der Effekt deutlicher war als der von Indomethacin.

Abb.13 zeigt die Herabregulation von CCR5 und uPAR auf Monozyten durch Karzinomzell-Überstände, die in An- oder Abwesenheit von Celecoxib generiert wurden.

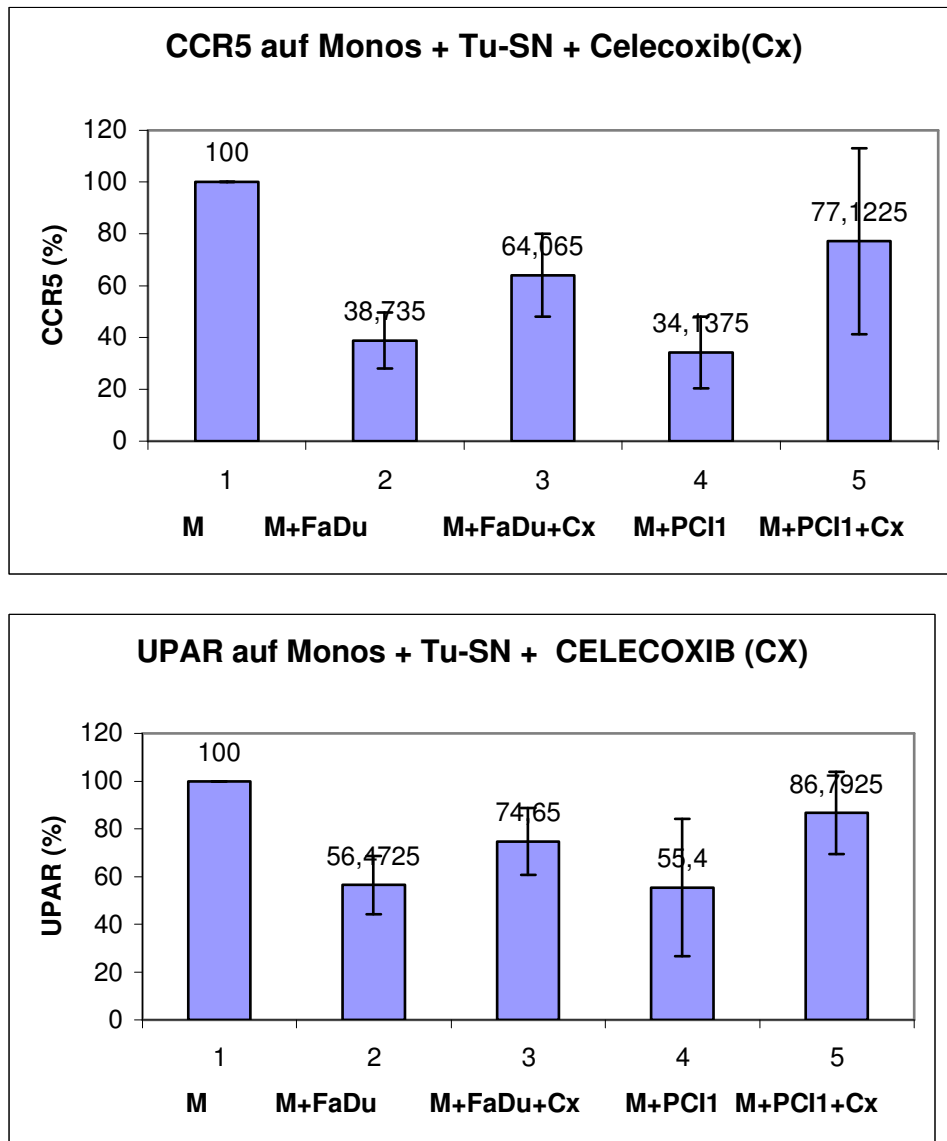


Abbildung 13: Analyse der CCR5 und uPAR-Expression auf Monozyten nach Inkubation in DMEM (entspricht 100%), in FaDu, PCI1-Überständen, bzw. in Überständen mit Celecoxib. Die Herabregulation von CCR5 und uPAR durch Tumor-Überstände ist deutlich und kann durch Celecoxib (Cx) teilweise revertiert werden. Die Signifikanz der Restauration wurde über den Student t-Test berechnet: CCR5-Restauration – $p < 0,01$ im Falle von FaDu-Überständen, $p < 0,03$ im Falle von PCI1-Überständen; UPAR-Expression – $p < 0,04$ im Falle von FaDu-Überständen, $p < 0,05$ im Falle von PCI1-Überständen.

Vergleicht man die Effekte der zwei Cox-Inhibitoren Indomethacin und Celecoxib miteinander, so ist eine deutlichere Wirkung von Celecoxib gegenüber Indomethacin

festzustellen: Sowohl CCR5 als auch uPAR werden mit Celecoxib quantitativ besser restauriert als mit Indomethacin.

3.7 Untersuchungen am Sphäroid-Modell

Weder Zellsuspensionen noch adhärent wachsende Kulturzellen können die Situation z.B. disseminierter Tumorzellen *in vivo* angemessen repräsentieren. Aus diesem Grund wurde die Generierung und Bearbeitung dreidimensionaler Zellverbände, sogenannter Tumorzell-Sphäroide (TCS), in unserem Labor etabliert und für Kokultur-Experimente eingesetzt. TCS stellen *in vitro*-Systeme dar, die als ideales Modell zur Simulation von Tumorzell dissemination und nicht-vaskularisierten Bereichen von Tumoren angesehen werden. TCS wurden daher von uns verwendet, um die Interaktion von Immuneffektorzellen mit Tumorzellen unter dem Einfluß von NSAIDS näher zu charakterisieren.

3.7.1 Etablierung des Sphäroid-Modells

Tumorzell-Sphäroide sind kugelförmige dreidimensionale Verbände aus etwa 10^4 Tumorzellen. Sie wurden generiert, indem eine Suspension von Tumorzellen auf eine Agarose-beschichtete 96-well-Platte gegeben wurde. Innerhalb von 24 Stunden bildeten sich runde, homogene Sphäroide aus (Abb.14). Diese Tumorzell-Sphäroide waren je nach verwendeter Zelllinie unterschiedlich kompakt. So bildeten die hier verwendeten PCI1-Zellen erheblich stabilere Sphäroide als die FaDu-Zelllinie.

Zunächst wurden die von uns verwendeten Tumorzell-Sphäroide histologisch charakterisiert, dann erfolgten Experimente zum Infiltrationsverhalten von Immuneffektorzellen.

Schließlich wurden die Veränderungen untersucht, die aus der gleichzeitigen Behandlung von Sphäroiden mit Immunzellen und NSAIDs resultierten.

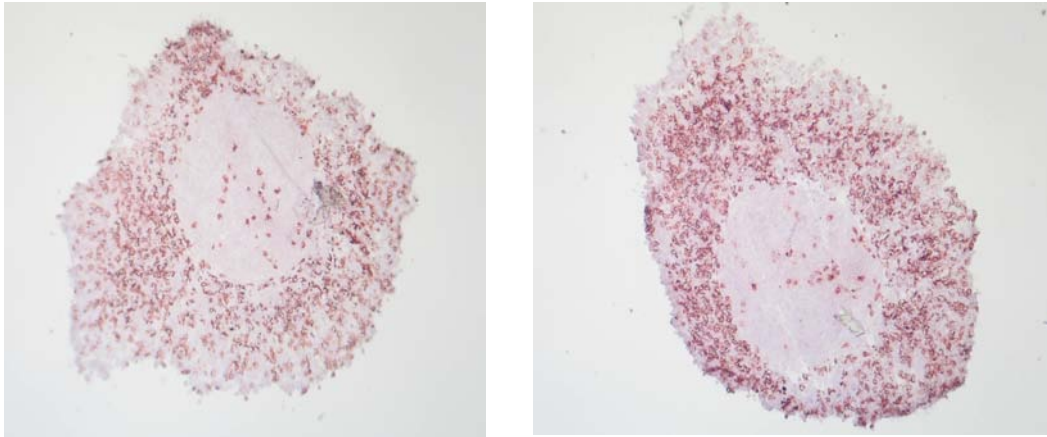


Abbildung 14: Darstellung eines FaDu-Sphäroids, umgeben von einem dichten Ring von PBMCs. Zentral ist das rundförmige Sphäroid erkennbar, umringt von zahlreichen PBMCs, die an das Sphäroid adhären. Ein Teil davon sind ins Sphäroid eingedrungen und sind an der dunkleren Farbe erkennbar (Anti-CD3-ABC-Po. Original-Vergrößerung x 200).

3.7.2 Histologische/immunhistochemische Charakterisierung der Sphäroide

HE-Färbung (Abb. 15a): FaDu und PCI1-Zellen bildeten Sphäroide mit einer dichten äußeren Hüllschicht flächig aufliegender, pflastersteinartiger Zellen. Im Inneren zeigten die Zellen eine der Histologie von Plattenepithelkarzinomen ähnliche Anordnung, in den äußeren Zellen fanden sich Mitosen als Zeichen einer weiterbestehenden Teilungsaktivität. Nach etwa fünf Tagen bildeten sich im Zentrum der Sphäroide Nekrosen aus.



Abbildung 15a und 15b: Beispiele von Sphäroide in HE-Färbung. Erkennbar ist die Struktur des Sphäroids, bestehend aus pflastersteinartigen, aufeinandergeschichteten Zellen in kugelförmigen Gebilden (HE-Färbung. Original-Vergrößerung x200).

Die Darstellung des Proliferationsmarker Ki-67 veranschaulicht die Proliferation der Tumorzellen. Sowohl im Falle der FaDu-Sphäroide, wie auch der PC11-Sphäroide konnte man anhand von Ki-67 eine rege Proliferation der Zellen feststellen, die in den äußeren Zellschichten stärker ausgeprägt war als in den inneren.

Sowohl mikroskopisch als auch immunhistologisch konnte eine extrazelluläre Matrix nicht nachgewiesen werden (Abb.15b).

3.7.3 Infiltrationsverhalten von Immunzellen in Sphäroide

Ziel der nächsten Versuchsserie war es, PBMCs mit Sphäroiden zu kokultivieren und ihr Verhalten zueinander zu beobachten. Dabei konzentrierte sich das Hauptinteresse darauf, ob die Immunzellen die Tumorzell-Sphäroide infiltrierten.

Die Tumorzell-Sphäroide wurden hierfür 24 Stunden mit allogenen PBMCs inkubiert. Bereits nach wenigen Stunden konnte man lichtmikroskopisch eine Verklumpung der PBMCs um das Sphäroid beobachten. Auch immunhistochemische Analysen von Gefrierschnitten zeigten ein ähnliches Bild: man erkannte zentral das Sphäroid, umgeben von einem dicht anliegenden Ring von Immunzellen. Die Morphologie der Sphäroide hatte sich durch die Kokultivierung mit PBMCs nicht geändert (Abb.16)

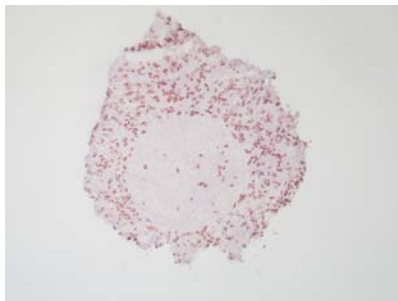


Abbildung 16: FaDu-Sphäroid umgeben von einem dichten Ring von Immunzellen.

Zentral ist das Sphäroid erkennbar, ringsherum eine dichte Ansammlung von PBMCs, davon ein paar innerhalb des Sphäroids verteilt (Anti-CD3-ABC-Po. Original-Vergrößerung x 200).

Anschließend wurden die Sphäroide immunhistochemisch mit CD3 (T-Lymphozyten) und CD68 (Monozyten/Makrophagen) spezifisch gefärbt. Dabei ließ sich – unabhängig von der Herkunft der PBMCs – folgende Verteilung der Immunzellen beobachten:

Sowohl CD3 positive T-Lymphozyten, als auch CD68 positive Monozyten/Makrophagen wanderten in das Sphäroid ein, verteilten sich eher in die äußeren Schichten, drangen aber auch in die tieferen Schichten des Sphäroids vor.

CD3 positive T-Lymphozyten wurden in einem Anteil von fast 3% innerhalb der Sphäroide gefunden; *CD68 positive Monozyten/Makrophagen* kamen ebenfalls in einem Anteil von knapp 3% innerhalb des Sphäroids vor.

Zeichen einer Zellschädigung oder Veränderungen im Wachstumsverhalten ließen sich bei Sphäroiden nach Koinkubation mit PBMCs nicht feststellen. Die Verteilung und das Infiltrationsausmaß der Immunzellen waren unabhängig von der Herkunft der PBMCs aus buffy coats.

3.7.4 Infiltrat nach Inkubation von Sphäroiden mit PBMCs und NSAIDs

In der folgenden Versuchsserie untersuchten wir den Einfluss von NSAIDs auf die Interaktion von Tumorzellen mit Immunzellen. Dabei gingen wir von der Frage aus, ob NSAIDs durch Inhibierung der PGE₂-Synthese Immunzellen dazu bringen, effektiver in die Tumorzell-Sphäroide zu infiltrieren. Hintergrund dieser Überlegung war die Tatsache, dass Tumorzellen PGE₂ produzieren, welches immunsupprimierend wirkt. Diese Tumorzell-Sphäroide wurden dann wiederum histologisch anhand der Bestimmung der infiltrierten CD3- und CD68-positiven Zellen charakterisiert. Gleichzeitig wurde PGE₂ im Überstand eines jeden Sphäroids bestimmt.

Als Kontrolle wurden Sphäroide ohne PBMCs aber mit NSAIDs kultiviert. Dabei stellten wir fest, dass die Sphäroide mit oder ohne NSAIDs morphologisch vergleichbar waren. Eine durchgeführte Wachstumskinetik zeigte zudem, dass NSAIDs keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von FaDu- und PCI1-Zellen hatten. Aus diesen Ergebnissen schlossen wir, dass NSAIDs das Wachstum von Tumorzellen und die Bildung von Sphäroiden nicht modulierten.

Schließlich wurden Sphäroide, die mit PBMCs in Anwesenheit oder Abwesenheit von NSAIDs (Indomethacin oder Celecoxib) kokultiviert wurden, auf Infiltration von CD3- und CD68-positiven Zellen, verglichen.

Die Struktur der Sphäroide hatte sich durch Zugabe von Coxhemmern nicht geändert; sie behielten ihr kugelförmiges Aussehen und ihre runde Form bei der histologischen Untersuchung der Schnitte.

Die Ergebnisse dieser Versuche werden im folgenden dargestellt:

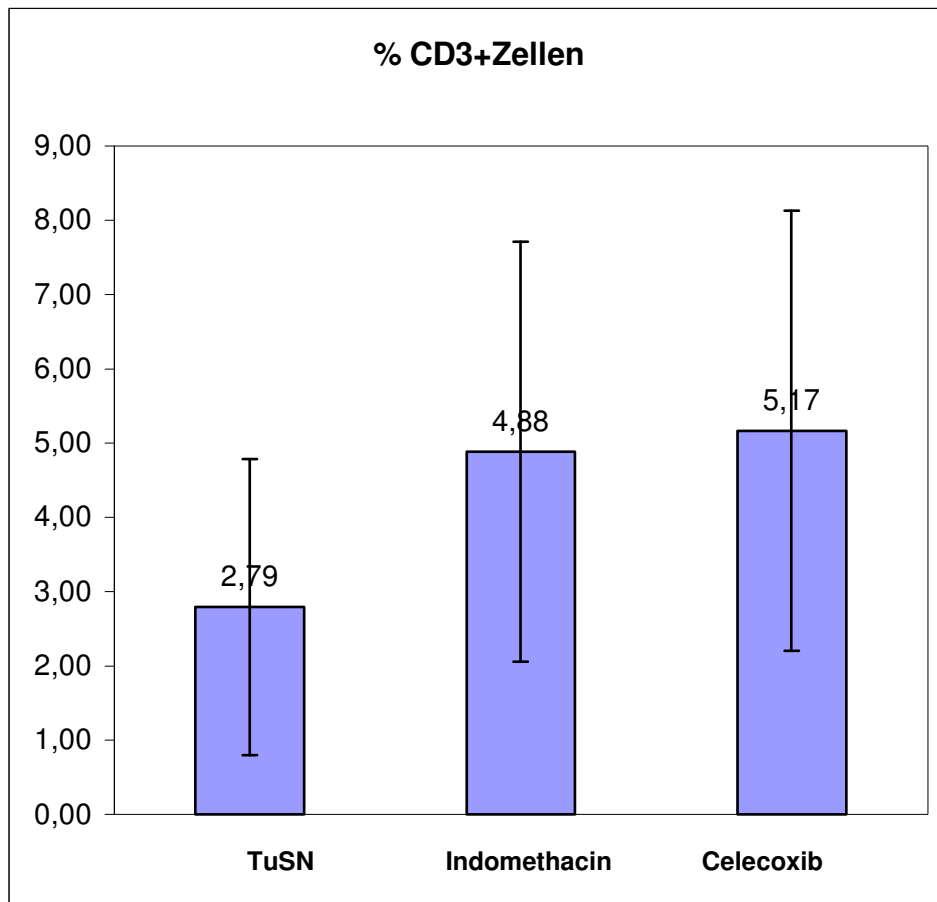
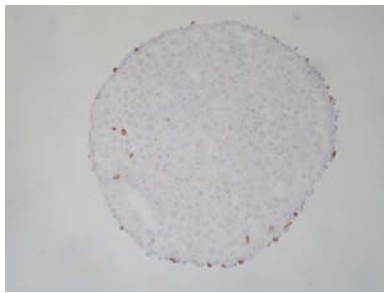
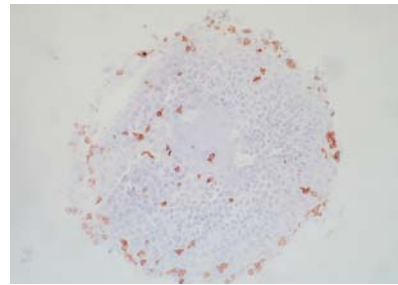


Abbildung 17: Prozentualer Anteil der CD3+ Zellen in 30 Tumorzell-Sphäroiden (15 FaDu, 15 PCI1) nach 24-stündiger Koinkubation von Sphäroiden (n=30) mit PBMCs verschiedener Spender ohne Zugabe von NSAIDS (Tu-SN) oder in Gegenwart eines Cox-Inhibitors (Indomethacin bzw. Celecoxib). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. In Gegenwart eines Cox-Inhibitors war eine effizientere Infiltration von CD3+ Zellen zu beobachten. Die Signifikanz der verbesserten Infiltration wurde über den Student t-Test berechnet; $p < 0,002$ Tu/Indomethacin, $p < 0,0007$ Tu/Celecoxib.



a)



b)

Abbildung 18: FaDu-Sphäroid mit PBMCs in Abwesenheit (a) und in Anwesenheit von Celecoxib (b) (Immunhistochemische Färbung der CD3+ Zellen). In Abwesenheit von Celecoxib sind kaum T-Lymphozyten innerhalb des Sphäroids erkennbar (a). In Anwesenheit des Cox-Inhibitors (b) infiltrierten erheblich mehr CD3+ Zellen das Sphäroid, darstellbar durch immunhistochemische Färbung (Anti-CD3-ABC-Po. Original-Vergrößerung x 200).

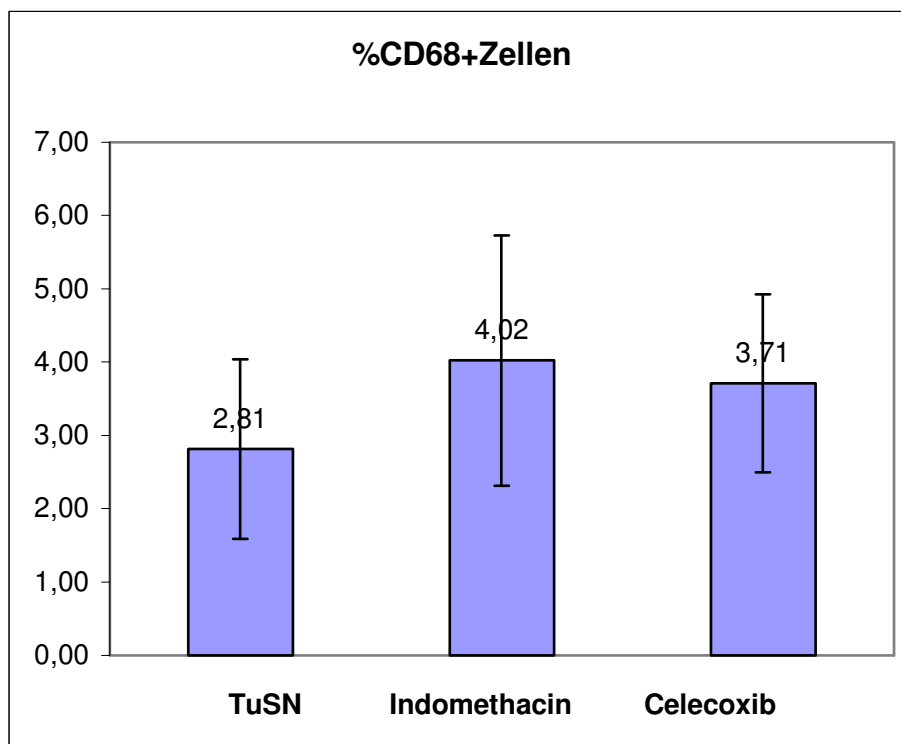


Abbildung 19: Prozentualer Anteil der CD68+ Zellen in 30 Tumorzell-Sphäroiden (15 FaDu, 15 PCI1) nach 24-stündiger Koinkubation von Sphäroiden (n=30) mit PBMCs verschiedener Spender ohne Zugabe von NSAIDS (Tu-SN) oder in Gegenwart eines Cox-Inhibitors (Indomethacin, bzw. Celecoxib). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. In Gegenwart eines Cox-Inhibitors war eine effizientere Infiltration von CD68+ Zellen zu beobachten. Die Signifikanz der verbesserten Infiltration wurde über den Student t-Test berechnet: $p < 0,003$ Tu/Indomethacin, $p < 0,006$ Tu/Celecoxib.

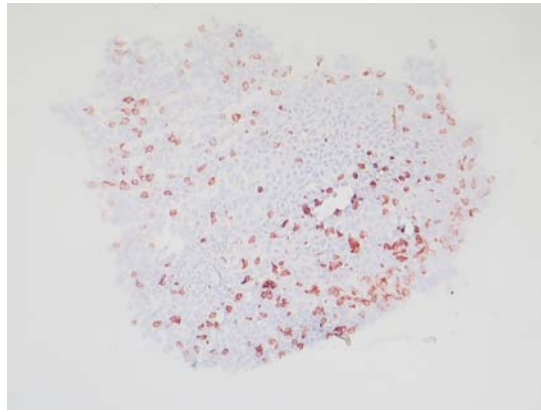


Abbildung 20: FaDu-Sphäroid mit PBMCs – immunhistochemische Färbung der CD68+ Zellen. Starke Infiltration von Monozyten/Makrophagen in das Sphäroid (Anti-CD68-ABC-Po. Original-Vergrößerung x 200).

Unter Zugabe von NSAIDS konnte man feststellen, dass T-Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen die Tumorzell-Sphäroide signifikant stärker infiltrierten. Die Wirksamkeit der NSAIDS wurde durch die Bestimmung von PGE2 mittels ELISA getestet. Dazu wurden zellfreie Überstände aus den Wells aller kultivierten Sphäroide asserviert und der Gehalt an PGE2 durch einen high-sensitivity-ELISA bestimmt.

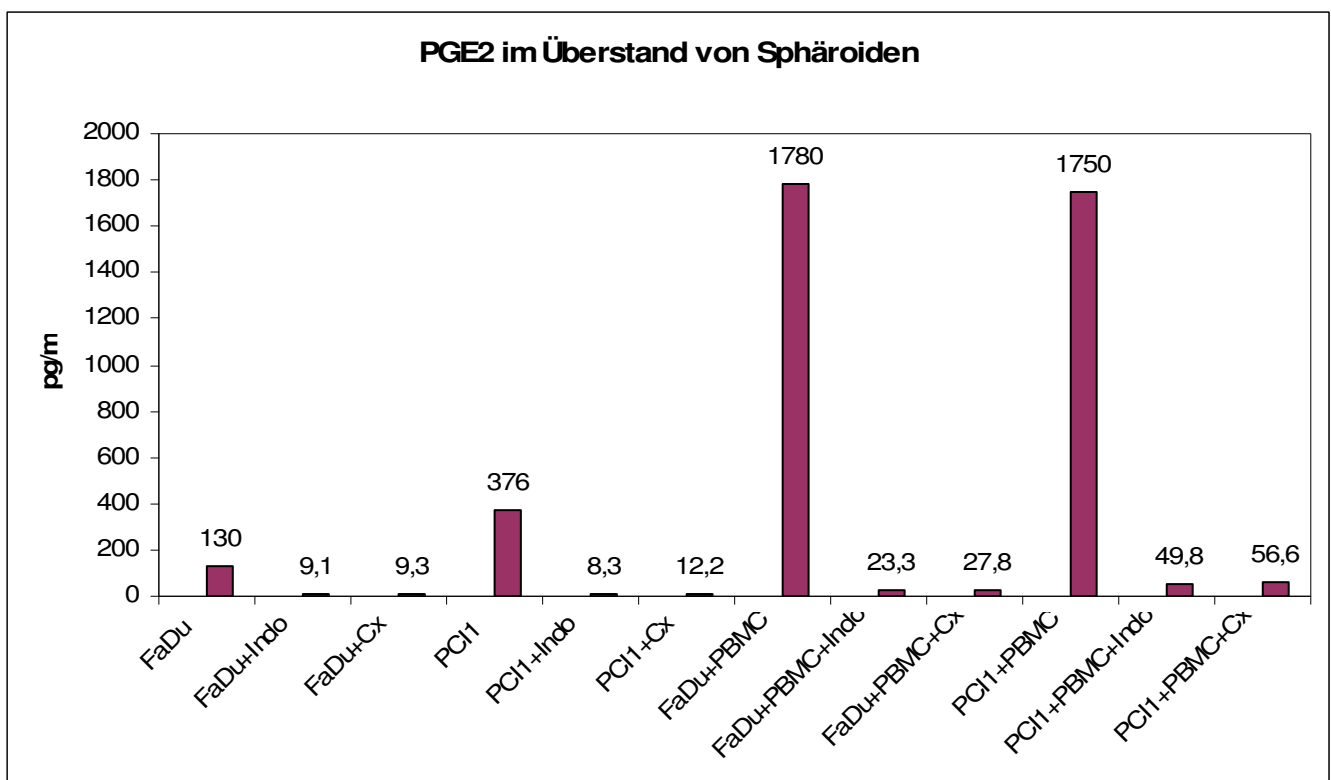


Abbildung 21: Ein PGE2-ELISA belegte, dass die Zugabe von Indomethacin (Indo), bzw. Celecoxib (Cx) die PGE2-Produktion in den Tumorzelllinien FaDu und PCI1 effizient inhibierte.

Kokultivierungen von Sphäroide mit PBMCs lieferten die höheren Werte, da vermutlich Substanzen, die von den Tumorzellen produziert wurden, die Immunzellen zu einer zusätzlichen PGE2-Produktion anregten. In allen Fällen wurde die Wirksamkeit der Coxhemmer anhand der PGE2-Werte bestätigt, was darauf schließen läßt, dass das Infiltrationsvermögen von Immunzellen durch PGE2 beeinflusst wird.

4 Diskussion

4.1 Tumor-induzierte Veränderungen in Monozyten

4.1.1 Immune Escape durch die Produktion von PGE2

Man weiss heute, dass Tumorpatienten ein supprimiertes Immunsystem besitzen. Regionale und systemische Immundefekte, Leukopenien und T-Zelldefekte sind häufig auftretende Phänomene bei vielen Tumorpatienten (Lang et al., 1999). Dabei stellt sich die Frage, ob der Tumor Ursache dieser Immunschwäche oder die Konsequenz von Immundefekten ist. Die besondere Rolle eines intakten Immunsystems bei der Kontrolle maligner Zellen wird speziell bei Patienten deutlich, die angeborene Immundefekte oder iatrogene Immunsuppressionen aufweisen, bei denen Tumore häufiger auftreten. Ein normales Immunsystem ist imstande, isoliert auftretende maligne Zellen zu eliminieren und die Entwicklung eines Tumors zu verhindern.

Die Produktion großer Mengen PGE2 durch die Malignome selbst ist ein weit verbreitetes Phänomen. PGE2 ist ein Metabolit der Arachidonsäure, dessen Synthese von einem Schlüsselenzym, der Cyclooxygenase, katalysiert wird. Die Cyclooxygenase kommt in drei Isoformen vor, Cox1, das konstitutiv und ubiquitär exprimiert wird und Cox2, das hauptsächlich in stimulierten Immunzellen, wie Monozyten/Makrophagen und in Tumorzellen vorkommt. Diese Überexpression korreliert mit der Malignität und Invasivität von Tumoren (Tsuji et al., 1998, Narko et al., 1997) und ist für die hohe Produktion von PGE2 und der dadurch verursachten Immunsuppression verantwortlich. Cox3 ist eine Acetaminophen-sensitive Isoform von Cox1, die im Gehirn und im Herzmuskel hoch exprimiert ist. Die Immunsuppression durch vom Tumor sezerniertes PGE2 ist einer der wichtigsten Immune Escape-Mechanismen.

Wichtige Daten bezüglich der onkogenen Immunsuppression am Beispiel von Monozyten lieferten Zeidler et al. (2000), die experimentell zeigen konnten, dass das PGE2 im Überstand verschiedener Karzinomzelllinien mit der Funktion von Monozyten auf wenigstens zwei verschiedenen Wegen interferiert: Es reduziert ihre Fähigkeit zur Migration in Richtung eines stimulierenden Chemokins und inhibiert ihr

Adhäsionsvermögen an Endothelzellen. Dies geschieht durch die PGE₂-bedingte Reduktion zweier Oberflächenmoleküle: des Chemokinrezeptors CCR5 und des Adhäsionsmoleküls Mac-1. Dies hat zur Folge, dass beispielsweise die Extravasierung von Monozyten in Richtung Tumor und das Einwandern ins Tumorstroma verringert wird. Ferner konnten die Autoren nachweisen, dass sich diese immunsupprimierenden Effekte mit NSAIDs wie Aspirin und Indomethacin antagonisieren ließen, und lieferten damit molekularbiologische Erklärungen für den positiven Effekt von NSAIDs auf das Tumorrisiko und die Prognose von Tumorpatienten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Tumor-induzierte Veränderungen in Monozyten untersucht. Zum einen wurden die Untersuchungen um den Cox2-Inhibitor Celecoxib erweitert, zum anderen wurde mit uPAR ein zusätzliches Oberflächenmolekül auf Monozyten untersucht. Das dreidimensionale Modell der Tumorzell-Sphäroide wurde anschließend näher beschrieben.

4.1.2 Konditionierte Karzinomzell-Überstände beeinflussen die Expression von CCR5 und uPAR auf Monozyten

Wie schon erwähnt, ist CCR5 ein Chemokinrezeptor, der auf verschiedenen Immunzellen zu finden ist. Hauptsächlich ist CCR5 auf Monozyten und T-Lymphozyten vorhanden, wo er spezifisch die Chemokine RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β bindet, die dadurch ihre chemotaktische Wirkung vermitteln, d.h. die Migration von Monozyten in Richtung Entzündungsgewebe induzieren, wo diese Chemokine lokal produziert werden.

In dieser Arbeit wurde eine Verminderung der CCR5-Expression sowohl auf MM6 als auch auf primären Monozyten unter Einfluss von konditionierten Karzinomzell-Überständen der HNO-Tumorzelllinien FaDu und PCI1 sowie auch durch Überstände von transfizierten ANT1-Cox1- und -Cox2-Zellen beobachtet. MM6 bzw. primäre Monozyten, die in Medium kultiviert wurden, das mit gereinigtem PGE₂ supplementiert wurde, wiesen die gleiche verminderte CCR5-Expression auf (Daten nicht gezeigt). Man kann somit schlussfolgern, dass die Herabregulation von CCR5 auf das PGE₂, das die Tumorzellen sezernieren, zurückzuführen ist. Ein weiteres Argument für die PGE₂-vermittelte Suppression von CCR5 liefern die Versuche mit NSAIDs, in denen gezeigt wurde, dass die Herabregulation von CCR5 durch Zugabe

von NSAIDs teilweise revertiert werden kann. Das CCR5-Niveau der Monozyten war niedriger im Falle von PCI1-Überständen, die laut PGE2-ELISA die höchste PGE2-Konzentration aufwiesen. Im Falle der transfizierten ANT1-Zellen war die CCR5-Expression auf Monozyten in Cox1-transfizierten Zellen, die größere Mengen PGE2 produzierten, niedriger als im Falle der Cox2-transfizierten Zellen, während die Kontrollzellen keinen Effekt zeigten.

Den Urokinase-Rezeptor uPAR benötigen Leukozyten für die Adhäsion, Migration und Matrix-Proteolyse (Blasi 1999; Mondino et al., 1999). uPAR bindet spezifisch die Prourokinase, die dadurch aktiviert und zu Urokinase gespalten wird. Diese wiederum katalysiert die Umsetzung von Plasminogen zu Plasmin und bewirkt somit die Degradation der extrazellulären Matrix, die dadurch für Leukozyten innerhalb von physiologischen Prozessen wie Entzündung, Wundheilung usw. besser zu penetrieren ist. uPAR erleichtert Monozyten auch den Austritt aus Blutgefäßen und die Migration durch Gewebe zu Infektionsherden. Dieser Prozess wird durch die Adhäsion an das Endothel initiiert und durch das Adhäsionsmolekül Mac-1 vermittelt. Sitrin et al. zeigten, dass die adhäsiven Funktionen von Mac-1 stark durch dessen Assoziation mit uPAR beeinflusst werden und schlossen daraus, dass uPAR und das Plasminogen Aktivator System Mac-1 bei der Monozytenadhäsion, Motilität und Aktivierung kontrollieren.

In dieser Arbeit wurde eine Verminderung der uPAR-Expression auf MM6 und primären Monozyten nach Behandlung mit konditionierten Karzinomzell-Überständen von FaDu und PCI1 sowie von transfizierten ANT1-Zellen festgestellt. Um herauszufinden, ob es sich dabei um einen PGE2-vermittelten Effekt handelte, wurden MM6 bzw. primäre Monozyten in Medium inkubiert, welches mit gereinigtem PGE2 supplementiert wurde. Die Expression von uPAR lag hier sogar niedriger als mit den Karzinomzell-Überständen (Daten nicht gezeigt). Aus den Daten von Zeidler et al. ergibt sich, dass die Repression von Mac-1 auf PGE2 in Karzinomzell-Überständen zurückzuführen ist. Da uPAR die Expression von Mac1 reguliert und beide durch Karzinomzell-Überstände supprimiert werden, kann man schließen, dass PGE2 auch für die Inhibierung der uPAR-Expression verantwortlich ist. Hierfür sprechen auch Versuche mit NSAIDs, in denen wir nachweisen konnten, dass die supprimierte uPAR-Expression durch Coxhemmer teilweise wiederhergestellt wurde.

Die Analyse der monozytären Oberflächenmolekülen CCR5 und uPAR sowie deren Suppression durch Tumor-sezerniertes PGE2 beschreiben neue Mechanismen der Immunsuppression. Gleichzeitig konnte mit der Verwendung von NSAIDs ein erster Schritt zur Wiederherstellung der Funktionen immunsupprimierter Monozyten aufgezeigt werden.

4.2 Restauration der CCR5- und uPAR-Expression auf Monozyten durch NSAIDs

Zahlreiche Studien deuten auf einen Zusammenhang zwischen der Einnahme von NSAIDs und einem dadurch signifikant reduzierten Risiko hin, an bestimmten Karzinomen zu erkranken. Studien mit Aspirin, Sulindac oder Ibuprofen bei Tieren zeigten, dass die Langzeitapplikation dieser Mittel das Tumorstadium inhibierten, oder zumindest verzögerten (Piazza et al., 1997). Klinische Studien an Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) belegten eine Verminderung der Zahl von Polypen nach Einnahme von Sulindac (Giardelli et al., 1993). In einem Tiermodell erwies sich die spezifische Inhibierung von Cox2 als noch effizienter (Oshima et al., 1996).

Die ersten experimentellen Daten auf molekularer Ebene hinsichtlich der Restauration einer verminderten CCR5- und Mac 1-Expression mittels NSAIDs lieferten Zeidler et al., die die positive Wirkung von Aspirin auf die herabregulierte CCR5-Expression von Monozyten, die in Karzinomzell-Überständen inkubiert wurden, nachweisen konnten. Zusätzliche *in vivo* Daten von Lang et al. belegten die Verbesserung der Migration von Monozyten in immunsupprimierten Tumorpatienten mittels Rofecoxib.

Das zweite untersuchte Oberflächenmolekül, uPAR, spielt eine Schlüsselrolle im Plasminogen Aktivator System, das eine große Bedeutung bei physiologischen Prozessen wie Entzündung, Wundheilung und extrazelluläre Proteolyse hat. uPAR und das Plasminogen Aktivator System erleichtern den Monozyten das Durchwandern durch das Endothel und die Migration ins Gewebe. Wird die uPAR-Expression durch Tumor-sezerniertes PGE2 herabreguliert, sind die Monozyten in ihren Funktionen beeinträchtigt: Sie können schlechter das Endothel penetrieren und reduziert in das Gewebe migrieren als Folge einer verminderten Degradation der

extrazellulären Matrix. Deswegen ist die Restauration der uPAR-Expression für die Funktionen der Monozyten von großer Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl die verminderte Expression von CCR5 als auch die von uPAR auf primären Monozyten, die in Karzinomzell-Überständen inkubiert wurden, mit Indomethacin und Celecoxib beträchtlich verbessert werden konnte. Es wurde eine höhere Wiederherstellung von CCR5 und uPAR durch Celecoxib als mit Indomethacin festgestellt, in Einklang auch mit einigen Daten der Literatur.

Diese Daten rechtfertigen den Einsatz von Coxhemmern zur Immunrestauration bei Tumorpatienten im Sinne einer Chemoprävention zur Reduktion des Krebsrisikos bei Risikopatienten durch regelmäßige Einnahme von NSAIDs.

Über eine Restauration des supprimierten Immunsystems könnte ein verlängertes tumorfreies Überleben bei bereits therapierten Karzinompatienten im Sinne einer Rezidivprophylaxe erzielt werden.

4.3 Charakterisierung des Infiltrationsverhaltens von Immunzellen am Tumorzell-Sphäroid-Modell in Anwesenheit von NSAIDs

Das zweidimensionale System der adhärent wachsenden Monolayer-Zellkulturen liefert für viele Fragestellungen wertvolle Ergebnisse. Von den Gegebenheiten *in vivo* ist ein solches System jedoch weit entfernt und somit die Aussagekraft der Ergebnisse limitiert. Näher an der Realität ist das dreidimensionale Modell der Tumorzell-Sphäroide (TCS), das in der onkologischen Forschung am häufigsten verwendete dreidimensionale Tumor-Modell. TCS sind das *in vitro* Modell für nichtvaskularisierte disseminierte Tumorzellen und intervaskuläre Regionen solider Tumoren und sind daher in vielen Eigenschaften Geweben *in vivo* vergleichbar. Gleichzeitig erlauben TCS aber Untersuchungen in einem weniger komplexen und zuverlässig reproduzierbaren Rahmen (Kunz-Schughart et al., 1998). So wurden TCS für die Testung antitumoraler Therapien wie z.B. Bestrahlung (Santini et al., 1999), Radioimmuntherapie (Essand et al., 1995) etc. ebenso eingesetzt wie für Untersuchungen zur Wirksamkeit therapeutischer Antikörper (Gabler et al., 1997, Fracasso und Colombatti, 2000).

Tumorzell-Sphäroide wurden aus verschiedenen Zelllinien kultiviert, dementsprechend unterschiedlich sind auch deren Eigenschaften. Es ließen sich aber auch gemeinsame Merkmale der Sphäroidzellen beobachten:

- Sphäroid-Zellen sind generell resistent gegenüber einer Behandlung mit antitumoralen Substanzen (Desoize und Jardillier, 2000), vermutlich aufgrund interzellulärer Kontaktstrukturen in Form von Desmosomen oder tight junctions (Ballangrud et al., 1999; Lian et al., 1999).
- Innerhalb des Sphäroidverbandes zeigen TCS-Zellen spezielle morphologische Differenzierungen: Im Zentrum lässt sich ein kleiner Kern nicht proliferierender Zellen nachweisen (Freyer, 1998), der sich nach fünf Tagen nekrotisch zersetzt. Die äußeren Zellen weisen Mitosen auf (Desoize et al., 1998).
- Sauer et al. zeigten 1998, dass es einen Gradienten in der metabolischen Aktivität von Sphäroid-Zellen gibt, und zwar ist die Mitochondrien-Aktivität um so niedriger, je tiefer die Zellen im Sphäroid gelegen sind (Freyer, 1998).
- Sphäroid-Zellen weisen eine differenzielle Expression verschiedener Proteine mit funktioneller Bedeutung auf (z.B. Adhäsionsmoleküle und proliferationsassoziierte Proteine; LaRue et al., 1998; Rainaldi et al., 1999).

Tumorzell-Sphäroide sind keine homogene Gebilde sondern weisen eine komplexe Struktur von Zellen mit unterschiedlicher Aktivität auf: Eine regere Aktivität und Teilung in den periphären Zellschichten und eine Verminderung der Aktivität bis hin zum nekrotischen Zerfall, je tiefer sich die Zellen im Sphäroid befinden; all die Daten der Literatur stimmen mit den von uns verwendeten Tumorzell-Sphäroiden überein.

Die Penetrabilität von Tumorzell-Sphäroiden scheint für antitumorale Substanzen relativ schlecht zu sein. Versuche mit therapeutischen Antikörpern zeigten, dass die Antikörpermoleküle nur in die äußeren Schichten der Sphäroide eindringen (Walz et al. 2002). Die Situation *in vivo* ist ähnlich: Solide Tumore und unvaskularisierte disseminierte Tumorzellcluster werden von Antikörpermolekülen in nur geringem Ausmaß penetriert (Juweid et al., 1992, Saga et al., 1995).

Über das Infiltrationsverhalten von Immunzellen in Tumorzell-Sphäroiden gibt es in der Literatur nur wenige Daten: Iwasaki et al. beschrieben 1990, dass unstimulierte

PBMCs nur in geringem Ausmaß in Sphäroide gelangen, und Konur et al. zeigten 1996 das Einwandern von Monozyten.

Hinsichtlich der Infiltration von Immunzellen in Tumorzell-Sphäroide ergaben unsere Versuche, dass Immunzellen TCS inhomogen infiltrieren, mit einer größeren Dichte in den äußeren Zellschichten. Immunhistochemisch konnten wir nachweisen, dass sowohl Monozyten/Makrophagen als auch T-Zellen ohne vorhergehende Aktivierung in die Sphäroide einwanderten. Bei Kokultivierung von Sphäroiden mit unstimulierten PBMCs fanden sich keine Zeichen einer Zerstörung oder eines Vitalitätsverlustes der Tumorzellen. Die Verwendung von PBMCs unterschiedlicher Spender zeigte keine wesentlichen Schwankungen im Infiltrationsverhalten der Leukozyten.

Bezüglich der Versuche mit Zugabe von NSAIDs konnten wir feststellen, dass in Anwesenheit von Indomethacin bzw. Celecoxib fast 50% mehr Immunzellen in die Sphäroide eindringen. Die Verteilung der infiltrierten Zellen war auch in diesen Fällen inhomogen. Die PGE₂-Bestimmung durch ELISA in den zellfreien Überständen der Sphäroide belegte, dass die Infiltration von Immunzellen in Sphäroide durch die Hemmung der Cyclooxygenasen erheblich verbessert wurde.

Die beschriebenen Beobachtungen zeichnen kein getreues Bild der originären *in vivo*-Situation. Die Experimente beschreiben eine allogene Situation, *in vivo* treten jedoch körpereigene Effektorzellen in Kontakt mit den Tumorzellen. Zum anderen beeinflussen *in vivo* eine Vielzahl von lokalen Faktoren die Art des Kontaktes zwischen Tumorzellen und Immunzellen (z.B. extrazelluläre Matrix, lösliche, immunsuppressive Faktoren von Tumor- oder Stromazellen, u.v.m.), die in dem hier beschriebenen *in vitro*-Modell nicht nachgestellt werden können.

Die hier beschriebenen Experimente belegen aber das Modell der TCS als geeignetes System, um die Effekte der Zugabe von NSAIDs zu Immunzellen, die mit TCS kokultiviert werden, in einem dreidimensionalen Kontext zu untersuchen.

Sphäroide sind allgemein resistent gegenüber einer Behandlung mit antitumoralen Substanzen. Die Ergebnisse der Versuche mit NSAIDs belegen, dass die Infiltration der Tumorzell-Sphäroide durch Immunzellen in Anwesenheit von Coxhemmern gesteigert wird. So kann die Voraussetzung formuliert werden, dass eventuell NSAIDs die Resistenz und schlechte Penetrationsfähigkeit, die Sphäroide gewöhnlich aufweisen, verbessern könnten: Wenn in Anwesenheit von NSAIDs mehr Immunzellen in die Sphäroide einwandern, wäre es möglich, dass auch antitumorale

Substanzen, therapeutische Antikörper oder Bestrahlung in Anwesenheit von NSAIDs besser einwirken. Hierzu sind in unserem Labor weiterführende Versuche geplant.

5 Zusammenfassung

Malignome stellen nach wie vor eine der häufigsten Todesursachen in den entwickelten Ländern dar. Es wird zunehmend klar, dass Krebs eine systemische Erkrankung ist, in die auch das Immunsystem des Patienten mit einbezogen ist. So weisen Tumorpatienten in der Regel schwere Immundefizienzen auf, die durch den Tumor selbst verursacht werden. Die Kenntnis von den Mechanismen, durch die Tumore Immunzellen supprimieren, bildet eine Voraussetzung für die Entwicklung von Strategien, dieser Immunsuppression entgegenzuwirken und eine eventuelle Immunrestauration zu erreichen.

Monozyten spielen eine entscheidende Rolle in der Immunabwehr; Der Chemokinrezeptor CCR5, sowie auch der Urokinase-Rezeptor (uPAR) stellen Oberflächenmoleküle dar, die wichtig für die Funktionen der Monozyten sind.

Einer der wichtigsten Mechanismen, durch den Tumore das Immunsystem supprimieren, ist die Sezernierung von Prostaglandin E₂ (PGE₂). Die dadurch induzierten phänotypischen und funktionellen Veränderungen von Monozyten sind Beobachtungen, die im Rahmen dieser Dissertation genauer untersucht wurden: Nach der Inkubation von Monozyten in konditionierten Karzinomzell-Überständen waren sowohl der Chemokinrezeptor CCR5 als auch der Urokinase-Rezeptor (uPAR) in signifikant geringerem Maße auf der Oberfläche vorhanden. Funktioneller Ausdruck dieser Deregulationen war eine verminderte Migrationsfähigkeit in Richtung auf ein Chemokin und ein geringeres Vermögen zum Durchwandern der Zellen durch eine extrazelluläre Matrix. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass Monozyten in ihren Funktionen durch vom Tumor sezerniertes PGE₂ deutlich inhibiert werden.

Die Reduktion der Expression von CCR5 und UPAR und die Beeinträchtigung der Funktionen von Monozyten ließen sich durch Cox-Inhibitoren, die effizient die Bildung von PGE₂ in Tumorzellen blockierten, revertieren: Sowohl Indomethacin als auch Celecoxib reduzierten nämlich signifikant die suppressiven Eigenschaften konditionierter Tumorzell-Überstände. Die gleiche positive Wirkung von Cox-Inhibitoren konnte auch bei Tumorzell-Sphäroiden, die mit Immunzellen kokultiviert wurden, beobachtet werden. So ließ sich die Infiltration von Tumorzell-Sphäroiden durch Immunzellen mittels Cox-Inhibitoren nahezu verdoppeln; ein weiteres Indiz für

eine gesteigerte Aktivität dieser Immunzellen. Die hier beschriebenen Experimente beschreiben das Modell der Tumorzell-Sphäroide als geeignetes System, um die Effekte der Zugabe von Cox-Inhibitoren zu Immunzellen, die mit Tumorzell-Sphäroiden kokultiviert werden, in einem dreidimensionalen Kontext zu untersuchen, der der *in vivo* Situation näher kommt als konventionelle Zellkulturmodelle.

Die beschriebenen *in vitro* Ergebnisse sind hinsichtlich einer adjuvanten Therapie mit Cox-Inhibitoren zur Immunrestauration bei Tumorpatienten ebenso vielversprechend wie auch im Sinne einer Chemoprävention zur Minderung des Krebsrisikos bei Risikopatienten. Über den Weg einer Restauration des supprimierten Immunsystems mittels Cox-Inhibitoren könnte so ein verlängertes tumorfreies Überleben bei bereits therapierten Karzinompatienten im Sinne einer Rezidivprophylaxe erzielt werden.

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
APC	Antigenpräsentierende Zelle
ATCC	American Type Culture Collection
CCR5	Chemokin Rezeptor 5
CEA	carcioembryonic antigen
Cox	Cyclooxygenase
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EBV	Epstein-Barr-Virus
EGF	epidermal growth factor
EpCAM	epidermal cell adhesion molecule
EZM	extrazelluläre Matrix
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
G	Grading
HNO	Hals-Nasen-Ohren-
HPV	humanes Papillomavirus
HRP	Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilo-Dalton
LMP	latent membrane protein
Mac-1	adhesion molecule 1
MCAF	macrophage chemoattractant factor
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	major histocompatibility complex
MIP	macrophage inflammatory protein
mrd	minimal residual disease
MUC	Mucin
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
NSAIDs	Nonsteroidal antiinflammatory drugs

PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PBMCs	periphäre mononukleäre Leukozyten
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PGE2	Prostaglandin E2
R	Residualtumor (R-Faktor)
RANTES	regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted
RT	Raumtemperatur
SCCHN	squamous cell carcinoma of the head and neck (Plattenepithelkarzinome)
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TCR	T-cell receptor
TCS	tumor-cell-spheroids
TGF	tumor growth factor
TIL	tumorinfiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Tumorstadien, T bezieht sich dabei auf die Tumorgröße N auf Lymphknotenbefall und M auf Fernmetastasen
t-PA	tissue-type plasminogen activator
Tu-ÜS (SN)	Tumorzell-Überstand (supernatant)
uPAR	urokinase-type plasminogen activator receptor
VEGF	vascular endothelial growth factor

Literaturverzeichnis

- Altorki, N. K., R. S. Keresztes, et al. (2003). "Celecoxib, a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor, enhances the response to preoperative paclitaxel and carboplatin in early-stage non-small-cell lung cancer." *J Clin Oncol* 21(14): 2645-50.
- Andreasen, P. A., R. Egelund, et al. (2000). "The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis." *Cell Mol Life Sci* 57(1): 25-40.
- Andreasen, P. A., L. Kjoller, et al. (1997). "The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review." *Int J Cancer* 72(1): 1-22.
- Anzano, M. A., D. Rieman, et al. (1989). "Growth factor production by human colon carcinoma cell lines." *Cancer Res* 49(11): 2898-904.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1999). "Apoptosis control by death and decoy receptors." *Curr Opin Cell Biol* 11(2): 255-60.
- Audran, R., L. Dazard, et al. (1994). "Interactions between human macrophages and tumor cells in three-dimensional cultures." *Cancer Immunol Immunother* 39(5): 299-304.
- Baron, J. A. and R. S. Sandler (2000). "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention." *Annu Rev Med* 51: 511-23.
- Bonta, I. L. and S. Ben-Efraim (1993). "Involvement of inflammatory mediators in macrophage antitumor activity." *J Leukoc Biol* 54(6): 613-26.
- Cao, Y. and S. M. Prescott (2002). "Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer." *J Cell Physiol* 190(3): 279-86.
- Castelli, C., L. Rivoltini, et al. (2000). "T-cell recognition of melanoma-associated antigens." *J Cell Physiol* 182(3): 323-31.
- Ceuppens, J. and J. Goodwin (1981). "Prostaglandins and the immune response to cancer (review)." *Anticancer Res* 1(2): 71-8.
- Chandrasekharan, N. V., H. Dai, et al. (2002). "COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(21): 13926-31.
- Chen, Y. T., M. J. Scanlan, et al. (1997). "A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(5): 1914-8.
- Cheung, S. T., S. F. Leung, et al. (1998). "Specific latent membrane protein 1 gene sequences in type 1 and type 2 Epstein-Barr virus from nasopharyngeal carcinoma in Hong Kong." *Int J Cancer* 76(3): 399-406.
- Cornelison, T. L. (2000). "Human papillomavirus genotype 16 vaccines for cervical cancer prophylaxis and treatment." *Curr Opin Oncol* 12(5): 466-73.
- Davis, T. W., J. M. O'Neal, et al. (2004). "Synergy between celecoxib and radiotherapy results from inhibition of cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2, a survival factor for tumor and associated vasculature." *Cancer Res* 64(1): 279-85.
- DeClerck, Y. A., S. Imren, et al. (1997). "Proteases and protease inhibitors in tumor progression." *Adv Exp Med Biol* 425: 89-97.
- Ding, X. Z., W. G. Tong, et al. (2001). "Cyclooxygenases and lipoxygenases as potential targets for treatment of pancreatic cancer." *Pancreatol* 1(4): 291-9.
- DuBois, R. N., J. Shao, et al. (1996). "G1 delay in cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2." *Cancer Res* 56: 733-737.
- DuBois, R. N., M. Tsujii, et al. (1994). "Cloning and characterization of a growth factor-inducible cyclooxygenase gene from rat intestinal epithelial cells." *Am J Physiol* 266: G822-7.

- Eibl, G., D. Bruemmer, et al. (2003). "PGE(2) is generated by specific COX-2 activity and increases VEGF production in COX-2-expressing human pancreatic cancer cells." Biochem Biophys Res Commun 306(4): 887-97.
- Essand, M., C. Gronvik, et al. (1995). "Radioimmunotherapy of prostatic adenocarcinomas: effects of 131I-labelled E4 antibodies on cells at different depth in DU 145 spheroids." Int J Cancer 63(3): 387-94.
- Fosslien, E. (2001). "Review: molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancer-induced angiogenesis." Ann Clin Lab Sci 31(4): 325-48.
- Funkhouser, E. M. and G. B. Sharp (1995). "Aspirin and reduced risk of esophageal carcinoma." Cancer 76(7): 1116-9.
- Gately, S. (2000). "The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis." Cancer Metastasis Rev 19(1-2): 19-27.
- Gath, H. J. and R. H. Brakenhoff (1999). "Minimal residual disease in head and neck cancer." Cancer Metastasis Rev 18(1): 109-26.
- Gilboa, E. (1999). "How tumors escape immune destruction and what we can do about it." Cancer Immunol Immunother 48(7): 382-5.
- Grosch, S., I. Tegeder, et al. (2001). "COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib." Faseb J 15(14): 2742-4.
- Gruss, H. J., M. A. Brach, et al. (1992). "Expression of cytokine genes, cytokine receptor genes, and transcription factors in cultured Hodgkin and Reed-Sternberg cells." Cancer Res 52(12): 3353-60.
- Gupta, R. A. and R. N. Dubois (2001). "Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2." Nat Rev Cancer 1(1): 11-21.
- Haas, I. and P. Koldovsky (1996). "[Expression of cellular antigen of hypopharyngeal carcinoma in different culture conditions]." Laryngorhinootologie 75(9): 543-7.
- Harizi, H., M. Juzan, et al. (2002). "Cyclooxygenase-2-induced prostaglandin e(2) enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions." J Immunol 168(5): 2255-63.
- Harris, R. E., J. Beebe-Donk, et al. (2002). "Chemoprevention of lung cancer by non-steroidal anti-inflammatory drugs among cigarette smokers." Oncol Rep 9(4): 693-5.
- He, T. C., T. A. Chan, et al. (1999). "PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs." Cell 99(3): 335-45.
- Hicklin, D. J., T. Kageshita, et al. (1996). "Development and characterization of rabbit antisera to human MHC-linked transporters associated with antigen processing." Tissue Antigens 48(1): 38-46.
- Howe, L. R. and A. J. Dannenberg (2002). "A role for cyclooxygenase-2 inhibitors in the prevention and treatment of cancer." Semin Oncol 29(3 Suppl 11): 111-9.
- Hussey, D. H., H. B. Latourette, et al. (1991). "Head and neck cancer: an analysis of the incidence, patterns of treatment, and survival at the University of Iowa." Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl 152: 2-16.
- Janeway, C. A., Jr. and K. Bottomly (1994). "Signals and signs for lymphocyte responses." Cell 76(2): 275-85.
- Kalinski, P., C. M. Hilkens, et al. (1997). "IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells." J Immunol 159: 28-35.
- Kastenbauer, E. and B. Wollenberg (1999). "[In search of new treatment methods for head-neck carcinoma]." Laryngorhinootologie 78(1): 31-5.

- Kwok, C. S., S. E. Cole, et al. (1988). "Uptake kinetics of monoclonal antibodies by human malignant melanoma multicell spheroids." Cancer Res 48(7): 1856-63.
- Lang, S., L. Lauffer, et al. (2003). "Impaired monocyte function in cancer patients: restoration with a cyclooxygenase-2 inhibitor." Faseb J 17: 286-288.
- Lang, S., T. L. Whiteside, et al. (1999). "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(1): 82-8.
- Lang, S., B. Wollenberg, et al. (2002). "Clinical and epidemiological data of patients with malignomas of the head and neck." Laryngorhinootology 81: 499-508.
- Lee, C. A. and O. Smithies (1995). "Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse." Cell 83: 473-482.
- Lin, D. T., K. Subbaramaiah, et al. (2002). "Cyclooxygenase-2: a novel molecular target for the prevention and treatment of head and neck cancer." Head Neck 24(8): 792-9.
- Lin, E. Y., A. V. Nguyen, et al. (2001). "Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy." J Exp Med 193(6): 727-40.
- Lin, T. Z., H. Fernandes, et al. (1992). "IL-10 production in a CD5+ B cell lymphoma arising in a CD4 monoclonal antibody-treated SJL mouse." Clin Immunol Immunopathol 65(1): 10-22.
- Linard, B., S. Bezieau, et al. (2002). "A ras-mutated peptide targeted by CTL infiltrating a human melanoma lesion." J Immunol 168(9): 4802-8.
- Lipponen, P. K., M. J. Eskelinen, et al. (1992). "Tumour infiltrating lymphocytes as an independent prognostic factor in transitional cell bladder cancer." Eur J Cancer 29A(1): 69-75.
- Litvinov, S. V., W. van Driel, et al. (1996). "Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation." Am J Pathol 148(3): 865-75.
- Liu, C. H., S. H. Chang, et al. (2001). "Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice." J Biol Chem 276(21): 18563-9.
- Maeurer, M. J., S. M. Gollin, et al. (1996). "Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen." J Clin Invest 98(7): 1633-41.
- Mandruzzato, S., F. Brasseur, et al. (1997). "A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma." J Exp Med 186(5): 785-93.
- Marrogi, A. J., A. Munshi, et al. (1997). "Study of tumor infiltrating lymphocytes and transforming growth factor-beta as prognostic factors in breast carcinoma." Int J Cancer 74(5): 492-501.
- Masferrer, J. L., A. Koki, et al. (1999). "COX-2 inhibitors. A new class of antiangiogenic agents." Ann N Y Acad Sci 889: 84-6.
- Maudsley, D. J. and J. D. Pound (1991). "Modulation of MHC antigen expression by viruses and oncogenes." Immunol Today 12(12): 429-31.
- Moers, C., U. Warskulat, et al. (1999). "Regulation of CD95 (Apo-1/Fas) ligand and receptor expression in squamous-cell carcinoma by interferon-gamma and cisplatin." Int J Cancer 80(4): 564-72.
- Naito, Y., K. Saito, et al. (1998). "CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer." Cancer Res 58(16): 3491-4.
- Nakano, T., K. Oka, et al. (1992). "Roles of Langerhans' cells and T-lymphocytes infiltrating cancer tissues in patients treated by radiation therapy for cervical cancer." Cancer 70(12): 2839-44.

- Natali, P. G., P. Giacomini, et al. (1983). "Heterogeneity in the expression of HLA and tumor-associated antigens by surgically removed and cultured breast carcinoma cells." Cancer Res 43(2): 660-8.
- Nozaki, S., Y. Endo, et al. (1998). "Immunohistochemical localization of a urokinase-type plasminogen activator system in squamous cell carcinoma of the oral cavity: association with mode of invasion and lymph node metastasis." Oral Oncol 34(1): 58-62.
- O'Byrne, K. J. and A. G. Dalglish (2001). "Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy." Br J Cancer 85(4): 473-83.
- Palayoor, S. T., E. A. Bump, et al. (1998). "Combined antitumor effect of radiation and ibuprofen in human prostate carcinoma cells." Clin Cancer Res 4: 763-71.
- Partridge, M., M. R. Green, et al. (1989). "Production of TGF-alpha and TGF-beta by cultured keratinocytes, skin and oral squamous cell carcinomas--potential autocrine regulation of normal and malignant epithelial cell proliferation." Br J Cancer 60(4): 542-8.
- Plescia, O. J., K. Grinwich, et al. (1976). "Subversive activity of syngeneic tumor cells as an escape mechanism from immune surveillance and the role of prostaglandins." Ann N Y Acad Sci 276: 455-65.
- Ploegh, H. and C. Watts (1998). "Antigen recognition." Curr Opin Immunol 10(1): 57-8.
- Radoja, S. and A. B. Frey (2000). "Cancer-induced defective cytotoxic T lymphocyte effector function: another mechanism how antigenic tumors escape immune-mediated killing." Mol Med 6(6): 465-79.
- Rozic, J. G., C. Chakraborty, et al. (2001). "Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis." Int J Cancer 93(4): 497-506.
- Santini, M. T., G. Rainaldi, et al. (1999). "Multicellular tumour spheroids in radiation biology." Int J Radiat Biol 75(7): 787-99.
- Skopinska-Rozewska, E., G. A. Piazza, et al. (1998). "Inhibition of angiogenesis by sulindac and its sulfone metabolite (FGN-1): a potential mechanism for their antineoplastic properties." Int J Tissue React 20(3): 85-9.
- Stumm, G., S. Eberwein, et al. (1996). "Concomitant overexpression of the EGFR and erbB-2 genes in renal cell carcinoma (RCC) is correlated with dedifferentiation and metastasis." Int J Cancer 69(1): 17-22.
- Sutherland, R. M. (1988). "Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model." Science 240(4849): 177-84.
- Taylor-Papadimitriou, J., J. Burchell, et al. (1999). "MUC1 and cancer." Biochim Biophys Acta 1455(2-3): 301-13.
- Tsujii, M. and R. N. DuBois (1995). "Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2." Cell 83: 493-501.
- Tsujii, M., S. Kawano, et al. (1997). "Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential." Proc Natl Acad Sci U S A 94: 3336-3340.
- Tsujii, M., S. Kawano, et al. (1998). "Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells." Cell 93: 705-716.
- Tucker, O. N., A. J. Dannenberg, et al. (1999). "Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer." Cancer Res 59(5): 987-90.
- Vesalainen, S., P. Lipponen, et al. (1994). "Histological grade, perineural infiltration, tumour-infiltrating lymphocytes and apoptosis as determinants of long-term prognosis in prostatic adenocarcinoma." Eur J Cancer 30A(12): 1797-803.

- Vonderheide, R. H., W. C. Hahn, et al. (1999). "The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes." Immunity 10(6): 673-9.
- Waleh, N. S., J. Gallo, et al. (1994). "Selective down-regulation of integrin receptors in spheroids of squamous cell carcinoma." Cancer Res 54(3): 838-43.
- Whiteside, T. L. (1999). "Signaling defects in T lymphocytes of patients with malignancy." Cancer Immunol Immunother 48(7): 346-52.
- Wollenberg, B., A. Ollesch, et al. (1994). "[Micrometastases in bone marrow of patients with cancers in the head and neck area]." Laryngorhinootologie 73(2): 88-93.
- Zeidler, R., M. Csanady, et al. (2000). "Tumor-derived Prostaglandin E2 inhibits monocyte function by interfering with their chemotactic and adhesive potential." FASEB Journal 14: 661-668.
- Zhang, X., S. G. Morham, et al. (1999). "Malignant transformation and antineoplastic actions of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) on cyclooxygenase-null embryo fibroblasts." J Exp Med 190(4): 451-59.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei all denen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn PD Dr. med. Stephan Lang und Herrn PD Dr. rer. nat. Reinhard Zeidler danke ich für die umfassende Unterstützung dieser Arbeit, für die Wahl des interessanten Themas und für motivierende und konstruktive Diskussionen.

Frau Dr. Tanja Hofmann danke ich für vielfältigste Unterstützung und Geduld, die hierfür notwendig war. Mein Dank geht auch an Herrn Dr. rer. nat. Olivier Gires für dessen freundliche Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Brigitte Mack und Frau Bärbel Schmitt für ihre aufopfernde Mitarbeit und fröhliche Geduld. Ohne ihre Unterstützung wäre die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Dank auch an all die übrigen Mitarbeiter im HNO-Forschungslabor: Herrn C. Kieu, Herrn Dr. M. Münz, Herrn J. Rauch, Herrn Dr. A. Moosmann, Frau T. Schaffrik, Herrn M. Benk und Herrn M. Ahlemann. Durch sie war das Arbeiten in einer diskussionsfreudigen, positiven Atmosphäre möglich.

Ein besonderes Dankeschön gilt meinem Ehemann, Nicolae-Virgil Eftimescu, der mich computertechnisch mit viel Geduld begleitet und unterstützt hat.

Lebenslauf

Name	Eftimescu, geb. Picu, Adriana
Anschrift	Turfstr.14, 81929 München Tel.089/3519948
Geburtsdatum	16.06.1968
Geburtsort	Timisoara/Rumänien
Staatsangehörigkeit	Rumänisch
1974-1978	Grundschule in Resita/Rumänien
1978-1986	„Nikolaus Lenau“ Gymnasium Timisoara/Rumänien
06/1986	Abitur in deutscher Sprache am „Nikolaus Lenau Gymnasium Timisoara
1986-1992	Medizinstudium an der Medizinischen Universität Timisoara (Abschlussprüfung mit dem Zeugnis 9,98 von 10)
09/1992	Diplom zum Doktor de Medizin an der Medizinischen Universität Timisoara
1992-1993	Arzt im Praktikum in der Abteilung für Chirurgie, Städtisches Krankenhaus, Timisoara
1993-1998	Assistenzärztin an der HNO-Uniklinik Timisoara, Facharztausbildung
10/1998	Prüfung zum HNO-Facharzt, Zeugnis 9,11 (von 10)
1998-2002	HNO-Fachärztin an der HNO-Uniklinik Timisoara
10/2002-09/2003	Promotionsstudium an der Ludwig-Maximilians- Universität München, Abteilung HNO-Forschung der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde