

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

Direktorin: Prof. Dr. med. B. Wollenberg

**Erhöhte Anzahl regulatorischer T-Zellen in Patienten mit
Kopf-Hals-Tumoren mit einer permanenten Veränderung
des Immunsystems mit nur minimaler Erholungsrate**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
ANNE KATHRIN SCHOTT
aus Olpe
2010

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

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. phil Uwe Roblick

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 30.01.2012

Die selbstständige Anfertigung versichere ich an Eides statt.

Hamburg, den _____
(Datum) (Anne Kathrin Schott)

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....8

1 Einleitung

1.1.	<i>Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC)</i>	10
1.1.1.	Epidemiologie und Risikofaktoren.....	10
1.1.2.	Einteilung nach Lokalisation, Ausdehnung (TNM-System) und histologischem Differenzierungsgrad.....	12
1.1.3.	Diagnose und Therapie der Kopf-Hals-Karzinome.....	14
1.1.4.	Prognose und Nachsorge der Kopf-Hals-Karzinome.....	15
1.2.	<i>Tumor-assoziierte Antigene und `Immune escape`</i>	17
1.2.1.	Tumor-assoziierte Antigene.....	17
1.2.2.	Immunabwehr und `Tumor – Immune escape`.....	18
1.2.2.1.	Verminderte bzw. fehlende Erkennung.....	19
1.2.2.2.	Direkte Suppression des Immunsystems durch den Tumor.....	20
1.2.2.3.	Indirekte Suppression des Immunsystems durch Suppressorzellen.....	21
1.3.	<i>Regulatorische T-Zellen (Treg)</i>	22
1.3.1.	Natürliche Treg und weitere Subtypen.....	23
1.3.2.	Erläuterung der Rezeptoren.....	26
1.3.3.	Suppressionsmechanismen.....	30
1.3.4.	Regulatorische T-Zellen in der Tumorummunologie.....	32
1.4.	<i>Fragestellung dieser Arbeit</i>	33

2 Material und Methoden.....35

2.1.	<i>Material</i>	35
2.1.1.	Blutproben.....	35
2.2.	<i>Methoden</i>	40
2.2.1.	Zellkulturarbeiten.....	40
2.2.1.1.	Auftauen von eingefrorenen Zellen.....	40

2.2.1.2.	Anzucht und Kultivierung der Zellen.....	40
2.2.1.3.	Bestimmung der Zellzahl.....	42
2.2.2.	Zellisolierung.....	42
2.2.2.1.	Ficoll Hypaque-Gradientenzentrifugation.....	42
2.2.2.2.	Isolierung von PBMCs aus „buffy coats“ gesunder Spender.....	44
2.2.2.3.	Isolierung von PBMCs aus peripherem Blut von HNSCC Tumorpatienten.....	45
2.2.3.	Durchflusszytometrische Messungen (FACS).....	46
2.2.3.1.	Aufbau und Prinzip des Durchflusszytometers.....	46
2.2.3.2.	Vorbereitung und Messung der Proben.....	48
2.2.3.3.	Auswertung der Proben.....	50
2.2.4.	Inkubation von HNSCC-Zelllinien mit Interferon-gamma und Messung der CCL22-Produktion der HNSCC im FACS.....	52
2.2.5.	Western Blot-Analyse.....	54
2.2.5.1.	Proteinpräparation aus Zellen.....	54
2.2.5.2.	Proteinpräparation aus Gewebe.....	55
2.2.5.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	55
2.2.5.4.	Protein-Transfer mit Semi-Dry-Verfahren.....	56
2.2.5.5.	Nachweis von Proteinen durch Antikörper.....	57
2.2.6.	Quantitative Bestimmung von CCL22 mittels ELISA.....	58
2.2.6.1.	Vorbereitung und Messung der Proben.....	58
2.2.6.2.	Auswertung der Messungen.....	59
2.2.7.	Statistische Auswertung der beobachteten Ergebnisse.....	60
3	Ergebnisse.....	61
3.1.	<i>Treg Zellen - Analyse der Population innerhalb der PBMCs.....</i>	<i>61</i>
3.1.1.	Definition (Gating-Strategie) von regulatorischen T-Zellen (CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low}) durch die α-Kette des IL-7 Rezeptors (CD127).....	61
3.1.2.	Erhöhte Anzahl regulatorischer T-Zellen (CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low}) in Patienten mit HNSCC.....	63
3.1.3.	Keine Korrelation zwischen der Treg-Anzahl und den Tumorstadien.....	66
3.1.4.	Phänotypische Analyse von CD4 ⁺ T-Zell Subpopulationen.....	67

3.1.4.1.	Expressionsanalyse der Treg-Marker bei HNSCC-Patienten.....	68
3.1.4.2.	Treg-Marker auf HNSCC-Zelllinien.....	71
3.1.5.	Dauerhafte Veränderung und Beeinflussung des Immunsystems durch HNSCC.....	73
3.2.	<i>Bedeutung von CCL22 in HNSCC-Patienten.....</i>	<i>74</i>
3.2.1.	HNSCC produzieren das Chemokin CCL22.....	74
3.2.1.1.	Nachweis von CCL22-Produktion bzw. Expression mittels Durchflusszytometrie.....	75
3.2.2.	Nachweis von CCL22-Produktion bzw. Expression mittels Western-Blot.....	77
3.3.	<i>Einfluss von IFN-γ auf die CCL22-Produktion durch HNSCC.....</i>	<i>78</i>
3.4.	<i>Serumkonzentrationen des Chemokins CCL22 in HNSCC-Patienten.....</i>	<i>80</i>
3.5.	<i>Überblick über die Ergebnisse.....</i>	<i>83</i>
4	Diskussion.....	84
4.1.	<i>Bedeutung regulatorischer T-Zellen in Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren (HNSCC).....</i>	<i>84</i>
4.2.	<i>Phänotyp regulatorischer T-Zellen.....</i>	<i>88</i>
4.3.	<i>Langfristiger Einfluss des Immunsystems durch HNSCC.....</i>	<i>89</i>
4.4.	<i>Herkunft regulatorischer T-Zellen.....</i>	<i>91</i>
4.5.	<i>CCL22 – ein wichtiges Chemokin in HNSCC.....</i>	<i>92</i>
4.6.	<i>IFN-γ – eine mögliche Therapiestrategie.....</i>	<i>96</i>
4.7.	<i>Treg Charakteristika in HNSCC.....</i>	<i>97</i>
4.8.	<i>Ausblick.....</i>	<i>99</i>
5	Zusammenfassung.....	101
6	Literaturverzeichnis.....	103
7	Anhang.....	119
8	Danksagungen.....	131
9	Curriculum vitae.....	132
10	Publikationen und Präsentationen.....	133

Abkürzungsverzeichnis

Die geläufigen Maßeinheiten und Abkürzungen werden als bekannt vorausgesetzt.

AK	Antikörper
AKZ	aktiver Krankheitszustand
APC	Antigen präsentierende Zelle
bds.	beidseits
Ca.	Karzinom
CCL	Chemokine (C-C motif) ligand
CCR	Chemokine (C-C motif) receptor
CD	Cluster of differentiation: Oberflächenantigen
CTLA-4	CD152; cytotoxic T lymphocyte-associated protein-4
DC	Dendritische Zelle
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EBV	Epstein-Barr-Virus
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS / FKS	Fetales Kälberserum
FOXP3	Transkriptionsfaktor Forkhead Box P3
FSC	Forward scatter
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GITR	Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor
HLA = MHC	human leucocyte antigen = humaner Haupthisto- kompatibilitätskomplex
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HPV	Humanes Papillom Virus
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KNT	kein Nachweis eines Tumorrezidivs

MACS	Magnetic cell sorting
MDC	Macrophage-Derived Chemokine, CCL22
MFI	Mean Fluorescence Intensity
ND	Neck-dissection
NK	Natürliche Killerzellen
NKT	Natürlichen Killer T-Zellen
OP	Operation
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	phosphate-buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung; Dulbeccos Phosphate Buffer
PE-Cy7	R-phycoerythrin (PE), cyanine dye Cy
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
R-PE	R-Phycoerythrin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Sideward scatter
TAA	Tumorantigene, Tumor-associated antigen
TCR	T-Zellrezeptor
TGF	Tumor growth factor
TIL	Tumor–infiltrierende Lymphozyten
TLR	Toll-like Rezeptor
Treg	Regulatorische T-Zellen
UICC	Union internationale contre le cancer
Z.n.	Zustand nach

Weitere Abkürzungen sind an gegebener Stelle im Text erklärt.

1 Einleitung

1.1 Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC)

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Im Kopf-Hals-Bereich vorkommende maligne Tumoren rangieren weltweit unter den am häufigsten auftretenden Malignomen an sechster Stelle in der Tumorstatistik (Parker *et al.*, 1996; Parkin *et al.*, 1999; Chin *et al.*, 2006; St John *et al.*, 2006). Bei etwa 600.000 jährlich diagnostizierten Neuerkrankungen und 350.000 Todesfällen weltweit (Parkin *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2008; Chung und Gillison, 2009; Ku und Crowe, 2009) lässt sich in der Bundesrepublik Deutschland eine eindeutige Zunahme der Inzidenz und Mortalität statistisch belegen (Bertz, 2006). Unter den verschiedenen Tumorentitäten im Kopf-Hals-Bereich überwiegen die Plattenepithelkarzinome (HNSCC, *Head and neck squamous cell carcinoma*) mit zirka 90 % (Ferlito *et al.*, 1995; Wang und Agulnik, 2008). Das durchschnittliche Manifestationsalter beträgt 60 +/- 15 Jahre, wobei Männer zurzeit noch dreimal so häufig betroffen sind wie Frauen (Lewin *et al.*, 1998; Sankaranarayanan *et al.*, 1998; Parkin *et al.*, 1999; Pisani *et al.*, 1999). Allerdings lässt sich in den letzten Jahren ein deutlicher Anstieg des Frauenanteils beobachten.

In Hinblick auf die Ätiologie sind die HNSCC-Tumoren durch ein multifaktorielles Geschehen bedingt. Neben genetischen (Copper *et al.*, 1995; Foulkes *et al.*, 1996; Chin *et al.*, 2004) gelten vor allem exogene Faktoren als Risikofaktoren für die Entwicklung von HNSCC-Tumoren, insbesondere bei Tumoren des Oropharynx, des Hypopharynx und des Larynx. Als exogene Hauptrisikofaktoren werden übermäßiger Nikotin-, und Alkoholkonsum angesehen (Moore, 1971; Luce *et al.*, 1988; Parker *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 1997; Lewin *et al.*, 1998; Sankaranarayanan *et al.*, 1998; Wiseman *et al.*, 2003; Wrangle und Khuri, 2007; Chung und Gillison, 2009; Leon *et al.*, 2009; Tryggvason *et al.*, 2009), die als Karzinogene durch einen

mehrstufigen Prozess von Mutationen und genetischen Fehlern zu einer malignen Veränderung der Schleimhaut führen. Raucher erkranken bis zu sechsmal häufiger an Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches als Nichtraucher. Alkoholkonsum (50 Gramm oder mehr pro Tag) potenziert die toxische Wirkung des Rauchens (Lewin *et al.*, 1998) über eine Schwächung der plattenepithelialen Barrieren der Schleimhaut, was eine Aufnahme von Karzinogenen erleichtert (Seitz und Simanowski, 1988). Für bestimmte Tumorlokalisationen, wie zum Beispiel innere Nase und Kehlkopf, werden inhalative, karzinogene Noxen - wie Holz- und Metallstäube, Asbest sowie chrom- und nickelhaltige Farben und Lacke - als Risikofaktoren diskutiert. Zudem werden Gene, vor allem sogenannte Tumorsuppressorgene wie Zyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren, Tumorsuppressorgen p53, Retinoblastoma Protein RB1 und Onkogene wie Epidermal growth factor receptor (EGFR) und ras Onkogen in Verbindung mit der Karzinogenese gebracht (Bagan und Scully, 2008). Des Weiteren entwickeln sich ungefähr 15 % der HNSCC-Tumoren im Zusammenhang mit einer viralen Infektion. Als beteiligte Viren werden vor allem Humane Papillom Viren (HPV) und Epstein-Barr-Viren (EBV) in Betracht gezogen. Humane Papillom Viren, insbesondere die HPV-Hochrisiko-Typen 16 und 18, werden mit 25 % der HNSCC-Tumoren – vor allem bei Tumoren der Tonsillen und des Oropharynx - bei jungen Patienten bzw. Patienten, die nicht die klassischen Risikofaktoren (Rauchen und Alkohol) aufweisen, in Verbindung gebracht (Kreimer *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2007; Psyrrri und DiMaio, 2008; Chung und Gillison, 2009; Gillespie *et al.*, 2009; Neufcoeur *et al.*, 2009; Psyrrri *et al.*, 2009; Vu *et al.*, 2009). Das Nasenrachenkarzinom ist hingegen mit dem Epstein-Barr-Virus assoziiert (Henle *et al.*, 1970; Kamel *et al.*, 2003; Chou *et al.*, 2008; Yoshizaki *et al.*, 2008). Außerdem werden die Vernachlässigung der Mundhygiene, chronische Entzündungen und Ernährungsfaktoren, wie zum Beispiel das Essen von Betelnüssen (Argiris *et al.*, 2008) und Ernährungsdefizite in Form von Vitamin-A und Vitamin-C-Mangel als begünstigende Faktoren gewertet. Inwiefern karotinreiches Gemüse und Zitrusfrüchte einen protektiven Charakter in Bezug auf die Karzinomentstehung aufweisen, wird noch diskutiert (Vokes *et al.*, 1993; Cartmel *et al.*, 2005; Saba *et al.*, 2007; Wright *et al.*, 2007).

1.1.2 Einteilung nach Lokalisation, Ausdehnung (TNM-System) und histologischem Differenzierungsgrad

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches sind von den Epithelien der Haut oder Schleimhäute ausgehende verhornende oder nicht-verhornende Karzinome, die sich mit Hilfe verschiedener Kriterien einteilen und klassifizieren lassen.

Nach der Lokalisation des Primärtumors differenziert man zwischen Tumoren der Mundhöhle, der Nasenhaupt- und Nebenhöhlen, des Rachens (Naso-, Oro- und Hypopharynx) und des Larynx (*Abb. 1.1*).

Des Weiteren treten HNSCC-Tumoren im Kopf-Halsbereich als Tumoren der Kopfdrüsen (Speicheldrüsen (Parotis, Submandibularis, Sublingualis), des Gesichts und der Haut auf.

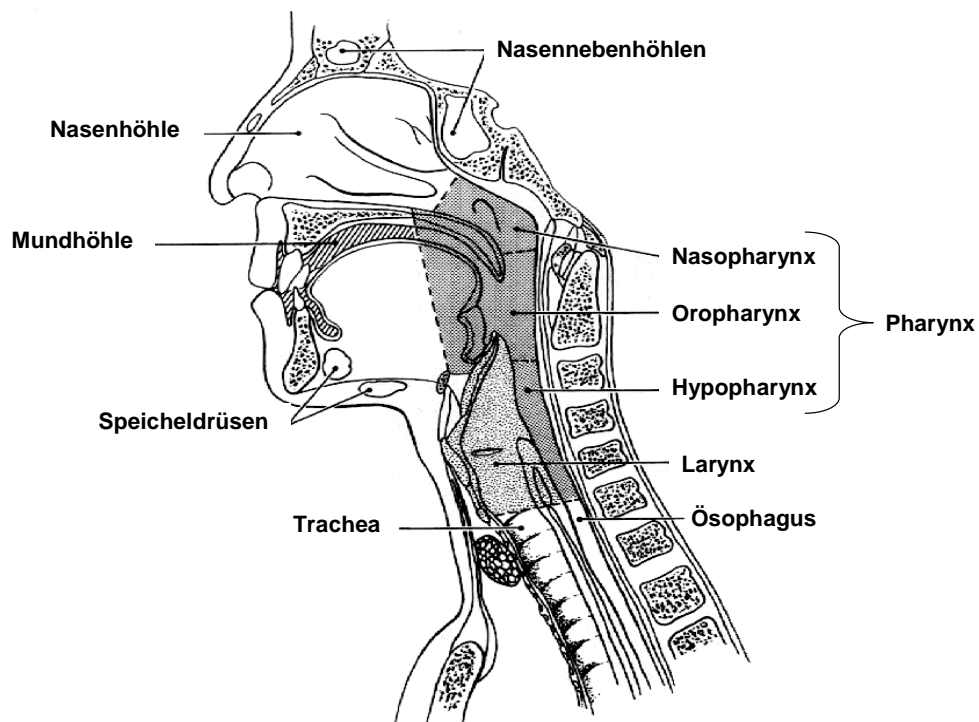


Abb. 1-1: Anatomie des Kopf-Hals-Bereichs

Quelle: Vokes et al, 1993 (*Vokes et al.*, 1993)

HNSCC-Malignome entwickeln sich vorwiegend über eine Reihe klinisch und histopathologisch definierter Stadien, von normalem Epithel zu Dysplasien wie der Leukoplakie, über das Carcinoma in situ (Cis) zum invasiven Karzinom mit der Potenz zur Metastaseninduktion (Chin *et al.*, 2004). Das Auftreten von Metastasen hat Einfluss auf die Einteilung der Hals-Kopf-Tumoren. Kopf-Hals-Karzinome streuen zunächst bevorzugt über Lymphwege (lymphogen) in Halslymphknoten, hingegen ist das Vorkommen von Fernmetastasen in andere Organe seltener und ist meist erst bei weit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen zu beobachten. Treten Fernmetastasen eines HNSCC-Primärtumors jedoch auf, so befinden sie sich meist in Lunge (Jones *et al.*, 1995), mediastinalen Lymphknoten und Knochen, weniger in Leber und Gehirn (Vokes *et al.*, 1993; Chin *et al.*, 2006). Die Inzidenz von Halslymphknotenmetastasen in HNSCC variiert von 30% bis 70%, hauptsächlich abhängig vom Primärtumor und dem T-Stadium (Ausdehnung des Primärtumors) (Bataini *et al.*, 1985; Greenberg *et al.*, 2003).

Die Klassifikation der Tumorstadien zum Zeitpunkt der Diagnosestellung erfolgt nach dem international anerkannten *TNM-System* der UICC (*Union International Contre Cancer*) und beschreibt die Größe des Primärtumors (zunehmend von *T1* bis *T4*), das Ausmaß der lymphogenen Metastasierung (zunehmend von *N0* bis *N3*) und das Auftreten von Fernmetastasen (*M0* oder *M1*). Anhand der *TNM-Klassifikation* hat die UICC eine vierstufige Stadieneinteilung zur Übersicht über die Schweregrade der Tumorstadien abgeleitet. Diese Einteilung hat prognostische Bedeutung.

Tab. 1-1: UICC-Stadieneinteilung bei HNSCC

Stadien 0 - II gelten als frühe Tumorstadien. Stadien III und IV werden als fortgeschrittene Tumorstadien bezeichnet und finden sich in der *TNM-Klassifikation* in T3-4 N1-3 (N+) wieder.

Cis = Carcinoma in situ

UICC	TNM-Klassifikation	Tumorprogression
0	Cis N0 M0	Frühe Tumorstadien
I	T1 N0 M0	
II	T2 N0 M0	
III	T3 N0 M0 oder T1-3 N1 M0	Fortgeschrittene Tumorstadien
IV	T4 N0-1 M0 Jedes T N2-3 M0 Jedes T Jedes N M1	

Postoperativ kann durch die bei einem chirurgischen Eingriff und der histopathologischen Untersuchung gewonnenen Erkenntnisse eine Sicherung der histopathologischen Klassifikation (*pTNM-Klassifikation*) unter Ergänzung oder

Abänderung der prätherapeutischen *TNM*-Klassifikation erfolgen. Zudem wird mit dem *R-Faktor* das Fehlen oder Vorhandensein von einem Residualtumor (Resttumor) nach einer Operation beschrieben.

Tab. 1-2: Residualtumorklassifikation

R-Faktor	Fehlen/Vorhandensein eines Residualtumors
RX	Vorhandensein von Residualtumor kann nicht beurteilt werden
R0	kein Residualtumor
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor

Als weitere Beurteilung des Tumors wird postoperativ der Grad der Tumordifferenzierung histopathologisch beschrieben. Der Differenzierungsgrad gibt den Umfang der Veränderung im Tumorgewebe im Vergleich zum normalen Gewebe an und erlaubt eine gewisse Aussage über den Malignitätsgrad des Tumors (*Grading*).

Tab. 1-3 Malignitätsgrad des Tumors (Grading)

Malignitätsgrad des Tumors (Grading, G):	
G1	gut oder hochgradig differenziert
G2	mäßig differenziert
G3	schlecht differenziert
G4	un- oder entdifferenziert
GX	Bestimmung des Differenzierungsgrad nicht möglich

1.1.3 Diagnose und Therapie der Kopf-Hals-Karzinome

Bei der Diagnose von Kopf-Hals-Tumoren ist ein stufenhaftes Vorgehen sinnvoll. Neben Anamnese, klinischer Untersuchung und evtl. Biopsieentnahme umfasst die präoperative Diagnostik von HNSCC die Beurteilung des Primärtumors mittels Computertomographie (CT) und/oder Magnetresonanztomographie (MRT), je nach Fragestellung. Zum prätherapeutischen Staging zählen ebenfalls die Darstellung der regionären Metastasierungswege mittels Sonographie und weiterhin der Nachweis bzw. Ausschluss einer Fernmetastasierung. Es ist stets an das Auftreten von Zweitkarzinomen (Slaughter *et al.*, 1953; Brandau und Glanz, 1989; Jones *et al.*, 1995), die eine Besonderheit bei Patienten mit Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches darstellen, im oberen Aerodigestivtrakt zu denken, weshalb

eine Spiegeluntersuchung oder Panendoskopie dieser Regionen in den meisten Fällen empfehlenswert ist.

Als anerkannte Bestandteile der Therapie von Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes gelten heute die Operation, Radiotherapie und zytostatische Chemotherapie, sowie deren Kombinationen (Chin *et al.*, 2006) (vgl. AWMF 1999). Immunologische Therapieverfahren, die gegen Tumorzellen gerichtete Immunreaktionen auslösen oder verstärken, werden als komplementäre Strategie zur Verbesserung und Unterstützung der konventionellen Standardtherapie von HNSCC-Tumoren diskutiert. Es gibt Ansätze, die darauf hoffen lassen, dass diese immunmodulatorischen Methoden in Zukunft Teil der Therapie von HNSCC sein werden (Liu *et al.*, 2002; Rapidis und Wolf, 2009), aber bisher hat noch keiner dieser Therapieansätze die hohen Erwartungen erfüllt. HNSCC stellen eine extrem heterogene maligne Erkrankung dar, die die Entwicklung geeigneter Immuntherapien sehr erschwert. Daher ist es nach wie vor von großer Wichtigkeit, die Eigenschaften der auftretenden Tumore und deren Interaktionen mit dem Immunsystem des Tumorwirtes noch umfassender zu verstehen.

1.1.4 Prognose und Nachsorge der Kopf-Hals-Karzinome

Die Überlebensraten für Karzinome des Kopf-Hals-Bereichs haben sich in den letzten Jahrzehnten trotz großer Fortschritte in allen drei Therapiemodalitäten nicht signifikant verbessert. Die 5-Jahres-Überlebensrate variiert je nach Sitz des Primärtumors und Stadiums von > 90 % bis zu ca. 56 %. Patienten mit einem bereits lokal oder regionär fortgeschrittenen Tumor (*Stadium III oder IV*) haben eine deutlich schlechtere Prognose als Patienten mit einem früheren Tumorstadium; weniger als 30 % dieser Patienten werden geheilt (Vokes *et al.*, 1993).

Die Prognose für HNSCC-Tumoren ist neben dem Tumorstadium des Primärtumors, dem histopathologischen Differenzierungsgrad (Wollenberg *et al.*, 2004; Cojocariu *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009) und dem Auftreten von Rezidiven bzw. Zweitumoren abhängig von Faktoren wie:

◆ *der anatomischen Lokalisation:*

Larynxkarzinome haben die beste Prognose (Lang *et al.*, 2002; Scully und Bagan, 2008), da sie sich durch eine frühe klinische Symptomatik mit persistierender Heiserkeit bemerkbar machen. Der spärliche Lymphabfluss und die damit verbundene niedrigere Metastasierungstendenz tragen ebenso zu der guten Prognose bei. Das Hypopharynxkarzinom mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von unter 30 % weist hingegen die schlechteste Prognose (Grau *et al.*, 1997) unter den HNSCC-Primärtumoren auf.

◆ *dem Vorhandensein und der Anzahl von lokoregionären Lymphknotenmetastasen (Nx-N3):*

Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits regionäre Lymphknotenmetastasen aufweisen, besitzen ein erhöhtes Risiko, nach Abschluss der Primärtherapie an einem Rezidiv zu erkranken (Berlinger *et al.*, 1976), was auf etwa zwei Dritteln der Patienten mit der Erstdiagnose HNSCC zutrifft (Remmert *et al.*, 2001). Laut Remmert (Remmert *et al.*, 2001) nimmt mit zunehmendem Tumorstadium des Primärtumors und mit Abnahme des histopathologischen Differenzierungsgrades das Risiko einer Lymphknotenmetastasierung zu.

◆ *dem Vorliegen von Fernmetastasen (Mx-M1):*

Klinisch und bei einer Autopsie nachweisbare Fernmetastasen liegen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in Abhängigkeit von der Lokalisation des Primärtumors in 15% bis 40 % der Fälle vor (Zbaren und Lehmann, 1987). Das Risiko für Fernmetastasen korreliert mit dem regionären Lymphknotenstatus: das Risiko beträgt bei N0 oder N1 < 10 %, hingegen bei N2 oder N3 liegt das Risiko bei > 30 % (Vokes *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2009).

◆ *der Resektion des Tumors im Gesunden (R0-Resektion):*

Die beste Prognose und die größte Wahrscheinlichkeit für ein rezidivfreies Überleben des HNSCC-Patienten besteht nach vollständiger Entfernung des Karzinoms mit intraoperativer Randschnittkontrolle.

◆ *dem Allgemeinzustand des Patienten*

- ◆ *dem Nachweis disseminierter Tumorzellen im peripheren Blut und Knochenmark von HNSCC-Patienten:*

Disseminierte Tumorzellen im Knochenmark und peripherem Blut von HNSCC-Patienten sind mit einer schlechteren Prognose zu verbinden, da sie als der Ursprung von Fernmetastasen in Betracht kommen (Chaubal *et al.*, 1999; Wollenberg *et al.*, 2004).

- ◆ *der Überexpression von EGFR (epidermal growth factor receptor) auf HNSCC-Zellen :*

In 90 % der Fälle kann die Expression von EGFR auf HNSCC-Tumorzellen nachgewiesen werden (Grandis und Twardy, 1993; Kalyankrishna und Grandis, 2006). Eine vermehrte Expression von EGFR wird mit einer schlechteren Prognose für die betroffenen Patienten verbunden (Rubin Grandis *et al.*, 1998). Eine Stimulation des EGFR führt neben einer unregulierten Zellproliferation der Tumorzellen zur Angiogenese und Metastasierung (Kalyankrishna und Grandis, 2006).

- ◆ *dem HPV-Status:*

Der Nachweis des Virus HPV in HNSCC-Patienten stellt im Vergleich zu HPV-negativen Tumoren einen positiven prognostischen Faktor hinsichtlich der Überlebensrate, der Inzidenz eines Tumorrückfalls und des Auftretens von Zweitumoren dar (Licitra *et al.*, 2006; Psyrri *et al.*, 2009; Vu *et al.*, 2009). Zudem zeigen HPV-positive Tumore ein besseres Ansprechen auf Radiotherapie und/oder Chemotherapie als HPV-negative Tumore.

1.2 Tumor-assoziierte Antigene und `Immune escape`

1.2.1 Tumor-assoziierte Antigene

Als Tumor-assoziierte Antigene (TAA, *tumor-associated antigen*) werden Proteine bezeichnet, die in Zusammenhang mit der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren auftreten. Tumor-assoziierte Antigene sind charakteristische Moleküle, die von Tumorzellen exprimiert werden, sich aber zum Teil auch auf normalen gesunden Zellen im Körper befinden; allerdings werden sie von Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Körperzellen meist deutlich überexprimiert oder sind

posttranskriptional verändert. Einige dieser Antigene stellen somit sogenannte Selbst-Antigene dar (Schietinger *et al.*, 2008), und deswegen sind Immunreaktionen gegen die Tumor-assoziierten Antigene auf Tumorzellen *in vivo* nicht effektiv oder nur schwach ausgeprägt (Whiteside, 2003). Das Immunsystem tritt Selbst-Antigenen in Form von Selbst-Toleranz entgegen und dies kann zu einer Beeinträchtigung der Funktion des Immunsystems von HNSCC-Patienten (Whiteside, 2005) beitragen und die Tumorentwicklung begünstigen. Außerdem haben Tumore verschiedene Möglichkeiten, um der Überwachung durch das Immunsystem zu entgehen. Diese Möglichkeiten werden unter dem Begriff '*Immune escape*' zusammengefasst und im Folgenden näher beschrieben.

1.2.2 Immunabwehr und 'Tumor – Immune escape'

Gegen einen Tumor gerichtete Immunantworten haben ihren Ursprung sowohl in der *natürlichen (unspezifischen)* als auch in der *erworbenen (spezifischen)* Immunität und verfolgen das gemeinsame Ziel der Eliminierung der Tumorzellen. Die *natürliche Immunität* wird entweder durch Zellen – wie Granulozyten, Makrophagen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und gamma/delta T-Zellen – oder durch lösliche Substanzen wie dem Komplementsystem vermittelt. Die *erworbene Immunität* setzt sich aus B- und T-Zellen zusammen. Die Gruppe der Tumor-Antigen-spezifischen T-Zellen besteht aus CD8⁺ zytotoxischen Zellen und CD4⁺ T-Helferzellen. Den T-Zellen werden an MHC-Moleküle gebundene Tumor-eigene Antigene durch Antigen präsentierende Zellen (APC) angeboten.

Wie bereits beschrieben können sich HNSCC-Tumoren diesen Anti-Tumor-Immunantworten durch das Immunsystem entziehen und Immunzellen sogar suppressiv beeinflussen (Grandis *et al.*, 2000; Hoffmann *et al.*, 2002; Pries *et al.*, 2006a; Pries *et al.*, 2006b; Pries und Wollenberg, 2006). Der Entwicklung eines Tumors liegt ein komplexer Prozess zugrunde. Bestandteil dieses Prozesses ist das so genannte '*Immunoediting*', das aus drei aufeinander folgenden Phasen besteht: in der *ersten* Phase, der *Eliminierung*, greifen die bereits kurz beschriebenen Kontrollmechanismen des *natürlichen* und *erworbenen* Immunsystems, die unter Beteiligung von NK-Zellen, natürlichen Killer T-Zellen (NKT), dendritischen Zellen (DC) und T-Lymphozyten zur Zellzyklus-Inhibierung,

Apoptose und Angiostase im Tumor führen. In der folgenden *zweiten* Phase, dem *Gleichgewicht*, treten immer weitere, zufällige Mutationen auf, die zur Entstehung von weniger immunogenen Tumorzellvarianten führen. Der selektive Druck des Immunsystems führt über mehrere Jahre dazu, dass nur solche Tumorzellen überleben, die Strategien entwickelt haben, um der Kontrolle durch das Immunsystem zu entgehen. In der finalen *dritten* Phase, dem *Entkommen* (*'Tumor-escape'*), kommt es schließlich zum Wachstum dieser Tumorzellen (Dunn *et al.*, 2004; Malmberg und Ljunggren, 2006). Der Prozess der *'Tumor-escape'*-Mechanismen von HNSCC-Tumoren - und Tumoren im Allgemeinen - lässt sich grob in drei Prinzipien einteilen (Young, 2006):

- (1) verminderte bzw. fehlende Erkennung durch das Immunsystem
- (2) direkte Suppression des Immunsystems durch den Tumor
- (3) indirekte Suppression des Immunsystems durch Suppressor-Zellen (z.B. regulatorische T-Zellen Treg)

1.2.2.1 Verminderte bzw. fehlende Erkennung

Das erste Prinzip der *'Tumor-escape'* - Mechanismen beruht auf einer beeinträchtigten Erkennung der transformierten Zelle durch das Immunsystem. In HNSCC-Tumoren können oft eine Herunterregulation oder in 50 % der Kopf-Hals-Tumoren ein kompletter Verlust der Expression von *'major histocompatibility complex'* (MHC) Typ I Molekülen und von Bestandteilen der *'antigen processing machinery'* (AMP) beobachtet werden (Grandis *et al.*, 2000; Campoli *et al.*, 2002). Deshalb sind Tumorzellen keine effektiven Antigen-präsentierenden Zellen; zudem prozessieren sie Antigene falsch, so dass sie nicht von MHC-Molekülen präsentiert werden können (Meissner *et al.*, 2005; Whiteside, 2006). Zum Teil exprimieren Tumorzellen keine kostimulierenden Moleküle, wie zum Beispiel Mitglieder aus der B7-Familie, die zur Aktivierung von T-Lymphozyten benötigt werden. All dies hat zur Folge, dass das Immunsystem nicht in der Lage ist, Antigene der Tumorzellen zu erkennen.

Auch sekretiert der Tumor verschiedene Moleküle, wie den Fas Liganden (CD95L), die zur spontanen Apoptose der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) führen (Hoffmann *et al.*, 2002).

1.2.2.2 Direkte Suppression des Immunsystems durch den Tumor

HNSCC-Tumoren zeichnen sich durch eine direkte Immunsuppression aus (Pries *et al.*, 2006a; Young, 2006), und die Gründe für eine solche Fehlfunktion des Immunsystems sind zahlreich:

HNSCC-Tumorzellen sezernieren Zytokine, wie IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 (Alhamarneh *et al.*, 2010), *granulocyte macrophage - colony stimulating factor* (GM-CSF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und Prostaglandin E₂ (PGE₂). Durch diese Faktoren wird nicht nur die Funktion der Immunzellen beeinträchtigt und herunterreguliert, sondern die Immunzellen werden auch dazu stimuliert, selbst Th2- und immunsupprimierende Zytokine zu produzieren (Pries und Wollenberg, 2006). Die Immunantwort verschiebt sich unter Einfluss von HNSCC-Tumoren in Richtung einer für die Tumorbekämpfung wenig effektiven Th2-Antwort (Young, 2004). Eine Th2-Antwort ist durch Zytokine, wie IL-4, IL-6 und IL-10 charakterisiert und inhibiert die Produktion von Th1-Zytokinen, wie IL-2, IL-12 und IFN- γ , welche die Komponenten der zellulären Immunantwort, wie Cytotoxischen T-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen, stimulieren und für eine erfolgreiche Bekämpfung der Tumorzellen notwendig sind (Pries *et al.*, 2006a; Young, 2006). Zudem führt IFN- γ zu einer vermehrten Expression von *Major Histocompatibility Complex* (MHC) - I/II und kostimulatorischen Molekülen durch Antigen-präsentierende Zellen, um dadurch die Zell-vermittelte Immunantwort zu fördern.

Tab. 1-4: Produktion von immunsuppressiven Faktoren durch HNSCC-Tumoren

Faktor	Funktion
TGF- β	Immunsuppression, Induktion von Suppressorzellen
Interleukin-4	Immunsuppression
Interleukin-10	Immunsuppression, Induktion von Suppressorzellen; Inhibierung der Produktion von IL-1, IFN- γ , IL-12, TNF- α
GM-CSF	Immunsuppression, Mobilisierung von CD34-Zellen
VEGF	Inhibierung der Reifung von dendritischen Zellen; Angiogenese, Metastasierung
Prostaglandin E ₂ (PGE ₂)	Immunsuppression, Inhibierung der Leukozyten-Funktion durch Erhöhung von cAMP

Immunsuppressive Faktoren wie IL-10 und TGF- β fördern außerdem Suppressorzellen, wie zum Beispiel regulatorische T-Zellen (Treg), auf die noch näher eingegangen wird.

Ein weiterer Hinweis auf die Beeinträchtigung des Immunsystems in Patienten mit HNSCC-Tumoren findet sich im Vorkommen von funktionell beeinträchtigten Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) in Hinblick auf Defekte in deren Signalweg. Weitere Mechanismen, die die Funktion dieser Zelltypen in HNSCC-Tumoren stark einschränken, sind in *Tab. 1-5* aufgelistet.

Tab. 1-5: Bestandteile der beeinträchtigten Funktion von TIL

<u>Zellen</u>	<u>Beeinträchtigte Funktion</u>
TIL	Herunterregulation/Verlust der Zeta-Ketten Expression Supprimierte NF κ B Aktivierung Verminderung der Proliferation und Zytotoxizität Verändertes Zytokinprofil: kein IL-2 oder IFN- γ Apoptose von CD8 ⁺ -Effektorzellen

Quelle: Whiteside 2005 (Whiteside, 2005)

1.2.2.3 Indirekte Suppression des Immunsystems durch Suppressorzellen

Im Zusammenhang mit der indirekten Suppression des Immunsystems in HNSCC-Tumoren spielen regulatorische T-Zellen (Treg) eine entscheidende Rolle (Young, 2006). Mehrere Studien (Shimizu *et al.*, 1999; Suttmüller *et al.*, 2001; Elpek *et al.*, 2007) haben gezeigt, dass die Entfernung von Treg zu verstärkten Immunantworten gegen Tumor-Antigene und schließlich zu der Vernichtung des Tumors führt. Treg sind sowohl in gesunden als auch in Tumor-Patienten an der Erhaltung der peripheren Toleranz (Cao, 2009) gegenüber Selbst-Antigenen maßgeblich beteiligt und somit bedingen sie auch die Suppression von Immunantworten gegen Tumorantigene (TAA), die – wie bereits geschrieben – zahlreiche Selbst-Antigene darstellen. Man nimmt an, dass die Anzahl der regulatorischen T-Zellen deutlich mit der Tumorprogression und invers mit dem Erfolg einer Tumorthherapie korreliert (Kosmaczewska *et al.*, 2008). Zudem wird ein

direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl der Tregs und einer reduzierten Überlebensrate von Tumorpatienten postuliert (Curiel *et al.*, 2004).

Insgesamt lässt sich sagen, dass HNSCC-Tumoren zahlreiche Mechanismen entwickelt haben, um einer erfolgreichen Immunantwort zu entgehen. In dieser Doktorarbeit wird der Stellenwert von regulatorischen T-Zellen in Patienten mit HNSCC-Tumoren näher beleuchtet und analysiert werden.

1.3 Regulatorische T-Zellen (Treg)

Die Existenz von regulatorischen T-Zellen war lange Zeit umstritten. In den 1970er Jahren berichteten verschiedene Forschergruppen von Suppressor-T-Zellen, die Autoimmunantworten unterdrücken konnten. 1970 beschrieben *Gershon und Kondo* (Gershon und Kondo, 1970, 1971) eine Subpopulation von T-Zellen, die in der Lage war, neben B-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen, auch T-Zellen in ihrer Aktivität zu supprimieren. In den 1980ern und 90ern wurde dieses Konzept in Frage gestellt, weil Daten nicht reproduzierbar waren und die molekularen Mechanismen unbekannt blieben. Erst Mitte der 1990er Jahre erweckte ein von *Sakaguchi et al* (Sakaguchi *et al.*, 1995) publiziertes Experiment erneutes Interesse an Suppressor T-Zellen. *Sakaguchi* konnte zeigen, dass CD4⁺ T-Zellen, welche die α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors (CD25) auf ihrer Oberfläche exprimieren, suppressives Potential aufweisen. Zu diesem Zweck wurden in einem T-Zell-Transfermodell Autoimmunerkrankungen durch Transfer von CD4⁺ CD25⁻ Effektor-T-Zellen in eine T-Zell-lose Maus induziert; die Autoimmunerkrankungen konnten allerdings alleine durch den Kotransfer regulatorischer CD4⁺CD25⁺ T-Zellen verhindert werden. Studien mit thymektomierten Mäusen zeigten im Verlauf, dass CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen, die eine eigenständige Subpopulation von T-Zellen darstellen, im Thymus entstehen (Itoh *et al.*, 1999; Seddon und Mason, 2000; Shevach, 2002) .

Die Forschung der letzten Jahre zeigt, dass die Hauptaufgabe der regulatorischen T-Zellen in der Regulation des Immunsystems besteht. Der Schwerpunkt der Regulation liegt in der Suppression der Aktivierung und Expansion autoreaktiver Effektor-T-Zellen (CD4⁺/CD8⁺ Lymphozyten oder B-Lymphozyten) (Yamaguchi und Sakaguchi, 2006; Alhamarneh *et al.*, 2008) und in der Kontrolle dendritischer

Zellen, Makrophagen und natürlicher Killerzellen (NK) (Ralinirina *et al.*, 2006). Regulatorische T-Zellen sind an der Limitierung einer Immunantwort gegenüber Fremdartigen und an der Erhaltung der Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen wie z.B. Tumor-Antigenen beteiligt. Neben der Toleranzerhaltung und der damit verbundenen Vermeidung von Autoimmunerkrankungen spielen regulatorische T-Zellen eine ausschlaggebende Rolle bei der suppressiven Kontrolle von Immunantworten gegen Allergene (Chatila, 2005) und pathogene Mikroorganismen (Mills, 2004). Zudem tragen sie zur Toleranzinduktion des Immunsystems gegenüber homologen Organtransplantaten bei (Battaglia und Roncarolo, 2006) und schützen vor überschießenden Immunantworten gegen den Foetus während einer Schwangerschaft (Zenclussen, 2006).

1.3.1 Natürliche Treg und weitere Subtypen

Obwohl regulatorische T-Zellen (Treg) vereinfacht als T-Lymphozyten mit suppressiven Funktionen definiert werden können, existieren verschiedene regulatorische Subtypen, die sich hinsichtlich ihrer Entstehung, ihres Phänotyps oder ihrer Funktion voneinander unterscheiden (Miyara und Sakaguchi, 2007). Anhand des Entstehungsmechanismus lassen sich regulatorische T-Zellen allgemein in *natürliche Tregs* (nTreg), die im Thymus generiert werden, und in *induzierte/adaptive Tregs* (iTreg), die in der Peripherie entstehen, einteilen (Miyara und Sakaguchi, 2007). Natürliche Tregs entstehen im Thymus als Subpopulation der T-Lymphozyten während der positiven Selektion über starke Avidität-Interaktionen ihres T-Zell-Rezeptors mit Selbst-Antigenen, die durch MHC Klasse II Moleküle auf epithelialen Stromazellen präsentiert werden (Maggi *et al.*, 2005). Der anschließenden negativen Selektion scheinen die Tregs zu entgehen (von Boehmer, 2005). Für die Entwicklung, die Erhaltung und für das Überleben in der Peripherie sind Tregs auf Interleukin-2, TGF- β und CD28-Kostimulation angewiesen (Salomon *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2003).

Wie bereits erwähnt, hat *Sakaguchi et al* (Sakaguchi *et al.*, 1995) gezeigt, dass ein charakteristisches Merkmal der CD4⁺ Treg die stetige Expression der α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors (CD25) darstellt. Obwohl die Expression von CD25 spezifisch für Tregs in Mäusen zu sein scheint, findet man in Menschen die α -

Kette des Interleukin-2-Rezeptors auch auf aktivierten Effektor-T-Zellen (Baecher-Allan und Anderson, 2006a). Allerdings exprimieren aktivierte T-Zellen im Vergleich zu Treg CD25 deutlich niedriger – bis zu 30 % der CD4⁺ T-Zellen - und mehrere Studien suggerieren, dass nur die CD4⁺CD25⁺ T-Zellen mit einer hohen Expression von CD25 suppressive Aktivität aufzeigen (Baecher-Allan *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2006). Somit lassen sich laut *Baecher-Allan et al* (Baecher-Allan und Anderson, 2006a) regulatorische T-Zellen von Effektor-T-Zellen über die Expressionshöhe von CD25 unterscheiden. Demnach weisen etwa 2-4 % der CD4⁺ T-Lymphozyten hohe Level an CD25 (CD25^{high}) auf und stellen somit regulatorische T-Zellen dar (Baecher-Allan und Anderson, 2006a). In der Literatur findet man allerdings auch schwankende Angaben von 2 % bis hin zu 10 % der gesamten CD4⁺ T-Zellen (Yamazaki *et al.*, 2003; Piccirillo und Thornton, 2004; Trzonkowski *et al.*, 2009).

Regulatorische T-Zellen sind durch ihr Zytokinprofil gekennzeichnet. Sie exprimieren große Mengen IL-10 und TGF- β , allerdings kein IL-4 oder IL-2 (Groux *et al.*, 1997). Da Treg selber kein oder nur in sehr geringen Mengen IL-2 produzieren, sind sie auf die Produktion von IL-2 durch Immunzellen, z.B. T-Effektorzellen, aus der Umgebung angewiesen.

Natürliche Tregs werden neben CD4 und CD25 durch zahlreiche weitere Rezeptoren phänotypisch charakterisiert, die unter 1.3.2 näher beschrieben werden.

Obwohl die zentrale Entstehung von CD4⁺CD25⁺ Tregs im Thymus als sicher gilt, wird bezweifelt, dass dies der einzige Weg ihrer Entstehung ist. Im Rahmen der altersbedingten Thymusinvolution sinkt auch die Zahl an thymusgenerierten Lymphozyten. Daher müsste bei einer ausschließlich zentralen Entstehung die Zahl an CD4⁺CD25⁺ Tregs mit der Zeit abnehmen. Dies ist jedoch nicht der Fall (Fernandez-Martin *et al.*, 2006), es ist sogar ein altersbedingter Anstieg dieser Zellpopulation zu beobachten (Gregg *et al.*, 2005). Ein Grund hierfür ist die Proliferation von CD4⁺CD25⁺ Tregs in der Anwesenheit von Cytokinen wie IL-2 oder TGF- β . Neben dieser direkten Expansion von CD4⁺CD25⁺ Treg besteht außerdem die Möglichkeit der Neuentstehung von bereits erwähnten induzierten T-regulatorischen Zellen aus naiven peripheren CD4⁺CD25⁻ T-Zellen durch die Aktivierung von T-Lymphozyten durch eine suboptimale Antigen-Präsentation und/oder Kostimulation (Maggi *et al.*, 2005). Hierbei spielen die Antigen-

Präsentation in der Anwesenheit von immunsuppressiven Zytokinen wie TGF- β und IL-10, die Antigen-Präsentation durch unreife dendritische Zellen, die Antigenkonzentration und die Anwesenheit von Tregs eine entscheidene Rolle (Lohr *et al.*, 2006; Sojka *et al.*, 2008). Laut Miyara und Sakaguchi (Miyara und Sakaguchi, 2007) gehören IL-10 produzierende T-regulatorische 1 (Tr1) Zellen, TGF- β -ausschüttende T-Helferzellen (Th3), γ/δ TCR-exprimierende doppelt-negative CD4⁻ CD8⁻ Zellen und CD8⁺ CD28⁻ T-Zellen zu den induzierten Tregs.

Tab. 1-6: Subtypen und Charakteristika von regulatorischen T-Zellen

<u>Zelltyp</u>	<u>Phänotyp</u>	<u>Suppressions-mechanismus</u>	<u>Charakterist. Rezeptoren</u>
<u>CD4⁺ regulatorische T-Zellen:</u>			
Im <i>Thymus</i> generierte natürliche Treg Zellen	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺	Zell-Zell-Kontakt <i>in vitro</i> (CTLA-4); Zell-Zell-Kontakt u/o Zytokine (IL-10, TGF- β) <i>in vivo</i>	GITR, CTLA-4, CD45RA, CCR7, CCR4, CD62L, CD122
<i>peripher</i> induzierte natürliche Treg Zellen	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺		
<i>peripher</i> induzierte Tr1 Zellen	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁻ IL-10 ^{hi}	Zell-Zell-Kontakt Zytokine-vermittelt (IL-10 Produktion)	CTLA-4, CD122
<i>peripher</i> induzierte Th3 Zellen	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁻ TGF- β ^{hi}	Zell-Zell-Kontakt Zytokine-vermittelt (TGF- β Produktion)	CTLA-4
TGF- β /IL-10 double-positive CD4 ⁺ Treg	TGF- β /IL-10 double-positive CD4 ⁺ CD25 ⁻ FOXP3 ⁻	Zytokine-vermittelt (IL-10 und TGF- β Produktion)	
<u>CD8⁺ regulatorische T-Zellen:</u>			
T Suppressor T-Zellen	CD8 ⁺ CD28 ⁻	Zell-Zell-Kontakt (CTLA-4)	
IL-10 produzierende CD8 T-Zellen	CD8 ⁺ IL-10 ⁺	Zytokine-vermittelt (IL-10 Produktion)	

Quelle: nach Alhamarneh *et al.* (Alhamarneh *et al.*, 2008) und Cools *et al.* (Cools *et al.*, 2007)

Zudem entstehen induzierte CD4⁺CD25⁺ Tregs, die in Hinsicht auf den Phänotyp von natürlichen Tregs nicht zu unterscheiden sind (Valzasina *et al.*, 2006) und somit einen peripher generierten Subtyp von nTregs darstellen (Alhamarneh *et al.*, 2008). Die Konversion stellt zudem einen entscheidenden Bestandteil des 'Immune-escapes' von Tumoren dar (Valzasina *et al.*, 2006; Beyer und Schultze, 2009). Tumorzellen induzieren die Entstehung von induzierten Treg aus naiven T-

Zellen über direkten Zell-Zellkontakt zwischen Tumorzellen und T-Zellen und über TGF- β -Produktion (Liu *et al.*, 2007; Mittal *et al.*, 2008).

Innerhalb der beschriebenen Vielfalt an unterschiedlichen regulatorischen T-Zellen stehen die CD4⁺CD25^{high} Treg Zellen im Mittelpunkt dieser Doktorarbeit.

1.3.2 Erläuterung der Rezeptoren

CD4⁺CD25⁺ T-Zellen sind die bisher am besten untersuchten regulatorischen T-Zellen. Im Folgenden werden die Oberflächenmarker, die in dieser Arbeit im Zusammenhang mit Treg Zellen berücksichtigt wurden, näher erläutert.

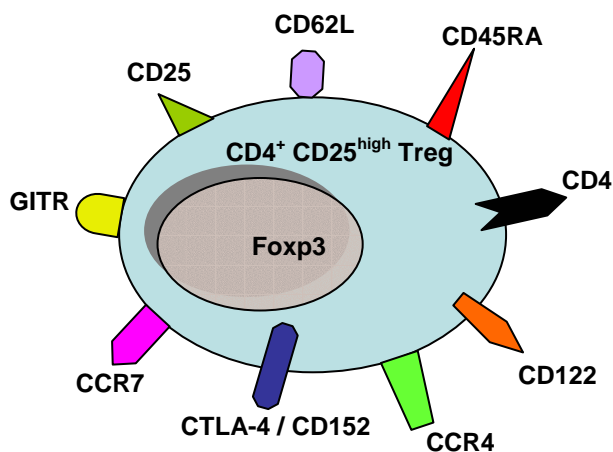


Abb. 1-2: Charakteristische Rezeptoren von Treg

Neben einem T-Zell-Rezeptor (TCR) sind diese Zellen phänotypisch - wie bereits erwähnt - durch die konstitutive Expression von CD4 und der α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) definiert. CD4 ist ein Korezeptor für MHC Klasse II – restringierte Antigenerkennung und stabilisiert die Interaktion von Treg und antigenpräsentierenden Zellen. Wie bereits unter 1.3.1 beschrieben, bestehen die humanen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus zwei verschiedenen Populationen: suppressive CD4⁺CD25^{high} Treg Zellen versus aktivierte CD4⁺CD25^{low} T-Zellen ohne regulatorische Aktivität. Neben der hohen Expression von CD25 weisen Treg Zellen allerdings zudem im Gegensatz zu aktivierten T-Zellen eine niedrige Expression von CD127 (CD127^{low}), der α -Kette des Interleukin-7 Rezeptors, auf (Liu *et al.*, 2006; Hartigan-O'Connor *et al.*, 2007). CD127 wird auf allen humanen

T-Zellen nach der Aktivierung zunächst herunterreguliert. Im Gegensatz zu einer deutlichen Reexpression von CD127 auf Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen, verbleiben Treg Zellen CD127^{low} (Liu *et al.*, 2006). Demzufolge erlaubt die Kombination von einer niedrigen CD127- (CD127^{low}) und einer hohen CD25- (CD25^{high}) Expression eine spezifische Analyse (Hartigan-O'Connor *et al.*, 2007) der suppressiven Treg Zellen im Durchflusszytometer.

Eine Vielzahl von weiteren Markern wird konstitutiv auf CD4⁺CD25^{high} regulatorischen T-Zellen gefunden, allerdings ist ebenfalls keiner dieser Marker spezifisch für CD4⁺CD25^{high} Tregs, sondern man findet diese Marker auch in verschiedenen Aktivierungs-, Differenzierungs- und Entwicklungsstadien von reaktiven CD4⁺ T-Zellen (Alhamarneh *et al.*, 2008; Klein *et al.*, 2009), meistens ist aber das Expressionslevel niedriger als bei Tregs .

Typischerweise exprimieren CD4⁺CD25^{high} Tregs den Transkriptionsfaktor Forkheadbox (Foxp3) (Fontenot *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2003), dessen Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert ist. Foxp3 ist ein Transkriptionsfaktor der "forkhead" Familie, der für die Bildung und die suppressive Kapazität von Tregs essentiell ist. Mutationen im Foxp3-Gen führen zu funktionsuntüchtigen Tregs und somit zu einer verringerten Anzahl an Tregs. Die Mutation zeigt sich beim Menschen (*IPEX-Syndrom, immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome*) im Auftreten von tödlich verlaufenden Polyautoimmunerkrankungen (Hori *et al.*, 2003; Bettelli *et al.*, 2005) mit hyperproliferativen Lymphozyten. Dies unterstreicht die wichtige Rolle des Transkriptionsfaktors Foxp3 und der Tregs bei der Verhinderung von Autoimmunerkrankheiten. Obwohl Foxp3 als ein 'Master Kontroll-Gen' der Treg-Funktion und Entwicklung im Thymus bzw. in der Peripherie angesehen wird, ist der molekulare Mechanismus, der hinter der Foxp3-vermittelten Regulation steckt, bisher nicht eindeutig verstanden (Li *et al.*, 2006). Foxp3 führt über direkte Interaktionen mit dem 'nuclear factor- κ B' (NF- κ B) und mit 'nuclear factor of activated T-cells' (NF-AT) zu einer Repression der Transkription von IL-2, IL-4 und IFN- γ (Miyara und Sakaguchi, 2007). In der Literatur existieren kontroverse Angaben, inwiefern die Expression von Foxp3 spezifisch für Treg ist (Hori, 2008). Einige Autoren postulieren, dass die Foxp3-Expression in konventionellen T-Zellen nicht nach TCR-Stimulierung *in vitro/in vivo* induziert werden kann und somit Foxp3 ein spezifischer Marker für Treg darstellt (Dejaco *et al.*, 2006; Zwar *et al.*, 2006). Neuere Studien zeigen jedoch, dass in

naiven T-Zellen nach TCR-Stimulierung und TGF- β Kostimulation die Genexpression von Foxp3 induziert wird (Li *et al.*, 2006; Ziegler, 2007; Hori, 2008), und es wird diskutiert, ob dadurch T-Zellen einen regulatorischen Phänotyp entwickeln (Chen *et al.*, 2003; Kretschmer *et al.*, 2005). Die Expression von Foxp3 scheint zudem zu einer Hochregulation von Treg-assoziierten Molekülen wie CD25, CTLA-4 und GITR (Miyara und Sakaguchi, 2007) zu führen. Laut Hori *et al.* (Hori, 2008) bedeutet die Expression von Foxp3 allein nicht immer das Erlangen von suppressiven Fähigkeiten, sondern ausschlaggebend ist die Kontinuität und Höhe des Foxp3-Expressionslevels (Baecher-Allan und Anderson, 2006a; Hori, 2008). Somit können naive T-Zellen transient Foxp3 auf einem niedrigen Level exprimieren, ohne suppressiv auf das Immunsystem zu wirken.

CTLA-4 (CD152; *cytotoxic T lymphocyte-associated protein-4*) ist ein weiterer Marker, der für die suppressive Funktion der regulatorischen T-Zellen von Bedeutung ist (Baecher-Allan und Anderson, 2006a; Miyara und Sakaguchi, 2007; Scalapino und Daikh, 2008). CTLA4 ist ein T-Zelloberflächenmolekül der CD28-Familie, das auf regulatorischen T-Zellen konstitutiv exprimiert ist (Scalapino und Daikh, 2008), auf T-Effektorzellen dagegen erst nach Aktivierung induziert wird (Wing *et al.*, 2005; Miyara und Sakaguchi, 2007; Alhamarneh *et al.*, 2008). CTLA-4 wird sowohl intra- als auch extrazellulär auf Tregs exprimiert, aber jedoch intrazellulär mit einem höheren Level als extrazellulär. Die Aktivierung von Tregs durch Antigene führt allerdings zur Hochregulation von CTLA-4 auf der Oberfläche von Tregs (Jonuleit *et al.*, 2001; Curtin *et al.*, 2008).. Durch CTLA-4 vermittelte Signale wirken negativ auf die T-Zell-Stimulation durch antigenpräsentierende Zellen und schränken in der Folge die Bildung von IL-2 ein (Yamaguchi und Sakaguchi, 2006; Scalapino und Daikh, 2008).

GITR (*Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*), ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie, ist ein weiterer charakteristischer CD4⁺CD25^{high} Treg-Oberflächenrezeptor, der an der Regulation der suppressiven Funktion von Tregs beteiligt ist (Shimizu *et al.*, 2002). Allerdings zeigen T-Effektorzellen ebenfalls eine geringe Expression des Rezeptors nach ihrer Aktivierung. GITR scheint im Gegensatz zu den anderen Treg-Rezeptoren Gegenstand der Inhibierung der suppressiven Aktivität regulatorischer T-Zellen zu sein (Burckhart *et al.*, 2010 ; Shimizu *et al.*, 2002). Das Durchbrechen der Suppression durch Treg wird durch TCR-Stimulation in Kombination mit anti-GITR-Antikörper wie auch durch löslichen

GITR-Ligand erreicht (Wing *et al.*, 2005). Neben der Inhibierung der suppressiven Aktivität der Treg Zellen induziert eine Stimulation von GITR andererseits allerdings auch die Proliferation und Expansion von Treg Zellen (Ronchetti *et al.*, 2004; Nocentini und Riccardi, 2005). Es gibt Hinweise, dass Treg Zellen nach einer GITR Kostimulation ihre suppressive Aktivität wiedererlangen. Darüber hinaus scheint eine GITR-Stimulation im Endeffekt über die Proliferation von Treg Zellen zu einer deutlichen Zunahme der suppressiven Fähigkeiten der regulatorischen T-Zellen zu führen (Nocentini *et al.*, 2007).

Tregs zeichnen sich weiter durch eine Expression von Molekülen – wie zum Beispiel CD62L, CCR4 und CCR7 - aus, die einen Beitrag zur Migration der Tregs liefern. CD62L, auch als *L-Selectin* bekannt, ist ein Adhäsionsmolekül, das als *homing receptor* (Ermann *et al.*, 2005) agiert und Tregs den Eintritt aus endothelialen Venulen in sekundäres lymphatisches Gewebe ermöglicht. Der Rezeptor wird auch auf naiven T-Zellen gefunden; die Oberflächenexpression von CD62L auf T-Effektorzellen nimmt allerdings nach Aktivierung der Zelle ab (Ermann *et al.*, 2005). *Chemokine (C-C motif) receptor 7* oder CCR7 (CD197) und ist ein Mitglied der *G protein-coupled receptor family*. CCR7 wird im lymphatischen Gewebe, auf aktivierten B- und T-Lymphozyten, aber auch auf regulatorischen T-Zellen exprimiert (Hoffmann *et al.*, 2004; Hoffmann *et al.*, 2006). Wie auch CD62L ist CCR7 am "homing" von Lymphozyten und dendritischen Zellen in die lymphatischen Gewebe beteiligt. Zudem gibt es Hinweise auf eine CCR7-Expression auf Tumorzellen, was eine mögliche Metastasierung unterstützt (Wang *et al.*, 2005; Basile *et al.*, 2008). CCR 4 (*Chemokine (C-C motif) receptor 4*; CD194) gehört ebenfalls zur *G protein-coupled receptor family* und ist ein Rezeptor für Chemokine, wie zum Beispiel CCL22. CCR4 wird auf CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten mit einem Th2 Phänotyp und auf CD25⁺ regulatorischen T-Zellen exprimiert (Curiel *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2007). Die Expression von CCR4 wird bei Entzündungen hochreguliert und CCR4 ist bei der Migration von T-Zellen Treg in entzündliches oder tumoröses Gewebe beteiligt (Curiel *et al.*, 2004). Tumoren sind in der Lage, den spezifischen CCR4-Liganden CCL22 zu produzieren (Curiel *et al.*, 2004; Ishida und Ueda, 2006), und induzieren somit die Migration von CCR4⁺ Zellen.

Weitere Marker, die auf Treg exprimiert sind, sind CD122 und CD45RA. CD122, die β -Kette des Interleukin-2-Rezeptors, findet man zudem auf aktivierten T- und B-Zellen.

Anhand dieser beschriebenen Rezeptoren können regulatorische T-Zellen in HNSCC-Tumorpatienten näher betrachtet werden.

1.3.3 Suppressionsmechanismen

Die Induktion der Suppression (Abb. 1-3) durch regulatorische T-Zellen geschieht über die Stimulierung des T-Zellrezeptors der Treg Zellen mit einem spezifischen Antigen; hingegen ist die Ausübung der Suppression durch die nun aktivierten Tregs Antigen-unspezifisch (Miyara und Sakaguchi, 2007) und sie können somit eine große Spannweite von Immunantworten inhibieren.

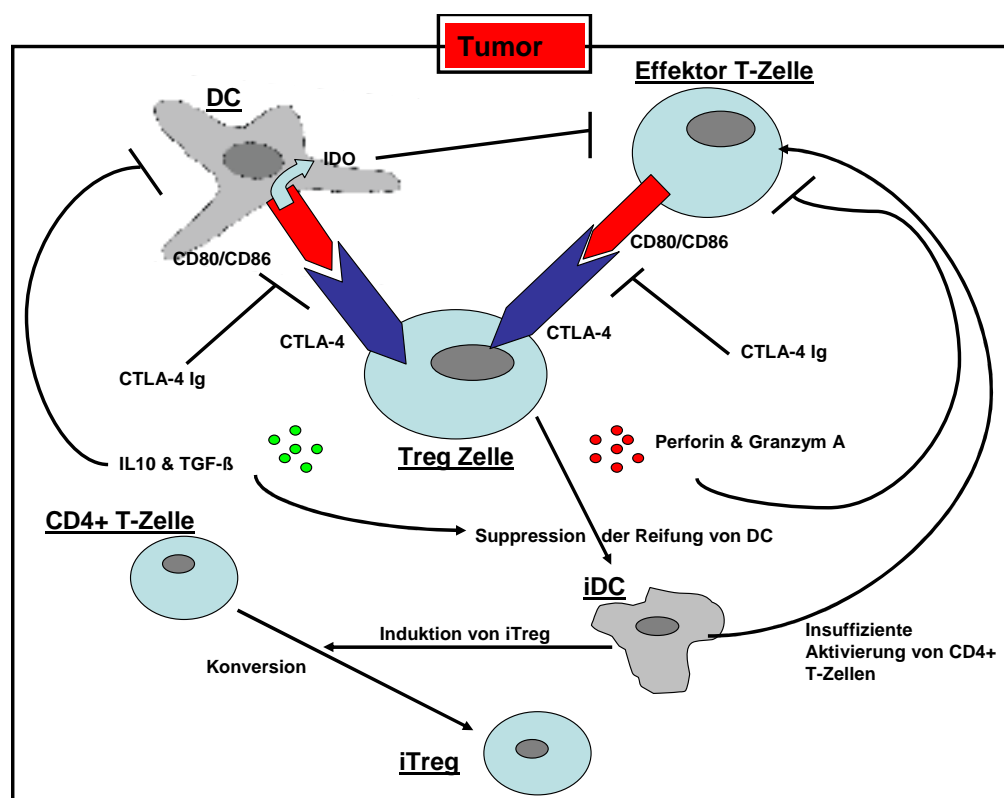


Abb. 1-3: Suppression des Immunsystems durch Treg-Zellen

Quelle: nach Mahnke 2007 (Mahnke *et al.*, 2007) und Colls 2007 (Cools *et al.*, 2007)

Treg Zellen supprimieren Effektorzellen als auch Antigen-präsentierende Zellen wie dendritische Zellen (DC) durch Zell-Zell-Kontakt über CTLA-4. Die Produktion immunsuppressiver Zytokinen wie IL-10 und TGF- β inhibiert die Reifung von DCs (\rightarrow iDC), was zu einer verminderten Expression von MHC-Komplexen oder zu einem suppressiven Phänotyp der iDCs führt. Zudem können Treg Zellen Effektorzellen durch die Expression von Perforin und Granzym A vernichten. Unreife DCs

(iDC) sind wiederum in der Lage neue suppressive Treg Zellen auf dem CD4⁺CD25⁻ T Zell Pool zu generieren. Die Abbildung verdeutlicht auch die therapeutische Wirkung von dem Anti-CTLA-4 Antikörper (CTLA-4 Ig).

Tregs supprimieren die Aktivierung, Proliferation und Zytokinbildung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die zytotoxischen Funktionen von NK-Zellen und die Funktion und Reifung von dendritischen Zellen. Zudem inhibieren Tregs die Proliferation, Immunglobulin-Bildung und den 'class switch' von B-Zellen (Miyara und Sakaguchi, 2007). Als endgültiges Ergebnis der Suppression des Immunsystems durch Tregs wird die Inhibierung der Interleukin-2-Genexpression angesehen, was zu einer verminderten Proliferation/Aktivität von Effektorzellen führt. Allerdings ist der genaue Suppressionsmechanismus noch ungeklärt (Miyara und Sakaguchi, 2007) und es werden mehrere Vorgänge in Sinne eines multifaktoriellen Geschehens diskutiert (von Boehmer, 2005). Obwohl die Bestimmung des Mechanismus der Suppression bei *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zu unterschiedlichen Ergebnissen führt, ist die Suppression sowohl Zell-Zell-Kontakt- als auch Zytokinabhängig (von Boehmer, 2005; Miyara und Sakaguchi, 2007). In Tab. 1-7 sind die unterschiedlichen Mechanismen aufgelistet.

Tab. 1-7: Suppressionsmechanismen der regulatorischen T-Zellen:

<u>Zell-Zellkontakt Treg-Effektorzellen:</u>	<u>Zytokinabhängig:</u>
a) Übertragung von suppressivem zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) über 'Gap Junctions' (Sojka <i>et al.</i> , 2008) auf Effektorzellen	a) Immunsuppression über Zytokine wie IL-10 und TGF-β, die Tregs entweder selber bilden oder sie induzieren APC zur Zytokin-Produktion (Sojka <i>et al.</i> , 2008)
b) Suppression über membran-gebundenes TGF-β (Miyara und Sakaguchi, 2007; Sojka <i>et al.</i> , 2008)	b) Induktion und Erhaltung eines unreifen Status der dendritischen Zellen (immature DC, iDC) → iDC zeigen eine Runterregulation der MHC Klasse II-Expression und kostimulierender Signale
c) Apoptoseinduktion von Effektorzellen durch Ausschüttung von Perforin, Granzyme A und B (Miyara und Sakaguchi, 2007)	
d) Induktion des Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-Signalwegs in dendritischen Zellen durch Interaktionen zwischen CTLA-4 auf Tregs und CD80 und CD86 auf DCs (Miyara und Sakaguchi, 2007)	
e) Tregs konkurrieren mit Effektorzellen um APC-Kostimulation über CTLA-4 (Sojka <i>et al.</i> , 2008)	
f) Tregs konkurrieren mit Effektorzellen um Zytokine wie IL-2, IL-4 und IL-7 (Sojka <i>et al.</i> , 2008)	

1.3.4 Regulatorische T-Zellen in der Tumorummunologie

Wie bereits unter 1.2.2 beschrieben, haben Tumoren – u.a. HNSCC-Tumoren - verschiedene Mechanismen entwickelt, um der Überwachung des Immunsystems zu entgehen. Neben Veränderungen des Zytokinprofils in Tumorpatienten bis hin zu einem suppressiven Milieu, scheinen regulatorische T-Zellen eine bedeutende Rolle bei der Unterdrückung von Immunantworten und der Toleranzentwicklung gegen Tumore zu spielen (Baecher-Allan und Anderson, 2006a; Wang und Wang, 2007; Beyer und Schultze, 2009). Diese Annahme wird laut *Baecher-Allan et al* (Baecher-Allan und Anderson, 2006a) durch folgende drei Tatsachen bestätigt:

- ◆ Die Anzahl von Treg Populationen ist in der Blutzirkulation von Tumorpatienten, innerhalb von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten und innerhalb von Lymphknoten erhöht.
- ◆ Eine Spezifität für Tumor-assoziierte Antigene konnte bei Tregs identifiziert werden.
- ◆ Die Anhäufung von Tregs im Tumorgewebe korreliert mit einer schlechten Prognose.

Zudem führt in Mausmodellen die Depletion von Tregs zu einer deutlichen Verstärkung der Anti-Tumor-Immunität (Shimizu *et al.*, 1999). Mehrere Studien konnten bisher erhöhte Anzahlen von Treg Zellen sowohl im peripheren Blut von Patienten mit Malignomen in der Lunge, in der Brust, im Gastrointestinaltrakt, im Pankreas, im Kopf-Hals-Bereich, als auch bei Patienten mit Leukämie, Melanomen, mit B-Zell non Hodgkin Lymphomen und Glioblastomen nachweisen (Jacobs *et al.*, ; Baecher-Allan und Anderson, 2006a; Wei *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006; Lau *et al.*, 2007; Pakravan *et al.*, 2007; Strauss *et al.*, 2007a). Auch in HNSCC-Tumoren konnte die Akkumulation von Treg innerhalb der TIL nachgewiesen werden (Albers *et al.*, 2005). *Curiel et al* (Curiel *et al.*, 2004) zeigen in einer Studie mit 104 Patientinnen mit Ovarialkarzinom, dass Treg durch das von Tumorzellen und infiltrierenden Makrophagen produzierte Chemokin CCL22 zum Tumor migrieren, wo sie sich anreichern. Dort supprimieren sie tumorspezifische Reaktionen von Effektor-T-Zellen. Die Anwesenheit der Treg im Tumor geht außerdem mit einer erhöhten Todesrate einher. Eine ähnliche Studie mit Magen- und Ösophaguskarzinomen von *Kono et al* (SKono *et al.*, 2005) zeigt zudem, dass

die Zunahme von $CD4^+CD25^{high}$ Tregs im Blut von Patienten mit dem Tumorstadium und der Wahrscheinlichkeit von Rezidiven in Verbindung steht.

Zusammenfassend lässt sich demnach sagen, dass regulatorische T-Zellen durch Tumor-assoziierte Antigene in tumoröses Gewebe rekrutiert werden und dort die Tumor-spezifische Immunität supprimieren (Baecher-Allan und Anderson, 2006a). Um die Therapiemöglichkeiten von HNSCC zu verbessern und die Anti-Tumorimmunität zu stärken, ist ein umfassendes Verständnis der gegenseitigen Einflüsse von HNSCC und regulatorischen T-Zellen notwendig. Diese Arbeit soll zur Klärung der gegenseitigen Einflüsse beitragen und die Bedeutung $CD4^+CD25^{high}$ regulatorischer T-Zellen im Zusammenhang mit HNSCC-Tumoren darstellen.

1.4 Fragestellung dieser Arbeit

Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCC) zeigen eine massiv unterdrückte Anti-Tumor-Immunität durch die Bildung eines immunsuppressiven Mikroenvironments, so dass effektive Immunantworten ausbleiben. Wie bereits beschrieben, spielen regulatorische T-Zellen (Treg) neben der Regulation von Immuntoleranzmechanismen, der Verhinderung von Autoimmunreaktionen gegen körpereigene Antigene, bei der Immunmodulation im Rahmen von Anti-Tumorantworten eine zentrale Rolle. Man nimmt an, dass Treg Zellen entscheidend zum „Immune escape“ der Kopf-Hals-Tumoren beitragen. Zudem haben mehrere Studien der letzten Jahre die aktive Suppression durch regulatorische T-Zellen als eines der Haupthindernisse einer erfolgreichen Anti-Tumor-Therapie identifiziert (Zou, 2006; Ruter *et al.*, 2009). Eine erhöhte Anzahl regulatorischer $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ T-Zellen wurde für verschiedene Tumor-Arten bereits beschrieben und in einen direkten Zusammenhang mit einer reduzierten Überlebensrate der Tumorpatienten gebracht.

In dieser Arbeit sollte umfassend die Rolle regulatorischer T-Zellen in Patienten mit HNSCC analysiert und dargestellt werden. Zu diesem Zweck sollten Tumorpatienten mit einem HNSCC, die sich entweder in einem aktiven,

präoperativen Krankheitszustand befanden oder bereits einer onkologischen Therapie zugeführt worden waren, hinsichtlich des Vorkommens und der Anzahl von CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Treg Zellen mittels Durchflusszytometer untersucht werden. Zudem sollten die regulatorischen T-Zellen hinsichtlich ihrer Oberflächenmarker charakterisiert werden. Des Weiteren sollte eine eventuelle langfristige Beeinflussung des Immunsystems bezüglich der Treg Zellen durch HNSCC analysiert werden.

Darüber hinaus ist bekannt, dass T-Zellen, aber auch Treg Zellen im Tumor akkumulieren. In dieser Arbeit sollte daher die Bedeutung des Chemokin CCL22, eines potentiellen Attraktants regulatorischer T-Zellen, in HNSCC Patienten ermittelt werden. Zu diesem Zweck sollte das CCL22-Level im Serum von HNSCC-Patienten und gesunden Kontrollen mittels ELISA analysiert werden, sowie die HNSCC-Zellen hinsichtlich einer eigenständigen CCL22-Produktion untersucht werden.

Die Erkenntnisse über die suppressive Wirkung regulatorischer T-Zellen auf Anti-Tumorantworten zusammen mit der relativen Ineffizienz der zur Verfügung stehenden HNSCC-Therapieverfahren machen die Suche nach alternativen therapeutischen Strategien dringend erforderlich. Die Tatsache, dass sich HNSCC Anti-Tumor-Immunantworten durch das Immunsystem entziehen und HNSCC-Patienten eine Immundefizienz aufweisen (Grandis *et al.*, 2000; Hoffmann *et al.*, 2002; Pries *et al.*, 2006a; Pries *et al.*, 2006b; Pries und Wollenberg, 2006), hat in den letzten Jahren das Konzept entstehen lassen, HNSCC durch die Gabe von immunologisch aktiven Stoffen zu therapieren (Richtsmeier *et al.*, 1990). Interferon-gamma (IFN- γ), ein sogenanntes Th1 Zytokin, stellt eins dieser Stoffe dar. Diesem Zytokin werden antivirale, immunregulatorische und antitumoröse Eigenschaften zugeschrieben (Schroder *et al.*, 2004; Assudani *et al.*, 2007). In dieser Doktorarbeit sollte ein möglicher Effekt des Zytokins IFN- γ auf die Immunantwort gegenüber permanenten HNSCC-Zelllinien untersucht werden, um eine Bedeutung von Interferon-gamma als ein Bestandteil einer möglichen Therapiestrategie bei HNSCC zu ermitteln.

2 Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Blutproben

Die in den *Tab. 2-1* und *2-2* aufgeführten Blutproben wurden von Patienten der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde & Plastische Operationen des Universitätsklinikums Schleswig – Holstein, Campus Lübeck zur Verfügung gestellt. Zur Untersuchung regulatorischer T-Zellen (Treg) im peripheren Blut von HNSCC Patienten wurden 32 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Hals-Kopf-Bereich - nach vorangegangener Aufklärung über das Forschungsvorhaben und unterschriebener Einverständniserklärung - Blutproben entnommen. Die Patienten waren zwischen 41 und 82 Jahren alt und unter den 30 Tumorpatienten befanden sich 3 weibliche und 29 männliche Patienten. 21 Patienten hatten zum Zeitpunkt der Blutentnahme einen Primärtumor bzw. ein Tumorrezidiv im Hals-Kopf-Bereich; sie befanden sich demzufolge in einem aktiven Krankheitszustand (AKZ, präoperativ; *Tab. 2.1*). Zudem wurden in dieser Doktorarbeit auch solche Patienten zu der Gruppe der aktiv erkrankten Patienten gezählt, die sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme im perioperativen Zeitraum, d.h. bis zu einem Jahr nach der Tumorsektion befanden. Es wurde davon ausgegangen, dass bis zu 12 Monaten postoperativ das Immunsystem der Patienten noch durch sezernierte und nach der Operation zurückgebliebene Stoffe des Tumors beeinflusst werden kann.

11 der Blutproben stammen von Patienten in der Tumornachsorge mit keinem Nachweis eines Tumorrezidivs (PO; postoperativ; *Tab. 2.2*). Sie galten als tumorfrei über einen Zeitraum von 12 Monaten bis zu 9 Jahren.

Für die Entnahme und anschließende Verwendung der HNSCC-Patienten-Blutproben lag ein von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck befürworteter Ethikantrag vor. Aus datenschutzrechtlichen Gründen werden die Namen der Patienten in dieser Doktorarbeit durch Nummern (TBxxx) ersetzt.

Als gesunde Kontrollen dienten zum einen 27 Blutproben in Form von leukozytenhaltigen Präparaten („buffy coats“) gesunder Spender, die freundlicherweise vom Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig – Holstein, Campus Lübeck zur Verfügung gestellt wurden und zum anderen 21 einzelne Vollblutproben freiwilliger gesunder Spender. Die Blutspender waren 18 bis 65 Jahre alte gesunde Frauen und Männer, die negativ auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet worden sind. In Tab. 2-1 und 2-2 sind die patienten- und tumorbezogenen Daten der untersuchten Proben dargestellt.

Tab. 2-1 Prä-/ Perioperative HNSCC-Tumorpatienten

Nr ₁	A ₂	G ₃	TNM ₄	Lokalisation Tumor ₅	Histologie ₆	ED bzw. Behandlungsstand ₇	Zeitpunkt der BE bzw. OP-Termin od. periop. Zeitraum
TB479	43	m	cT4bcN3cM0	Epipharynx li bis Sinus piriformis	viPE, G2	05/07 / -	05/07 / keine OP
TB527	66	w	K	Rezidiv Oropharynx-Ca	K	05/07 / K	05/07 / K
TB529	49	m	pT1pN0cM0	Mundboden-Ca	imdtvPE, G2	11/06 / TR	12/06 / 18 Tage postop.
TB530	49	m	K	03/07: li cervikales Rezidiv eines pT3pN2bcM0 Oro-, Hypopharynx-Ca	igdvPE	03/07 / perkutane Radiochemotherapie 12/1997	03/07 / keine OP
TB531	55	m	pT1cN0cM0	Nasenseptum-Ca	mdPE, G2	06/07 / TR	07/07 / 36 Tage postop.
TB532	78	w	pT3pN0cM0	Gl. Parotis re	nenkK, G3	06/07 / TR	07/07 / 10 Tage postop.
TB533	55	m	pT4apN1cM1	Hypopharynx-Larynx-Ca li	uimdPE, G2	01/07 / -	02/07 / 03/07
TB534	69	m	cT3-4 cN2ccM1	Hypopharynx-Larynx-Ca	igdtvPE	04/07 / -	04/07 / -
TB535	76	m	K	03/07: Progr. Rezidiv/Residual-Tumor der Trachea	Rezidiv eines gdvPE	03/07 / -	03/07 / keine
TB536	71	m	cT3cN2acM0	Oropharynx	igdPE	02/07	02/07

				(Tonsillen-Ca re)		/	/
TB537	64	m	pT4pN2bcM0	li Larynx-Hypopharynx-Ca	mdvPE	12/06	12/06
						/	/
						-	12/06
TB538	57	w	cT4acN2ccM1	Hypopharynx-, Larynx-Ca	tvPE	09/06	10/06
						/	/
						-	keine OP, K
TB539	81	m	cT3cN2cM0	Zungen/Zungengrund-Ca li	igdPE	09/06	09/06
						/	/
						-	10/06
TB541	56	m	pT2cN0cM0	Stimm lippen-Ca re	gdvPE	04/07	04/07
						/	/
						-	04/07
TB543	64	m	pT3pN0cM0 pT2pN0cM0	Larynx-Ca re Oropharynx-Ca li	igdPE	07/07	07/07
						/	/
						-	07/07
TB544	77	m	cT4cN2bcM1	Rezidiv-Larynx-Ca	imgvPE	05/07	05/07
						/	/
						-	keine OP
TB545	41	m	pT4apN2bcM0	Rezidiv-Larynx-Ca	igdvPE, G3	05/07	05/07
						/	/
						-	05/07
TB546	44	m	TxN2bM0	Cervikales Rezidiv eines CUP Syndroms re	PE	06/07	05/07
						/	/
						Z.n. adj. Radiochemotherapie bis 02/07	keine OP
TB778	44	m	pT2cN0cM0	Stimm lippen-Ca li	mgvPE	01/08	09/08
						/	/
						TR	7 Monate postop.
TB779	53	m	pT4apN1M0	Larynx-Hypopharynx-Ca	gdhvPE, G3	11/07	09/08
						/	/
						TR, RC	10 Monate postop.
TB782	61	m	Metastase eines pT4apN2ccM1 re, synchron pT1 li	Metastase eines Tonsillen-Ca	dnvPE	06/08	10/08
						/	/
						-	K

- 1: **Interne Nummerierung**; TB := Tumorblut
- 2: **Alter** des Patienten in Jahren zum Zeitpunkt der Probenentnahme
- 3: **Geschlecht** des Patienten: w := weiblich; m := männlich
- 4: **Klassifikation** von Tumoren nach TNM (tumor, nodes, metastases) des "American Joint Comitee on Cancer" (AJCC)
- 5: **Lokalisation** des Primärtumors oder des Rezidivs des Primärtumors
- 6: **Histologie** des Primärtumors bzw. des Rezidivs: mi := mikroinvasives; i := invasives; ni := nicht invasives; d:= differenziertes; gd := gering differenziertes; md := mittelgradig differenziertes; hd := hoch differenziertes; u := ulzeriertes; v := verhornendes; gv := gering verhornendes; tv := teilweise verhornendes; tv := teilweise verhornendes; nv := nicht verhornendes; pA := pleomorphes Adenom; nenkK := neuroendokrines nicht kleinzelliges Karzinom; PE := Plattenepithelkarzinom;
Grading (Differenzierungsgrad) nach UICC:= G1-gut differenziertes bösartiges Gewebe (low grade); G2-mäßig differenziertes bösartiges Gewebe; G3-schlecht differenziertes bösartiges Gewebe, G4-nicht differenziertes bösartiges Gewebe (high grade); G9-Grad der Differenzierung ist nicht zu beurteilen

7: **Erstdiagnose (ED)** des Primärtumors oder des Rezidivs bzw. Behandlung des Primärtumors bzw. des Rezidivs bis zum Zeitpunkt der Probenentnahme: TR := Tumorresektion; R := Radiotherapie; C := Chemotherapie; - := keine; K := **Klärungsbedarf**

Tab. 2-2 Postoperative HNSCC-Tumorpatienten (Z.n. HNSCC > 12 Monate)

Nr ₁	A ₂	G ₃	TNM ₄	Lokalisation Tumor ₅	Histologie ₆	ED bzw. Behandlungsstand ₇	Zeitpunkt der BE bzw. postop. Zeitraum ₈
TB525	46	m	pT1cN0pMx	Zungengrund -Ca li	imdvPE, G2	12/02 / TR	04/06 / 3 Jahre
TB526	67	m	pT3pN3cM0	Hypopharynx -Ca li	invPE, G2	10/02 / TR, R	04/06 / 4 Jahre
TB528	57	m	pT4pN2bcM0	Hypopharynx -Ca bds.	K	05/01 / TR, R, C	05/06 / 5 Jahre
TB768	61	m	pT1cN0cM0	Larynx-Ca Stimmlipe re	mihdmdvPE, G1-2	01/07 / TR	09/08 / 1,5 Jahre
TB777	65	m	cT3cN2bcM0	Larynx-/ Hypopharynx -Ca li	uigdvPE	06/05 / RC 2005	09/08 / 3 Jahre
TB780	67	m	pT2pN1cM0	Larynx-Ca	gvPE, G3	08/03 / TR, R	10/08 / 5 Jahre
TB781	57	m	pT1pN2acM0	Oropharynx- Ca (re Tonsille)	igvmdPE, G2	03/07 / TR, R	10/08 / 1,5 Jahre
TB783	69	m	pT2pN0cM0, pT1pN0cM0	Hypopharynx -Ca re, synchrones Mundboden- Ca li	ivumgPE, G2	08/06 / TR 09/06, R 11-12/06	10/08 / 2 Jahre
TB784	74	m	pT4pN0cM0, pT1-Rezidiv	Larynx-Ca li		98; 99 / TR, RC	10/08 / 9 Jahre
TB904	53	m	pT1pN0cM0	Hypopharynx -Ca	mdvPE, G2	09/08 / TR	06/09 / 1,5 Jahre
TB905	52	m	pT3pN3cM0	Oropharynx- Ca	gdvPE, G2	01/08 / TR, RC	06/09 / 1,5 Jahre

1: **Interne Nummerierung**; TB := Tumorblut

2: **Alter** des Patienten in Jahren zum Zeitpunkt der Probenentnahme

3: **Geschlecht** des Patienten: w := weiblich; m := männlich

4: **Klassifikation** von Tumoren nach TNM (tumor, nodes, metastases) des "American Joint Comitee on Cancer" (AJCC)

5: **Lokalisation** des Tumors vor Tumorresektion

6: **Histologie** des Tumors: mi := mikroinvasives; i := invasives; ni := nicht invasives; gd := gering differenziertes; md := mittelgradig differenziertes; hd := hoch differenziertes; u := ulzeriertes; v := verhornendes; gv := gering verhornendes; tv := teilweise verhornendes; nv := nicht verhornendes; pA := pleomorphes Adenom; nenkK := neuroendokrines nicht kleinzelliges Karzinom; PE := Plattenepithelkarzinom;

Grading (Differenzierungsgrad) nach UICC:= G1-gut differenziertes bösartiges Gewebe (low grade); G2-mäßig differenziertes bösartiges Gewebe; G3-schlecht differenziertes bösartiges Gewebe, G4-nicht differenziertes bösartiges Gewebe (high grade); G9-Grad der Differenzierung ist nicht zu beurteilen

7: **Erstdiagnose (ED)** des Tumors *bzw.* Behandlung des Patienten bis zum Zeitpunkt der Probenentnahme: TR := Tumorresektion; R := Radiotherapie; C := Chemotherapie; - := keine

8: **Zeitpunkt** der Blutabnahme liegt bei diesen Patienten im postoperativen Bereich; der postoperative Zeitraum beträgt 12 Monate bis zu 9 Jahre.

K := **Klärungsbedarf**

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturarbeiten

Allgemeines : Sämtliche Zellkultur-Arbeiten wurden an einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen mit im Dampfsterilisator autoklavierten Geräten und Laborbedarf durchgeführt. Es wurde immer nur mit einer Zelllinie unter der Sterilbank gearbeitet, um eine Verunreinigung der Zelllinien untereinander zu verhindern.

2.2.1.1 Auftauen von eingefrorenen Zellen

Zum Auftauen von Zellen wurden zunächst 10 ml im Wasserbad vorgewärmtes FCS-haltiges (10%) Nährmedium in einem Röhrchen vorgelegt. Anschließend wurden die in Kryoröhrchen tiefgefrorenen Zellen nach Entnahme aus dem -80°C-Schrank sofort im Wasserbad bei 30 °C aufgetaut und in das 10 ml vorgewärmte FCS-haltige Nährmedium überführt. Die Zellsuspension wurde bei 200 x g und 30°C, 8 Minuten abzentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde wiederholt, und nach Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpräzipitat in ein ebenfalls vorgewärmtes Kulturmedium aufgenommen und in Kulturflaschen im Brutschrank angezüchtet.

2.2.1.2 Anzucht und Kultivierung der Zellen

Bei den verwendeten Zelllinien PCI -1, PCI-13 und BHY handelt es sich um adhärent wachsende Tumorzellen aus einem Hypopharynx-, bzw. Oropharynx-Karzinom. Diese permanenten HNSCC-Zelllinien wurden als adhärente Monolayerkulturen in DMEM (*Dulbecco's Modification of Eagle Medium*)-Kulturmedium mit 4,5 mg/ml Glucose unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum

(FCS), 1mM Natrium Pyruvat und nicht-essentiellen Aminosäuren (1x) angezüchtet. Die Zellen wurden in 20 ml Medium in 75 cm² bzw. in 175 cm² Zellkulturflaschen im Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt von 5 % kultiviert.

Etwa alle zwei Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, sofern die für die entsprechende Zelllinie optimale Zelldichte nicht überschritten war. Das alte Medium wurde abgegossen, die Zellen mit ca. 10-20 ml PBS gespült, und nach leichtem Schwenken der Zellkulturflasche wurde das Nährmedium mit Hilfe einer Stabpipette vorsichtig abgesaugt und damit wurden gleichzeitig nicht adhärente Zellen entfernt. Anschließend wurde das zuvor entnommene Volumen durch frisches auf 30 °C vorgewärmtes Zellkulturmedium ersetzt.

Die Kulturen wurden bei einer Zellkonfluenz von 80-100 % in einem für die jeweilige Zelllinie optimalen Verhältnis gesplittet, um die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten. Dazu wurde zunächst ebenfalls das Kulturmedium komplett abgesaugt und mit PBS gewaschen. Anschließend wurde zum Ablösen der Zellen von der Oberfläche der Kulturflasche Trypsin-EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben und diese für 5-10 Minuten bei 37° C, 5 % CO₂ inkubiert. Trypsin ist eine Protease, die z.B. Membranproteine, welche die Haftung der Zellen an der Zellkulturflasche vermitteln, spaltet. Die Einwirkzeit des Trypsins sollte möglichst gering gehalten werden, da durch die Protease auch lebenswichtige Proteine der Zellen verdaut werden. Um diesen Vorgang zu verhindern, wurde der Grad der Ablösung regelmäßig mikroskopisch kontrolliert und das Ablösen der Zellen gegebenenfalls durch mehrfaches Klopfen an der Kulturflasche unterstützt. Nach vollständigem Ablösen der Zellen wurden dann 20 ml Zellkulturmedium zum Abstoppen der proteolytischen Funktion des Trypsins zugegeben und die gewonnene Zellsuspension zentrifugiert (200g, 8 min., 30° C, Beschleunigung 9, Bremse 9). Das Zellpellet wurde anschließend in frischem Medium resuspendiert, und nach Bestimmung der Zellzahl wurde ein Teil der Zellsuspension der Verdünnung entsprechend in neue sterile Zellkulturflaschen eingesät.

Sollten die Zellen mittels durchflusszytometrischer Methoden untersucht werden, wurde der Rest der Zellsuspension erneut zentrifugiert (200 g, 30 °C, 8 Minuten, Beschleunigung 9, Bremse 9) und das Pellet mit in PBS mit 2 % BSA, was unspezifische Bindungsstellen blockt, aufgenommen und auf Eis gelagert.

2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Alle Zellzahlbestimmungen wurden in einer Neubauer Zählkammer durchgeführt. Je nach erwarteter Zellzahl wurde die jeweilige Zellsuspension, deren Zellzahl bestimmt werden sollte, mit Medium oder Puffer verdünnt (meist 1:1000). Um zwischen toten oder apoptotischen und lebenden Zellen unterscheiden zu können, wurde 10 µl Zellsuspension mit 10 µl polyanionischem Farbstoff Trypanblau (0,1 %ige Trypanblau-Lösung) vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren vermischt und anschließend in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Vitale Zellen sind in der Lage, den Farbstoff auszuschließen bzw. ihn aktiv durch ihre Ionenkanäle auszuschleußen, und erscheinen somit unter dem Lichtmikroskop ungefärbt. Geschädigte Zellen mit veränderter Membranintegrität zeigen mikroskopisch eine dunkle Blaufärbung. Unter einem Lichtmikroskop wurde die Anzahl der lebenden Zellen in den vier Quadranten der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und anschließend gemittelt. Diese Zählung der Zellen sollte zügig innerhalb von 3-5 min nach der Zugabe des Farbstoffes erfolgen, da Trypanblau für Zellen ein zytotoxisches Agens darstellt.

Die Zellzahl konnte dann mit Hilfe folgender Formel bestimmt werden:

$$\text{Zellen pro ml} = \text{mittlere Zellzahl pro Großquadrat} \times 2 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.2.2 Zellisolierung

2.2.2.1 Ficoll Hypaque-Gradientenzentrifugation

Periphere mononukleäre Zellen (PBMC) wurden aus heparinisiertem Blut gesunder Spender („buffy coat“) mit Hilfe einer sogenannten Ficoll Hypaque-Gradientenzentrifugation gewonnen. Dieser Ficoll-Gradient trennt PBMCs durch eine isopyknische Zentrifugation, d.h. durch eine Sortierung unterschiedlicher Zellen nach deren Auftriebsdichte. Hierfür wurden jeweils 20 ml Ficoll (*LSM 1077* = *Lymphocyte Separation Medium* ; *PAA*) in 50 ml Zentrifugen-Röhrchen (*Sarstedt*)

vorgelegt. Ficoll ist ein synthetisch hergestelltes ungeladenes Polysaccharid aus Saccharose und Epichlorhydrin, das sich leicht in Wasser löst und eine spezifische Dichte von 1,077 g/ml bei 10°C besitzt. Ficoll ist in der Lage einen Dichtegradienten für die Trennung von Zellen und subzellulären Komponenten herzustellen. Die „buffy coats“ wurden 1:4 mit PBS verdünnt und auf die Ficoll-Lösung in 50 ml Zentrifugen-Röhrchen geschichtet. Anschließend wurden die Röhrchen für 30 min bei 600 x g und 24°C zentrifugiert, wobei die Beschleunigung der Zentrifuge gering (Beschleunigung 2) und die Bremse nach Ablauf der Zeit ausgeschaltet sein musste (Bremse 0). Es ergab sich eine Schichtung der Blutbestandteile in Abhängigkeit ihrer spezifischen Dichte. Die Dichte des Ficolls ist so eingestellt, dass Erythrozytenaggregate und tote Zellen, die eine höhere Dichte besitzen, die Ficollschicht passieren. Granulozyten dringen in die Ficollphase ein, während sich Lymphozyten und Monozyten hingegen in der sogenannten Interphase (leicht weiß-gelblich) direkt über dem Ficoll und unterhalb des Plasmas sammeln (Abb. 2.1).

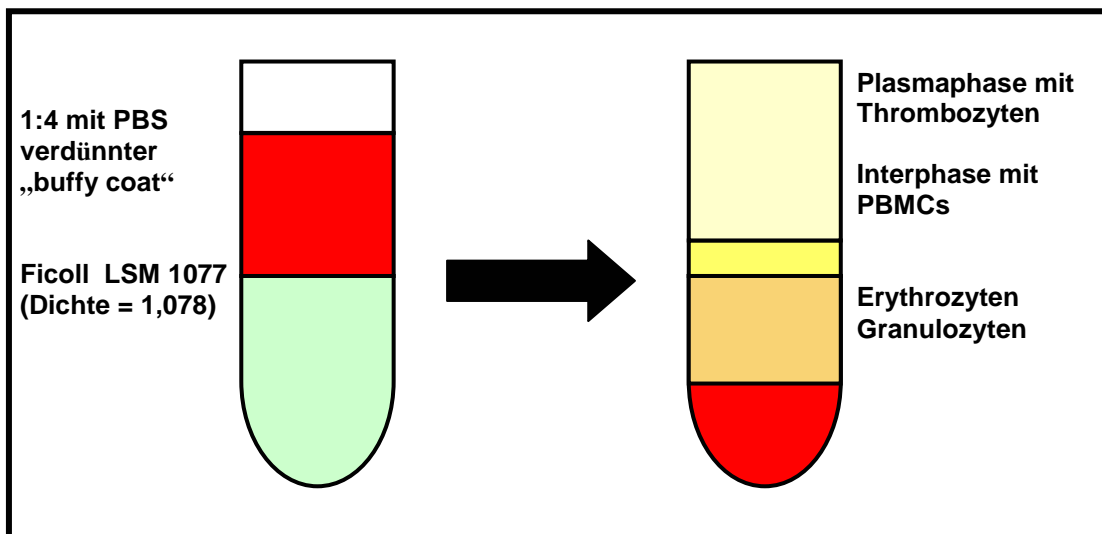


Abb. 2-1 Ficoll Hypaque-Gradientenzentrifugation

Verdünntes Vollblut (1:1 mit PBS) wird auf ein Kissen aus Ficoll-Hypaque geschichtet. Man verwendet dabei Ficoll-Hyperque mit einer größeren Dichte (1,07g/L) als Lymphozyten und Monozyten, jedoch mit einer geringeren Dichte als Erythrozyten, Granulozyten, Hefen und Zelltrümmer. Durch die Zentrifugation (30min, 600g) werden Lymphozyten, Monozyten und NK-Zellen in die Grenzschicht (gelbliche Interphase) zwischen Vollblut und Ficoll-Paque Puffer gebracht und können abpipettiert werden. Erythrozyten, Granulozyten, Hefen und Zelltrümmer wandern durch die Grenzschicht in das Ficoll, da sie eine höhere Dichte besitzen.

2.2.2.2 Isolierung von PBMCs aus „buffy coats“ gesunder Spender

Humane PBMCs von gesunden Spendern wurden aus sogenannten „buffy coats“ isoliert, welche vom Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig – Holstein, Campus Lübeck zur Verfügung gestellt wurden. Der "buffy coat" ist ein Lymphozytenkonzentrat, welches man nach dem Abzentrifugieren von Vollblut erhält und hauptsächlich aus Leukozyten und Thrombozyten besteht. Zu einem gewissen Anteil sind aber auch noch restliche Erythrozyten enthalten, weshalb sich der verwendete „buffy coat“ durch eine grau-rote Farbe auszeichnet.

Aus dem „buffy coat“ lassen sich, wie unter 2.1.2.1 beschrieben, mittels Dichtegradienten-Zentrifugation (Ficoll-Hypaque) periphere mononukleare Zellen (PBMC) des periphere Blutes isolieren, die sich entsprechend ihrer Dichte in der Interphase zwischen dem Plasma und dem Trennmedium Ficoll befinden. Diese PBMCs konnten durch vorsichtiges Absaugen der Interphase mit einer Pipette isoliert werden und wurden in 50 ml Röhrchen mit 25 ml MACS-Puffer überführt. Anschließend wurden die Röhrchen für 10 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert (Beschleunigung 9, Bremse 6). Die gewonnenen Pellets wurden in PBS suspendiert und erneut zentrifugiert. Falls noch restliche Erythrozyten im Pellet vorhanden waren, was an einer gewissen rötlichen Verfärbung zu erkennen war, wurde zur Lyse der Erythrozyten das Pellet im verbleibenden Überstand resuspendiert und die doppelte Menge an destilliertem H₂O zugegeben. Durch genau 1,10 Minuten anhaltendes Auf- und Abpipettieren wurden die Erythrozyten lysiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von PBS auf ein Endvolumen von 50 ml abgestoppt und anschließend erneut zentrifugiert (10 min, 300 x g, 4 °C, Beschleunigung 9, Bremse 6). Das entstandene Pellet wurde dann in PBS mit 2 % BSA resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und bis zur Weiterbehandlung auf Eis gelagert. Aus der jeweiligen Plasmaschicht wurden zellfreie Proben entnommen und bei -80°C eingefroren.

2.2.2.3 Isolierung von PBMCs aus peripherem Blut von HNSCC Tumorpatienten

Blutproben von HNSCC-Tumorpatienten wurden direkt mit dem CPT Vacutainer (BD Vacutainer[®] CPT[™] System) abgenommen. Das BD Vacutainer[®] CPT[™] System (Abb. 2-2) ist ein Blutentnahmeröhrchen mit einem Antikoagulant (Citrat) und einem integrierten Ficoll-Hypaque-Gradienten. Das Antikoagulant und die Dichtegradienten-Flüssigkeit werden durch eine Gelbarriere voneinander getrennt. Der CPT Vacutainer kombiniert somit die Blutentnahme mit der Gewinnung von PBMCs aus Vollblut, was ebenfalls, wie unter 2.1.2.1 beschrieben, auf der Ficoll-Gradientenzentrifugation beruht.

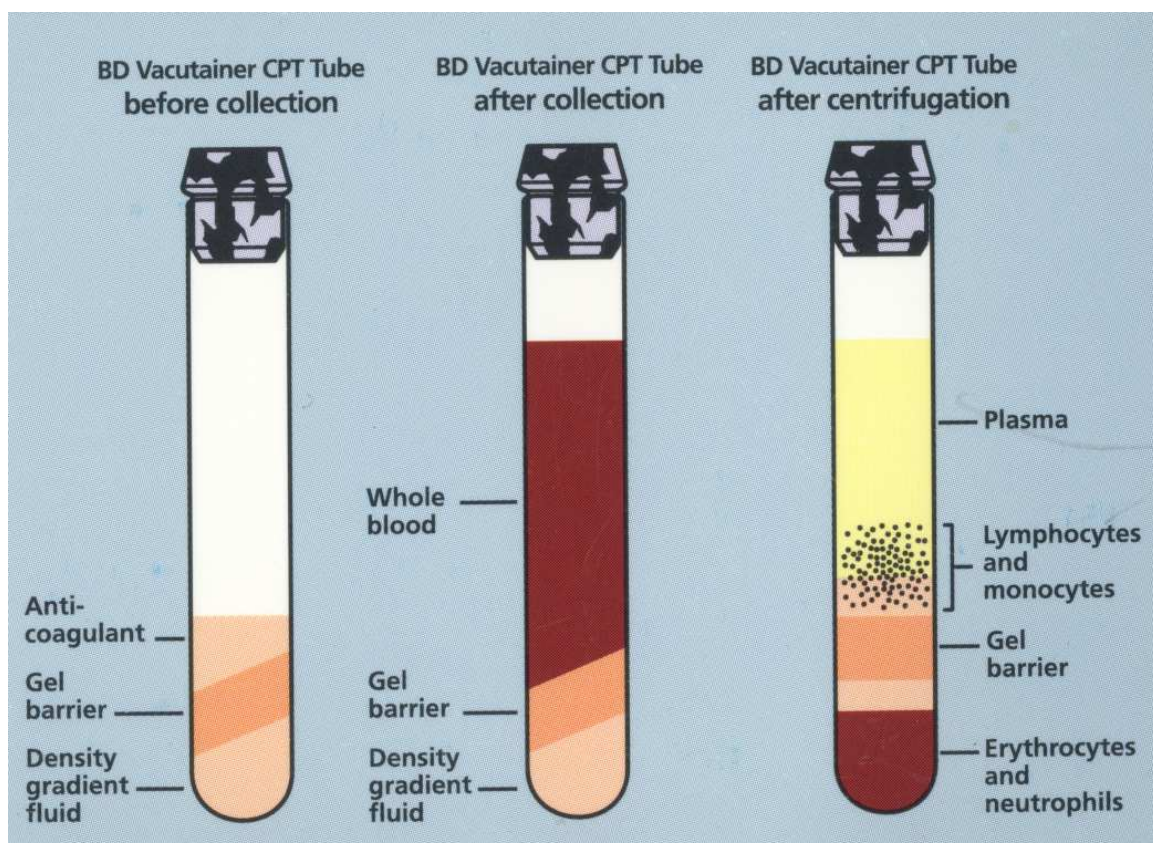


Abb. 2-2 CPT Vacutainer (BD) [Quelle: BD Vacutainer[™] CPT[™] System, For Separation of Mononuclear Cells from Whole Blood, by BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg]

Das BD Vacutainer[®] CPT[™] System ist ein Blutentnahmeröhrchen mit einem Antikoagulant (Citrat) und einem integrierten Ficoll-Hypaque-Gradienten.

Nach der Blutabnahme wurden durch Zentrifugation (20 min, 1733 x g, 24°C, Beschleunigung 2, Bremse 0) die PBMCs hier ebenfalls in der Interphase unter

der Plasmaschicht (siehe *Abb. 2-2*) angereichert. Die weitere Behandlung der Proben erfolgte analog zu 2.1.2.2 und die gewonnenen PBMCs wurden bis zur Weiterbehandlung auf Eis gelagert. Aus der jeweiligen Plasmaschicht wurden Proben entnommen und bei -80°C eingefroren.

2.2.3 Durchflusszytometrische Messungen (FACS)

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden an einem *FACSCanto™ Flow Cytometer (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg)* durchgeführt. Bei *FACSCanto™* handelt es sich um ein acht-parametrisches Analysegerät, mit dem neben den Streulichteigenschaften Zellgranularität und Zellgröße, die Fluoreszenz in bis zu sechs Wellenlängen gleichzeitig gemessen werden kann. Die Handhabung der Messungen sowie die primäre Auswertung und Darstellung der gewonnenen Daten erfolgte mit Hilfe der *BD FACS Diva™ Software Version 4.1.2 (BD Biosciences)*.

Die im Durchflusszytometer gewonnenen Werte stellen keine absoluten Werte dar, sondern relative Signalgrößen der gemessenen Zellen zueinander. In der vorliegenden Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur Charakterisierung bzw. phänotypischen Analyse von HNSCC-Tumorzelllinien und von regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut von HNSCC-Patienten und gesunden Kontrollen verwendet.

2.2.3.1 Aufbau und Prinzip des Durchflusszytometers

Bei der Durchflusszytometrie (FACS = fluorescence activated cell sorting) werden Zellen anhand ihrer Lichtstreuungseigenschaften und ihrer emittierten Fluoreszenzstrahlung charakterisiert und gezählt. Die Prinzipien dieser Methode sind anderweitig ausführlich beschrieben (Ormerod *et al.*, 1994; Haugland, 1995). Aus dem Probengefäß werden die zu untersuchenden Zellen einer Einzelzellsuspension aufgenommen und in den optischen Messbereich befördert. Hier wird jede Zelle mit einem gebündelten Argon-Laserstrahl, dessen Emissionsmaximum bei 488 nm liegt, angestrahlt. Entsprechend der

physikalischen Eigenschaften (Zellgröße, Granularität) und der Fluoreszenzmarkierung kommt es zu einer Streuung des Lichts und zur Fluoreszenzlichtemission. Durch optische und elektronische Detektoren wird diese Lichtstreuung gemessen; das nach vorn (*Forward Light Scatter, FCS*) gestreute Licht liefert Informationen über die *Größe* und das um 90° (*Sideward Light Scatter, SSC*) gestreute Licht über die *Granularität* der Zelle. Der Strahl wird also je nach Zelltyp unterschiedlich gestreut. Sowohl FCS als auch SSC sind einmalig für die einzelne Zelle und eine Kombination beider Größen erlaubt die Unterscheidung verschiedener Zelltypen in einer heterogenen Probe.

Es ist außerdem möglich durch Markierung definierter Strukturen mit unterschiedlichen Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen bestimmte Zellstrukturen eine weitere Zelldifferenzierung zu erreichen; z.B. die Expressionshöhe von Zelloberflächenmarkern oder intrazellulären Molekülen. Durch das Argon-Laserlicht werden Fluoreszenzfarbstoffe angeregt, die wiederum bei der Rückkehr in ihren energetischen Grundzustand Fluoreszenzlicht einer charakteristischen Wellenlänge emittieren, das durch verschiedene Fluoreszenz-Kanäle detektiert wird. Auf diese Weise können bestimmte Merkmal-tragende Zellen innerhalb einer gemischten Population identifiziert werden und es können Rückschlüsse auf die Expression des durch den Antikörper markierten Antigens gezogen werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind in *Tab. 2-3* dargestellt.

Tab. 2-3 Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoff	Abkürzung
Allophycocyanin	APC
Fluorescein-Isothiocyanat	FITC
Phycoerythrocyanin	PE
R-phycoerythrin, cyanine dye Cy	PeCy7
Peridinin-Chlorophyll	PerCP
Propidiumiodid	PI

2.2.3.2 Vorbereitung und Messung der Proben

Die Probenvorbereitung für die Messung im FACS wurden, wenn nicht anders genannt, auf Eis durchgeführt, und die verwendeten Reagenzien wurden gekühlt verwendet.

Von den zu messenden Zellen, dessen unspezifische Bindungsstellen zuvor mit 2% BSA geblockt wurden, wurden jeweils 2×10^5 Zellen pro Reaktionsgefäße in 100 μ l PBS überführt. Um die Zellen im FACS untersuchen zu können, wurden sie mit Primär-Antikörpern markiert, an die fluoreszierende Farbstoffe gekoppelt sind. Dafür wurden pro vorgelegten 2×10^5 Zellen 2 μ l der unter 7.1.1.7.1 aufgelisteten Primär-Antikörper eingesetzt.

Proben mit Antikörpern gegen extrazelluläre Strukturen auf der Zelloberfläche wurden wie folgt vorbereitet: Nach Hinzufügen von 2 μ l der jeweiligen Fluoreszenz-markierten Primär-Antikörper wurden die Zellen 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 500 μ l PBS mit 2 % BSA zugegeben und abzentrifugiert (2000 Upm, 8 min, 4 °C). Die Pellets wurden in 500 μ l PBS resuspendiert und bis zur Messung im Durchflusszytometer abgedunkelt auf Eis aufbewahrt.

Die Vorbereitung der Proben für die Messungen mit dem Antikörper (*Anti-CCL22/MDC*; R&D Systems GmbH) gegen intrazelluläres CCL22 und dem korrespondierendem Sekundär-Antikörper erfolgte wie unter 2.1.4 beschrieben. Für die extrazelluläre Messung von CCL22 wurde der Antikörper ohne vorherige Anwendung von Saponin verwendet.

Um die Expression des intrazellulären Treg-Markers FOXP3 im Durchflusszytometer messen zu können, wurde für die jeweiligen Proben das *FOXP3 Flow Kit* von BioLegend (*PE anti-human FOXP3 Flow Kit*) gemäß der Gebrauchsanweisung des Herstellers verwendet. Das Kit enthält ein *FOXP3 Fix/Perm Puffer Set*, das zur Permeabilisierung der Zellmembran führt und somit Antikörper (FOXP3-Antikörper und die passende Isotyp-Kontrolle (Maus IgG₁, κ)) in die Zelle eindringen lässt.

Vor der FACS-Messung muss eine sog. Kompensation durchgeführt werden, da bei der Verwendung verschieden Fluoreszenz-markierter Antikörper in einer Probe gemeinsame Überlappungen der Emissions-Spektren bestehen können. Bei der

Kompensation wird berechnet, wie viel Interferenz ein Fluorochrom in einem Kanal hat, in dem es nicht spezifisch gemessen werden soll. Durch eine Kompensation wird diese Überschneidung herausgerechnet, indem eine Geräteeinstellung auf Farbstoffe einzeln erfolgt, und somit werden Fehler in den folgenden Messungen ausgeglichen. Die Kompensationsparameter werden anschließend für alle Messungen beibehalten. Zudem wurden vor der Messung im FACS Geräte-Messparameter anhand von Kontrollzellen eingestellt, die ebenfalls für die zu messenden Zellen beibehalten wurden (*Tab. 2-4*).

Da sowohl Zellen als auch Antikörper eine unspezifische Eigenfluoreszenz besitzen, ist es bei den Messungen im FACS erforderlich, diese unspezifische Fluoreszenz mit in die Auswertung einzubeziehen, um falsch-positive Ergebnisse zu verhindern. Um die spezifische Bindung der Antikörper von der unspezifischen differenzieren zu können, erfolgten vor der FACS-Messung mit den einzelnen Antikörpern Messungen mit Isotyp-Kontrollen (siehe 7.1.1.7.3). Die Isotyp-Kontrollen sind Fluoreszenz-markierte Antikörper, die an entsprechende Antigene binden. Die vom Durchflusszytometer gemessene Eigenfluoreszenz der Zellen mit dem Antikörper ist die Negativ-Kontrolle. Alle Fluoreszenzsignale oberhalb dieses Negativbereichs gelten als „positiv“. Zudem wurden als weitere Negativ-Kontrollen Proben ohne Antikörper mitgeführt.

Außerdem wurden Proben mit 5 µl Annexin V-FITC und 5 µl Propidiumiodid (PI) (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit II; BD Biosciences) inkubiert, um apoptotische bzw. nekrotische Zellen zu markieren. Annexin bindet bei Verlust der Membranintegrität an Phosphatidylserin (PS), das während der Apoptose von der Innenseite, wo es sich bei lebenden Zellen befindet, auf die Außenseite der Membran transloziert wird. PI diffundiert bei gestörter Barrierefunktion der Zellmembran in den Zellkern nekrotischer Zellen und interkaliert dort mit der DNA. Interkaliertes Propidiumiodid weist einen Emissionspeak von 650 nm auf und kann so im Durchflusszytometer detektiert werden (Schmid *et al.*, 1992).

Tab. 2-4 Einstellungen der FACS-Messparameter

Detektor	Spannung (bei Analysen von HNSCC-Zelllinien)	Spannung (bei Analysen von PBMC)
FCS	22	82
SSC	284	362
APC	522	627
FITC	385	484
PE	379	508
PeCy7	709	841
PerCP	496	694

2.2.3.3 Auswertung der Proben

Zur Datenauswertung der durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde das Programm *BD FACS Diva™ Software Version 4.1.2* benutzt. Die Darstellung der Messungen kann auf zwei Wegen erfolgen: Zum einen kann die Präsentation der Ergebnisse der Messungen als zweidimensionales Dot-Plot-Fenster (Punktwolkendiagramm) dargestellt werden. Im Dot-Plot-Fenster wird jedes Messsignal eines Ereignisses, wie z.B. Zellen oder Zelltrümmer, als einzelner Punkt wiedergegeben und ist abhängig von seiner Fluoreszenz und Größe bzw. Granularität. Dieses Punktwolkendiagramm entsteht durch Auftragen der Streulichtarten SSC gegen FSC oder durch einen spezifischen Zelloberflächenmarker gegen FCS auf Ordinate und Abszisse. Durch diese Darstellung, in Abhängigkeit von den jeweiligen Zelleigenschaften und der Fluoreszenz, lassen sich verschiedene Populationen im Blut darstellen und voneinander differenzieren (siehe *Abb. 2-3*).

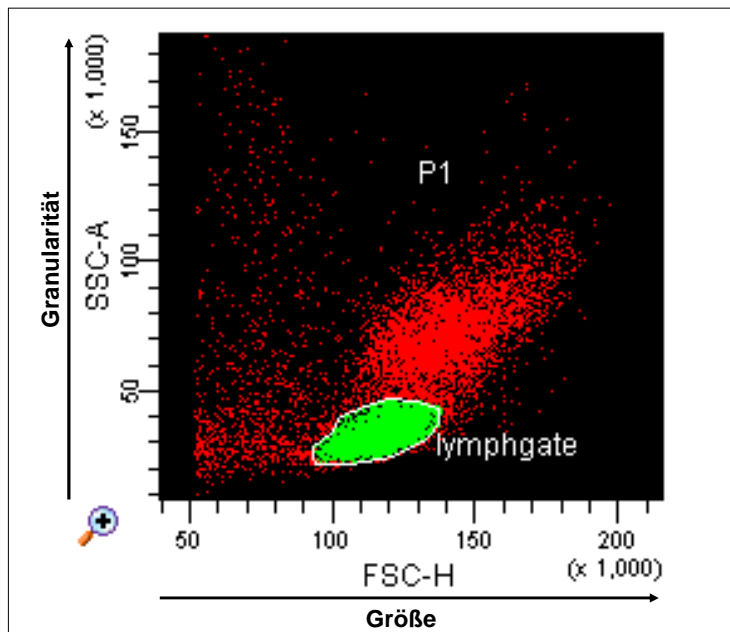


Abb. 2-3 Darstellung der PBMCs in einem Dot-Plot-Fenster

Bei dieser Darstellung wird jedes Messsignals eines Ereignisses, wie z.B. Zellen oder Zelltrümmer, als einzelner Punkt wiedergegeben und ist abhängig von seiner Fluoreszenz und Größe bzw. Granularität. Dieses Punktwolkendiagramm entsteht durch Auftragen der Streulichtarten SSC gegen FSC oder durch einen spezifischen Zelloberflächenmarker gegen FCS auf Ordinate und Abszisse. Durch diese Darstellung, in Abhängigkeit von den jeweiligen Zelleigenschaften und Fluoreszenz, lassen sich verschiedene Populationen im Blut darstellen und voneinander differenzieren.

Die andere Möglichkeit, gemessene Daten darzustellen, besteht aus einem Histogramm. Darin werden die Fluoreszenzintensitäten der Zellen auf der Abszisse (logarithmisch) gegenüber der Anzahl der Zellen auf der Ordinate (linear) aufgetragen.

In einer tabellarischen Quadrantenstatistik wird die quantitative Auswertung der FACS-Messungen aufgeführt und sie liefert einen Überblick über die Anzahl der Ereignisse („events“) innerhalb der vier Quadranten eines Dot-Plot-Fensters. Die verwendete Auswertungssoftware *BD FACS DIVA™* errechnet den prozentualen Anteil der Ereignisse in den einzelnen Quadranten und definierten Fenstern an der Bezugspopulation. Zudem wurden in dieser Arbeit die Ereignisse z.T. in Form von Angabe der „Mean Fluorescence Intensity“(MFI) angegeben. MFI ist ein Maß, das das Ausmaß der Adhäsion von Antikörper und somit das Expressionslevel und vor allem Veränderungen dieses Levels reflektiert (Hevessy *et al.*, 2005).

Wichtiger Bestandteil der FACS-Auswertung ist außerdem der Ausschluss von Zelldebris, toten apoptotischen und nekrotischen Zellen, die im FCS-/SSC-Dot-

Plot-Fenster ebenfalls als Ereignisse in Form von Punkten angegeben werden. Dieser Ausschluss des Zelldebris erfolgt zum einen über die Färbung der Proben mit dem Annexin-FITC und Propidiumiodid, wie unter 2.1.3.2 beschrieben. Lebende Zellen sind Annexin-negativ und PI-negativ, apoptotische Zellen Annexin-positiv und PI-negativ, nekrotische Zellen sind Annexin-positiv und PI-positiv.

Bei unseren Messungen zeigte sich der Zelldebris vor allem im unteren linken Quadranten. Unter Zuhilfenahme eines festgelegten Schwellenwertes (Threshold) anhand des FCSs (Threshold: FCS von 50000) im FCS-/ SSC-Dot-Plot-Fenster wurden Zelltrümmer, tote Zellen und Verunreinigungen von der nachfolgenden Auswertung ausgeschlossen.

2.2.4 Inkubation von HNSCC-Zelllinien mit Interferon-gamma und Messung der CCL22-Produktion der HNSCC im FACS

Die in Zellkulturflaschen kultivierten permanenten HNSCC-Zelllinien PCI-1 und PCI-13 wurden bei einer Konfluenz von ca. 80-100 %, wie unter 2.1.1.2 beschrieben, gesplittet. Anschließend wurde die Anzahl der Zellen, die für die Inkubation mit IFN- γ verwendet werden sollten, mit PBS aufgenommen. Die beiden steril bearbeiteten HNSCC-Zelllinien wurden dann getrennt in 5 ml DMEM-Medium in 6-Well Gewebekultur-Platten mit flachem Boden überführt. Pro Well befanden sich 2×10^5 PCI-1-, bzw. PCI-13-Zellen. Nach Zugabe von 2 μ l rekombiniertem Interferon-gamma (*Biosource*) mit einer Konzentration von 4000 pg/ml pro Well wurden die Zellen im Brutschrank bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt von 5 % inkubiert. Diese Inkubation wurde zu bestimmten festgelegten Zeitpunkten gestoppt, und zwar nach 12, 48 und/oder 72 Stunden. Die Überstände wurden zunächst entfernt, zentrifugiert und der zellfreie Bestandteil bei -80°C eingefroren. Dann wurden die Gewebekultur-Platten mehrmals mit 5 ml PBS gewaschen, um das gesamte IFN- γ von den Zellen zu entfernen. Zum Loslösen der Zellen von den Gewebekultur-Platten wurde Trypsin hinzugefügt. Anschließend wurde das Trypsin direkt mit DMEM-Medium geblockt, und die Zellen, die sich noch nicht von der Unterlage gelöst hatten, wurden vorsichtig mit einem Zellschaber abgetragen. Es folgte eine Zentrifugation (1000

Upm, 8 min, 4°C), und danach wurde das Zellpellet mit 5 ml PBS mit 2 % BSA resuspendiert. Grundsätzlich wurde auf Eis gearbeitet und das verwendete PBS wurde gekühlt. Nach einer erneuten Zellzahlbestimmung wurden pro Reaktionsgefäß 2×10^5 Zellen in 500 µl PBS eingesetzt und bei 2000 Upm für 8 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert. Nach diesem Versuchsschritt wurde das Pellet mit 100 µl PBS resuspendiert und 100 µl 0,1 %-iger Saponin-Puffer (0,1% Saponin, PBS und 1% hitzeinaktiviertes FCS) oder Fix/Perm Buffer Set wurden hinzugefügt, um eine intrazelluläre Antigenmarkierung mit einem Antikörper gegen CCL22 (Maus Anti-CCL22/MDC Antikörper; *R&D Systems GmbH*) zu ermöglichen. Saponin ist ein Glycosid mit einer hohen Affinität zu Cholesterol. Durch die Interaktion zwischen dem Glykosid und dem Cholesterol in der Zellmembran kommt es zur Porenbildung, die Membran wird permeabilisiert, und somit können Antikörper in die Zelle eindringen und an intrazelluläre Antigene binden. Anschließend wurden die Proben mit je 2 µl Anti-CCL22/MDC Antikörper zusammen mit dem vorher hinzugefügten Saponin für 25 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Für die extrazelluläre Messung von CCL22 wurde nur der Antikörper ohne vorherige Inkubation mit Saponin verwendet. Im Folgenden wurde nach Zugabe von 500 µl PBS erneut zentrifugiert (2000 Upm, 8 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl PBS resuspendiert. Da der verwendete Primärantikörper (Spezifität Maus IgG2B) ein unmarkierter Antikörper war, wurden nun 2 µl eines mit dem Fluochrom APC-, oder PE-konjugiertem Sekundärantikörper (*APC- Goat anti-mouse Ig; PE- Goat anti-mouse Ig; BD PharmingenTM*) zugegeben und für weitere 25 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde erneut 500 µl PBS zu den Proben hinzugefügt und zentrifugiert (2000 Upm, 8 min, 4 °C). Die Pellets wurden in 500µl resuspendiert und bis zur Messung der MFI im FACS abgedunkelt auf Eis aufbewahrt.

Pro Inkubationsdauer der HNSCC-Zelllinien mit IFN wurden mindestens fünf Messungen durchgeführt. Zur Kontrolle wurde in diesem Versuch eine Probe ganz ohne Antikörper inkubiert, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Außerdem wurde auch eine Isotyp-Kontrolle durchgeführt.

2.2.5 Western Blot-Analyse

2.2.5.1 Proteinpräparation aus Zellen

Die Proteinpräparation wurde, wenn nicht anders erwähnt, auf Eis durchgeführt. Die in Zellkulturflaschen (T75, Sarstedt) kultivierten permanenten HNSCC-Zelllinien PCI-1, PCI-13, BHY, Cal-27 und die Zelllinien MCF-7 und HaCat wurden bei einer Konfluenz von ca. 80-100 % geerntet. Zunächst wurde das Zellkulturmedium abpipettiert; danach wurden die Zellen unter vorsichtigem Schwenken der Zellkulturflasche mit 10 ml PBS (gekühlt) gewaschen und das PBS wieder entfernt. Anschließend wurden 200-500 µl Ripa-Puffer mit Zusätzen in die Zellkulturflasche gegeben. Die Menge an Ripa-Puffer mit Zusätzen ist abhängig von der Konfluenz der Zellen, es sollte aber eher weniger eingesetzt werden, da man ansonsten die Proteinkonzentrationen am Ende zu stark verringert. RIPA-Puffer bedingt die Lyse von Zellen und stellt ein Extraktionsmedium für membranassoziierte, zytosolische oder nukleäre Antigene dar. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Flasche abgelöst und in Zentrifugenröhrchen überführt. Je nach Pelletgröße wurden die Zellen zusätzlich mit einer Insulinspritze aufgeschlossen. Diese Zellsuspension wurde dann auf Eis für ca. 2 Stunden inkubiert und danach für 5 Minuten bei 4°C und 10000 Upm zentrifugiert. Der hierdurch gewonnene Überstand enthält die zu untersuchenden Proteine. Er wurde in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und auf Eis gestellt. Zur anschließenden Bestimmung der Proteinkonzentration, die eine Voraussetzung für die gleichmäßige Beladung bei der Größenfraktionierung der Proteine durch die Gelelektrophorese ist, wurde die *Bradford-Methode* (Bradford, 1976) angewendet. Der Bradford-Test ist eine spektrophotometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen, der mit Hilfe des Bio-Rad Quick Start Bradford Protein Assays durchgeführt wurde. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Volumen der Überstände bestimmt. Die Überstände wurden dann mit dem gleichen Volumen an 2-fach SDS-Puffer versetzt und bei 65°C für 15 Minuten in einem Heizblock aufgeköcht. Hierdurch wurde das Protein denaturiert. Die Extinktionsmessung fand mit einem

automatischen UV-Spektrometer statt. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.5.2 Proteinpräparation aus Gewebe

Die Proteinpräparation wurde auf Eis durchgeführt. Die nativen Gewebeproben wurden aus dem Flüssigstickstoff entnommen und ca. 100-150 µg davon zusammen mit einer kleinen Stahlkugel (*Sarstedt*) in Eppendorfröhrchen überführt. Anschließend wurden die Proben in Kassetten eines TissueLyser (*Qiagen*) eingespannt und zweimal für 2:30 min bei 25 Hz homogenisiert. Danach wurden die Proben kurz runterzentrifugiert (ca. 5 sek bei 3000 x g und 4 °C). Das Pellet wurde dann in 5 Volumina (1ml bei 200 µg Gewebe) RIPA-Puffer mit Zusatz von Proteinase-Inhibitoren resuspendiert. Die Zellen wurden durch eine feine Nadel (21 Gauge) 5-10 mal aufgezogen, um die Zellmembranen der Zellen zu zerstören. Anschließend wurde das Lysat für 20 min bei 4 °C und 10000 x g zentrifugiert, der Überstand dann in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und nochmals für 1 h bei 4 °C und 10.000 g zentrifugiert. Der hierdurch gewonnene Überstand enthält die zu untersuchenden Proteine. Er wurde in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und auf Eis gestellt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte auch hier, wie unter 2.1.5.1 beschrieben ist.

2.2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Nach Proteinpräparation und Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Auftrennung der zu untersuchenden Proteine nach ihrer Größe und relativen Molekülmasse mittels *SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)* nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. In der SDS-Page wandert der SDS-Proteinkomplex im elektrischen Feld zum positiven Pol (Anode), wobei die zurückgelegte Laufstrecke des Proteins proportional zum Logarithmus der relativen Molekülmasse ist.

Das SDS-Polyacrylamid-Gel besteht aus einem Sammelgel und einem Trenngel (Herstellung der Gele: siehe *Tab. 2-5*). Im Sammelgel werden die Proteine

zunächst fokussiert und wandern dann ins Trenngel. Zum Gießen der Gele wurde das *Mini-PROTEAN 3Cell-Gelkassetten*system (Bio-Rad) benutzt. Die Stärke des Trenngels betrug 1,5 mm und zumeist wurden ein 12,5-%iges Trenngel und ein 4-%iges Sammelgel verwendet. Die Elektrophoresekammer (BIORAD, Mini-PROTEAN) wurde mit einem Elektrophoresepuffer aufgefüllt und 60µg Protein wurden pro Sammelgeltasche pipettiert. Falls das Proteingemisch nach ein paar Monaten das erste Mal wieder oder überhaupt das erste Mal benutzt wurde, ist das Gemisch vor dem Auftragen für 5 Minuten in einem 100°C-Heizblock erhitzt worden. Die Separation der Proteine erfolgte bei 220 V und 120 mA. Durch Mitführen von Standardproteinen (*Precision plus protein standards* „Kaleidoscope“ oder *Prestained SDS Page Standard*; Bio-Rad) mit bekanntem Molekulargewicht lässt sich das Molekulargewicht von unbekanntem Proteinen ermitteln und kontrollieren.

Tab. 2-5 : Zusammensetzung der verwendeten SDS-Polyacrylamid-Gele

Gelbestandteile	Trenngel		Sammelgel
	10 %*	15 %*	4 %*
1 M Tris-HCL pH 8,8	4 ml	6 ml	-
1 M Tris-HCL pH 6,8	-	-	0,6 ml
1 % SDS	1 ml	1,5 ml	0,5 ml
Acrylamid	3,3 ml	4,95 ml	0,7 ml
Dest. H ₂ O	1,7 ml	2,55 ml	3,2 ml
APS 10 %	100 µl	150 µl	50 µl
TEMED	10 µl	15 µl	5 µl

*Prozentualer Acrylamidanteil im Gel ;

Die Mengenangaben für die einzelnen Bestandteile des Trenngels entsprechen den benötigten Mengen für ein 1,5 mm dickes Gel. TEMED und 10-%iges APS wurden als Katalysator und zur Stabilisation der Polymerisation direkt vor dem Gießen des Gels zugegeben.

2.2.5.4 Protein-Transfer mit Semi-Dry-Verfahren

Nach der Auftrennung im SDS-Gel wurden die Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Blot-Membran aus Nitrocellulose (*Bio-Rad*) mittels Elektro-Blot (*Semi-Dry-Blotapparatur*, *BioRad*) übertragen. Die Nitrocellulose-Membran bindet die Proteine aufgrund hydrophober Wechselwirkungen (Towbin *et al.*, 1979), wobei das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten bleibt. Die Blot-Membran wurde auf drei Lagen Whatman-Papier (*Bio-Rad*), das vorher mit Kathodenpuffer (*1 x Roti-Blot K*, *Roth*) getränkt worden war, gelegt, und darüber folgte das Trenngel. Luftbalsen zwischen Membran und Gel sollten

entfernt werden. Drei weitere Lagen Whatman-Papier wurden in Anodenpuffer (1 x *Roti-Blot A, Roth*) getränkt und anschließend auf das Gel gelegt. Das entstandene „Sandwich“ wurde dann zwischen den zwei Flächenelektroden der Blotkammer eingespannt, und der Transfer der Proteine erfolgte bei 80 mA (1 Gel) bzw. 120 mA (2 Gele) für 90 min.

2.2.5.5 Nachweis von Proteinen durch Antikörper

Die Proteinbanden auf der Membran wurden nach dem beendeten Protein-Transfer mit Hilfe spezifischer monoklonaler Antikörper identifiziert. Zur Kontrolle des erfolgreichen Proteintransfers und der Gleichmäßigkeit der Proteinbeladung wurde die Membran mit Ponceau-S-Lösung (*Roth*) gefärbt. Die in der Ponceau-S-Lösung enthaltene Trichloressigsäure fixiert außerdem die Proteine auf der Membran. Um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu vermeiden, wurde die Membran zunächst für 60 Minuten mit 3-%iger Milchpulver/PBS-Lösung (*Blocking buffer*) abgesättigt. Anschließend wurde das Milchpulver entfernt und die Blots 10 Minuten mit 10 ml PBS inkubiert. Für die nachfolgende Antikörperbindung wurde der betreffende Primär-Antikörper (*Anti-CCL22/MDC, R&D Systems; Anti-β-Actin, Abcam*) in Milchpulver/PBS-Lösung verdünnt (je Blot 10-20 µl Antikörper in 10 ml 3-%iger Milchpulver/PBS-Lösung) und auf der Membran für 2h bei 4°C inkubiert. Um ungebundene Antikörper danach zu entfernen, wurde die Membran 3x5 Minuten mit PBS-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran 2 h lang bei Raumtemperatur mit einem mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Sekundär-Antikörper (*Goat anti-Mouse IgG*), der sich gegen den Primär-Antikörper richtet, auf dem Schüttler inkubiert. Zu diesem Zweck wurde der Sekundär-Antikörper in Milchpulver/PBS-Lösung verdünnt (je Blot 3,5 µl Antikörper in 10 ml 3-%iger Milchpulver/PBS-Lösung). Nach dreimaligen Waschen der Membran für je 5 min mit PBS erfolgte die Visualisierung der Bindestellen des Sekundärantikörpers mit Hilfe des *Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kits (BioRad)* nach den Angaben des Herstellers. Die an den Sekundär-Antikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase setzt Substrate um, die im Kit enthalten sind, und dies resultiert in einem sichtbaren Farbkomplex und ermöglicht so den Nachweis der Proteine.

Bei jedem durchgeführten Western-Blot wurde die Expression des *Housekeeping-Gens* β -Actin (*loading control*) analysiert, um Unterschiede in der Proteinbeladung der einzelnen Banden zu berücksichtigen. Zudem wurden mit Hilfe des bekannten Molekulargewichts von β -Actin (42 kDa) die gewonnenen Banden von zu untersuchenden Proteinen verifiziert.

2.2.6 Quantitative Bestimmung von CCL22 mittels ELISA

2.2.6.1 Vorbereitung und Messung der Proben

Die quantitative Bestimmung des Chemokins CCL22 (MDC) im Serum von 19 HNSCC-Tumorpatienten und 21 gesunden Kontroll-Blutspendern wurde mit *Quantikine[®] Human MDC Immunoassay* von *R&D Systems* gemäß Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dieser Immunoassay benutzt die Sandwich-ELISA-Technik, bei der zwei Antikörper verwendet werden, die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen (hier CCL22) binden.

Vor Beginn des Versuchs wurde aus dem Kalibrator (*Calibrator Diluent RD6-21*) mit einer MDC Standard-Stammlösung eine Standardreihe angesetzt, um eine Kalibrierungskurve für das gemessene Signal (optische Extinktion) zu erhalten. Das Mitführen des Kalibrators, der in der Standardreihe als Substratleerwert gilt, dient als Ausgleich von Testschwankungen und zur Überprüfung der Qualität der Messung.

Pro Probe und Standardverdünnung wurden 2 Messungen durchgeführt, d.h. jeweils 2 Wells enthielten dieselbe Probe bzw. Standardverdünnung.

In jedes Well der Mikrotiterplatte des Immunoassays wurde zuerst 100 μ l Assay Diluent RD1-45 pipettiert, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Anschließend wurden 100 μ l des MDC Standards (Standardverdünnung) bzw. 100 μ l der zu messenden Probe in die Wells überführt und 2 Stunden bei 2-8°C inkubiert. Während dieser Zeit bindet der an die Platte gebundene Antikörper das in der Probe vorhandene Antigen (CCL22). Nach Ablauf der Inkubationsphase wurden die Wells viermal mit je 400 μ l Wash-Buffer mit Hilfe einer Mehrkanalpipette sorgfältig gewaschen und der Wash-Buffer anschließend komplett entfernt. Die ungebundenen Bestandteile der Probe wurden dadurch

entfernt, und zurück blieb nur das am (coating-) Antikörper gebundene Antigen. Im nächsten Schritt wurden 200 µl *MDC Conjugate* in jedes Well pipettiert und für weitere 2 Stunden bei 2-8°C inkubiert. *MDC Conjugate* stellt einen monoklonalen Detektions-Antikörper dar, an dessen Ende ein Enzym, hier die Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase), gebunden ist. Dieser zweite Antikörper bindet ebenfalls an das Antigen und so entsteht der Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex (Sandwich). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde durch erneutes Waschen (viermal mit je 400 µl Wash-Buffer) der Wells überschüssiger zweiter Antikörper ausgewaschen. Anschließend wurden 200 µl *Substrate Solution* hinzugefügt und für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. *Substrate Solution* stabilisiert die Peroxidase und enthält ein zu diesem Enzym passendes Substrat (Chromogen Tetramethylbenzidin). Dieses wird vom Enzym zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt, dessen Nachweis durch Farbumschlag (von farblos zu blau) erfolgt. Dieser Farbumschlag ist proportional zur CCL22-Menge (pg/ml) in den einzelnen zu messenden Proben. Die Farbentwicklung wurde durch die Zugabe von 50 µl *Stop Solution* (2 N Schwefelsäure) beendet, und durch den niedrigen pH-Wert wurde der Farbumschlag von blau (630 nm) nach gelb (450 nm) bedingt. Anschließend wurde innerhalb von 30 Minuten mittels eines *Microplate Spectrophotometer* (*Microplate Manager Software; Bio-Rad*) die optische Dichte (proportional zum Farbumschlag) bei 450 nm bestimmt. Die Messwerte wurden gegen die Korrekturwellenlänge 570 gemessen. Mit diesem ELISA lassen sich CCL22 Konzentrationen in Proben bis zu einem Konzentrations-Minimum von 62,5 pg/ml bestimmen.

2.2.6.2 Auswertung der Messungen

Die Auswertung der Daten wurde mit Hilfe von Microsoft Excel durchgeführt. Die Bestimmung der CCL22-Konzentration in den einzelnen zu untersuchenden Serumproben aus den Werten der optischen Dichtemessung erfolgte anhand einer Standard-Eichkurve. Diese Standard-Eichkurve wurde durch das Auftragen der Extinktion (optische Dichte bei 450 nm) auf der y-Achse gegen die MDC Konzentration (pg/ml) der einzelnen Standardverdünnungen auf der x-Achse

erstellt. Da von der jeweiligen Standardverdünnung und den Proben Doppelwertbestimmungen durchgeführt worden sind, musste vor der Auswertung die Messergebnisse der optischen Dichtemessung gemittelt werden und anschließend der Substratleerwert von allen Messergebnissen abgezogen werden. Zur Bestimmung der Konzentrationen der einzelnen Proben aus der Eichkurve wurde eine Ausgleichsgerade für die Standardwerte gezogen. Mit Hilfe dieser Geraden ließen sich die jeweiligen CCL22-Konzentrationen durch Einsetzen der gemessenen optischen Dichte für y errechnen.

2.2.7 Statistische Auswertung der beobachteten Ergebnisse

Statistische Analysen wurden mit den Softwareprogrammen *SPSS 12.0 für Windows* (SPSS Inc., Chicago, USA), *SigmaPlot 10.0* (Systat Software Inc) und *Office 2003* (Microsoft Corporation, Redmont, USA) durchgeführt. Falls nicht anders beschrieben, handelt es sich bei den dargestellten Werten um arithmetische Mittelwerte aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten, wobei die Standardabweichung als Fehlerindikator eingesetzt wurde. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten statistischen Tests werden im Folgenden kurz erläutert: Die gewonnenen Ergebnisse wurden mit Hilfe des *Kolmogorov-Smirnov-Tests* hinsichtlich ihrer Normalverteilung untersucht. In Abhängigkeit des Ergebnisses wurden dann verschiedene statistische Tests ausgewählt, um signifikante Unterschiede innerhalb der verschiedenen Gruppen zu objektivieren. Im Falle einer Normalverteilung der Probenwerte wurden die Unterschiede zwischen zwei Stichproben mittels des *T-Tests für unabhängige Stichproben* auf Signifikanz (hoch signifikant: $p < 0,01$; signifikant: $0,01 \leq p \leq 0,05$; Trend: $0,05 < p < 0,1$) überprüft. Waren die Probenwerte nicht normal verteilt, wurde zur Überprüfung auf signifikante Unterschiede der *Mann-Whitney-U-Test* angewandt.

3 Ergebnisse

3.1 Treg Zellen - Analyse der Population innerhalb der PBMCs

Aufgrund der massiv unterdrückte Anti-Tumor-Immunität in Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCC) sollte in dieser Arbeit umfassend die Rolle regulatorischer T-Zellen in Patienten mit HNSCC analysiert und dargestellt werden. Zu diesem Zweck wurden Tumorpatienten mit einem Kopf-Hals-Tumor (HNSCC), die entweder eine aktive HNSCC-Erkrankung aufwiesen oder bereits einer onkologischen Therapie zugeführt worden waren, hinsichtlich des Vorkommens und der Anzahl regulatorischer $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ T-Zellen mittels Durchflusszytometer (FACS) untersucht. Zudem sollte eine eventuelle langfristige Beeinflussung des Immunsystems bezüglich der Treg Zellen durch HNSCC analysiert werden.

3.1.1 Definition (Gating-Strategie) von regulatorischen T-Zellen ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$) durch die α -Kette des IL-7 Rezeptors (CD127)

Der Schwerpunkt dieser Doktorarbeit lag auf der Untersuchung von $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ regulatorischen T-Zellen innerhalb der PBMCs von HNSCC Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Laut der Literatur müssen die sogenannten suppressiven $CD4^+CD25^{high}$ Treg Zellen mit einer hohen Expression des Markers CD25 von den aktivierten $CD4^+CD25^{low}$ T-Zellen ohne regulatorische Aktivität abgegrenzt werden (Baecher-Allan und Anderson, 2006a). Somit bestehen die humanen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen aus zwei verschiedenen Populationen.

Neben einer hohen stetigen Expression von CD25, der α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors, weisen Treg Zellen im Gegensatz zu aktivierten T-Zellen zudem eine

niedrige Expression von CD127 (CD127^{low}), der α -Kette des Interleukin-7 Rezeptors, auf (Liu *et al.*, 2006; Hartigan-O'Connor *et al.*, 2007). Demzufolge erlaubt die Kombination von einer niedrigen CD127- (CD127^{low}) und einer hohen CD25- (CD25^{high}) Expression eine spezifische Analyse (Hartigan-O'Connor *et al.*, 2007) der suppressiven Treg Zellen im Durchflusszytometer.

In dieser Doktorarbeit wurden - wie bereits beschrieben - PBMCs aus Blutproben von Patienten mit HNSCC und gesunden Vergleichskontrollen gewonnen und mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern gegen die typischen Treg-Oberflächenrezeptoren CD4⁺, CD25⁺ und CD127⁺ markiert. Anschließend wurden im Durchflusszytometer innerhalb dieser markierten PBMC-Population die Anzahl und der Phänotyp der regulatorischen T-Zellen anhand von stringenten Gating-Kriterien analysiert (Abb. 3-1). Diese so sogenannten Analyse-Gates waren innerhalb der PBMCs auf die Population der Lymphozyten, die durch die Streulichtarten FCS (Forward Light Scatter) und SSC (Sideward Light Scatter) eindeutig charakterisiert werden konnten, beschränkt (Abb. 3-1a). Durch das Setzen von weiteren Gates war die Bestimmung der Population der CD4⁺- und CD4⁺CD25⁺ T-Zellen möglich (Abb. 3-1b bis d). Innerhalb der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen wurden anschließend CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Treg-Zellen identifiziert, indem die im Dot-Plot-Fenster sichtbare und deutlich von den restlichen Zellen abgrenzbare Population der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen mit einer mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von CD127 ≤ 60 als CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Treg-Zellen klassifiziert wurden. MFI stellt ein Maß für die Adhäsion von Antikörpern und somit für die Expression von Rezeptoren auf der Oberfläche von einzelnen Zellen dar. Dieses Gating-Kriterium wurde zusätzlich durch die Darstellung einer niedrigen Koexpression von CD127 in einem CD127⁺/CD25⁺- Dot-Plot-Fenster verifiziert (Abb.3-1f). CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Treg-Zellen exprimierten CD127 mit einem durchschnittlichen MFI-Wert von 41,6 im Vergleich zu CD4⁺CD25^{low}CD127^{high} T-Zellen, die eine deutlich höhere CD127 Expression mit durchschnittlichen MFI-Wert von 129,1 aufwiesen.

Die so festgelegte Population der regulatorischen CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T-Zellen wurde in nachfolgenden Auswertungen als Ausgangspopulation verwendet und ermöglichte somit die Unterscheidung der regulatorischen T-Zellen von aktivierten Effektorzellen.

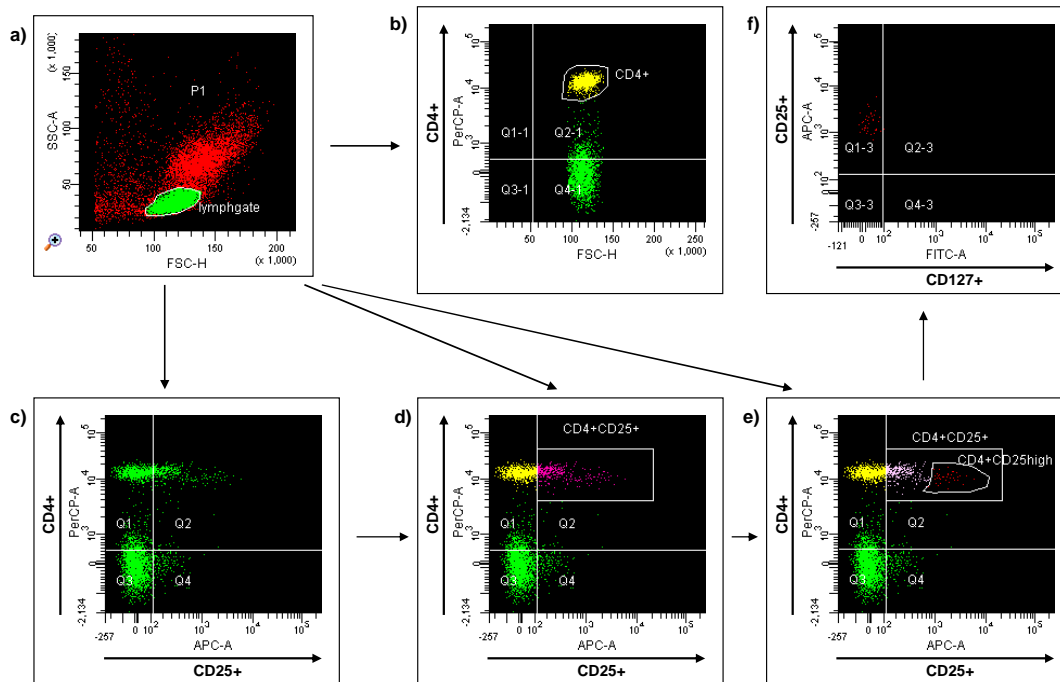


Abb. 3-1: Beispielhafte Darstellung der Gating-Strategie von $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ Treg Zellen.

Die Kombination von einer niedrigen $CD127^{low}$ und einer hohen $CD25^{high}$ Expression erlaubte eine spezifische Analyse der suppressiven Treg Zellen im Durchflusszytometer. Darstellung von 6 Dot-Plot-Fenstern: **a)** SSC-FSC-Schema mit Wiedergabe der Lymphozyten-Population. **b)** Darstellung der $CD4^+$ T-Zellen im $CD4$ -PerCP/FSC- Fenster. **c)-d)** Darstellung der $CD4^+CD25^+$ T-Zellen als Gate. **e)** Identifizierung von $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ Treg-Zellen (rote Zellen) innerhalb der $CD4^+CD25^+$ T-Zellen durch Gaten der deutlich von den restlichen Zellen abgrenzbaren Population der $CD4^+CD25^+$ T-Zellen mit einer mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von $CD127 \leq 60$. Die so festgelegte Population der regulatorischen $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ T-Zellen wurde in nachfolgenden Auswertungen als Ausgangspopulation verwendet und ermöglicht die Trennung von regulatorischen T-Zellen gegenüber Effektorzellen. **f)** Darstellung einer niedrigen Koexpression von $CD127$ in einem $CD127/CD25$ - Dot-Plot-Fenster.

3.1.2 Erhöhte Anzahl regulatorischer T-Zellen ($CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$) in Patienten mit HNSCC

Die Anzahl der zirkulierenden Lymphozyten, $CD4^+$ -, $CD4^+CD25^+$ -, $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ - und $CD4^+CD25^{low}CD127^{high}$ -T Zellen im peripheren Blut von Patienten mit HNSCC wurde mittels Messung mit einem Durchflusszytometer (FACS) bestimmt. Diese Untersuchung umfasste 25 Patienten mit HNSCC und 27 gesunde Kontrollen, die in *Tab. 2-1* und *Tab. 2-2* aufgelistet sind.

Diese Messung der PBMCs im Durchflusszytometer offenbarten deutliche Unterschiede zwischen HNSCC-Tumorpatienten und gesunden Kontrollen. Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor zeigten eine hoch signifikante Zunahme ($p < 0,01$) an $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ Treg-Zellen innerhalb der Population der $CD4^+$ T-Lymphozyten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen, wie in *Abb. 3-2* und *Abb. 3-3* zu erkennen ist. HNSCC-Patienten besaßen einen Prozentanteil von $3,4\% \pm 2,5$ $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ Treg Zellen im Vergleich zu einem Prozentanteil von $1,8\% \pm 1,7$ ($p < 0,01$) im Blut von gesunden Kontrollen. Die Prozentangaben der Treg Zellen standen in Relation zum prozentualen Anteil der $CD4^+$ Lymphozyten im peripheren Blut.

Des Weiteren zeigten die Versuche dieser Doktorarbeit, dass HNSCC eine dauerhafte Veränderung und Beeinflussung des Immunsystems bezüglich der Anzahl regulatorischer T-Zellen bedingen. Dieses Ergebnis wird näher im Kapitel 3.1.5 beschrieben.

Wie bereits unter 3.1.1 beschrieben, können die menschlichen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen sowohl in suppressive $CD4^+CD25^{high}$ T-Zellen, als auch in $CD4^+CD25^{low}$ T-Zellen eingeteilt werden, die durch Antigene stimulierte und aktivierte $CD4^+$ T-Zellen darstellen (Strauss *et al.*, 2007c). Eine niedrige CD127-Expression ($CD127^{low}$) zusammen mit einer hohen CD25-Expression ($CD25^{high}$) wird als spezifisch für suppressive regulatorische T-Zellen in Abgrenzung von nicht-suppressiven, aktivierten T-Effektorzellen angesehen (Liu *et al.*, 2006). Die mittels Durchflusszytometrie gewonnenen Ergebnisse zeigten nach Gaten von $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ Treg Zellen, dass sowohl im Blut gesunder Kontrollen als auch im Blut erkrankter HNSCC-Patienten bis zu einem prozentualen Anteil von 98% der $CD4^+CD25^+$ T-Zellen nicht-suppressive $CD4^+CD25^{low}CD127^{high}$ T-Zellen waren. Der Vergleich von HNSCC-Tumorpatienten mit gesunden Kontrollen verdeutlichte, dass gesunde Kontrollen zudem einen hoch signifikant höheren Prozentanteil an diesen $CD4^+CD25^{low}CD127^{high}$ T-Zellen aufwiesen ($98,2\% \pm 1,7$ in NC vs. $96,6\% \pm 2,5$ in HNSCC; $p < 0,01$). Trotz der beschriebenen Differenzen in der Anzahl der suppressiven $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ T-Zellen und der nicht-suppressiven $CD4^+CD25^{low}CD127^{high}$ T-Zellen zeigten die Messungen, dass HNSCC-Tumorpatienten gegenüber gesunden Kontrollen keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Lymphozyten, $CD4^+$ T-Zellen und $CD4^+CD25^+$ T-Zellen aufwiesen.

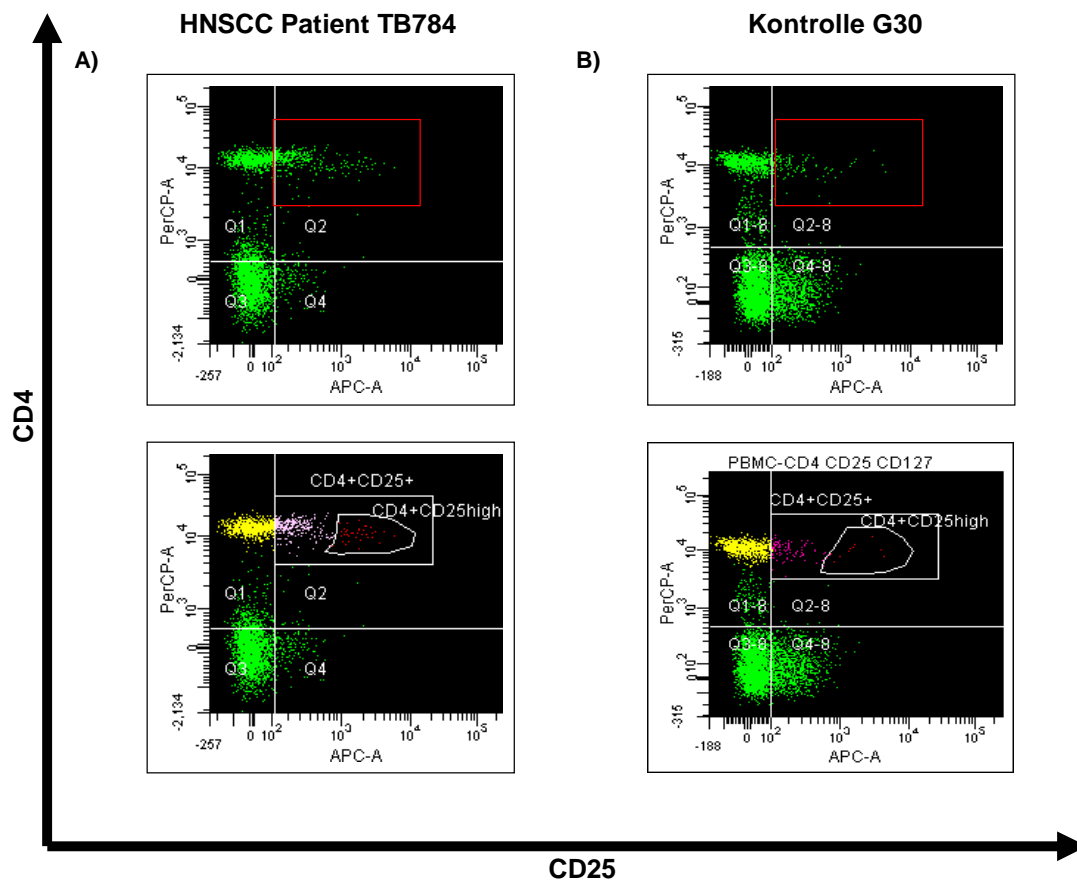


Abb. 3-2: Beispiel für die Zunahme von $CD4^+CD25^+$, $CD4^+CD25^{high}$ and $CD4^+CD25^{low}$ Treg Zellen innerhalb der PBMCs von einem einzelnen HNSCC-Patienten (TB784) im Vergleich mit einer gesunden Kontrolle (G30).

Die PBMCs des **HNSCC-Patienten** bestanden aus 28,6% $CD4^+CD25^+$ Treg Zellen, die sich aus 6% $CD4^+CD25^{high}$ und 94% $CD4^+CD25^{low}$ Treg Zellen zusammensetzten. Die **gesunde Kontrolle** im Vergleich hierzu zeigte 12% $CD4^+CD25^+$ Treg Zellen, 1,5% $CD4^+CD25^{high}$ und 98,5% $CD4^+CD25^{low}$ Treg Zellen. Die **roten** Kästchen umrahmen die $CD4^+CD25^+$ T-Zellen.

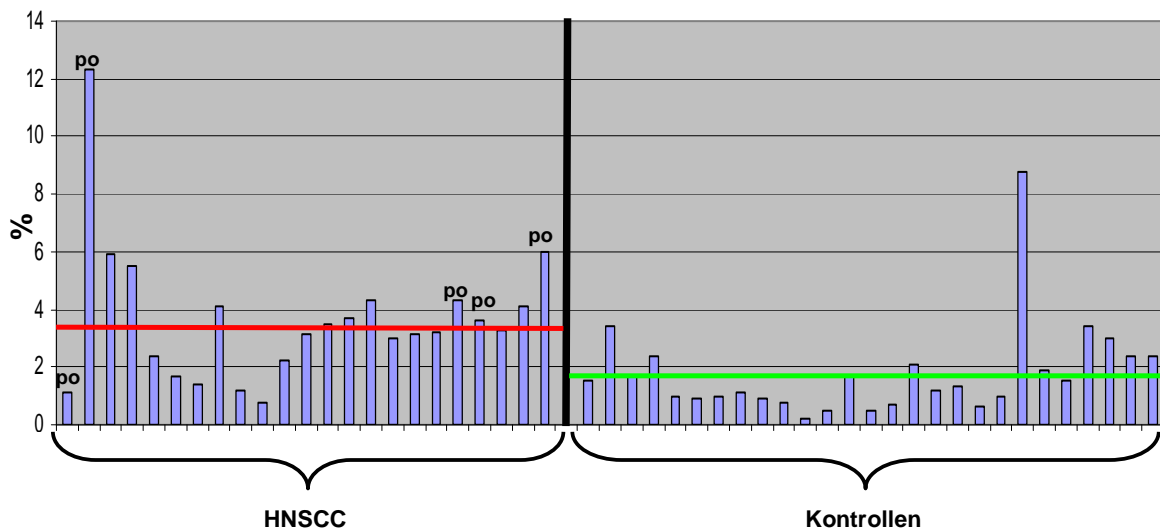


Abb. 3-3: Hoch signifikante Zunahme an $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ Treg-Zellen innerhalb der Population der $CD4^+$ T-Lymphozyten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen.

Die Anzahl der zirkulierenden $CD4^+CD25^{high}$ Treg Zellen innerhalb der PBMCs von 25 Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor (TB) und 27 gesunde Kontrollen (G) wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert und mit dem absoluten prozentualen Anteil der $CD4^+$ T-Lymphozyten im peripheren Blut verglichen.

19 HNSCC-Tumorpatienten waren Patienten mit einer aktiven Erkrankung (präoperativ); zudem wurden in dieser Doktorarbeit auch solche Patienten zu der Gruppe der aktiv erkrankten Patienten gezählt, die sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme im perioperativen Zeitraum, d.h. bis zu einem Jahr nach der Tumorresektion befanden (siehe auch *Material & Methoden*). 6 mit „po“ markierte Patienten zeigten keine Anzeichen einer Tumor-Erkrankung (postoperativ); sie galten als tumorfrei über einen Zeitraum von 12 Monaten bis zu 9 Jahren.

Die Daten zeigten eine hoch signifikante Zunahme ($p < 0,01$) der Anzahl der $CD4^+CD25^{high}$ Treg Zellen innerhalb der $CD4^+$ T-Lymphozyten im peripheren Blut von HNSCC-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollen. Die einzelnen Patienten und gesunden Kontrollen wiesen individuelle Schwankungen der Anzahl der Treg Zellen auf. **Rote** Linie: Durchschnittlicher Wert der $CD4^+CD25^{high}$ Treg innerhalb der $CD4^+$ T-Zellen in **Patienten mit HNSCC**; **Grüne** Linie: Durchschnittlicher Wert der $CD4^+CD25^{high}$ Treg innerhalb der $CD4^+$ T-Zellen in **gesunden Kontrollen**

HNSCC-Patienten: TB525-TB539, TB541, TB543-TB546, TB768, TB777-TB779, TB784

Gesunde Kontrollen: G1-G20, G25, G28, G30-G34

3.1.3 Keine Korrelation zwischen der Treg-Anzahl und den Tumorstadien

Wie in der Einleitung beschrieben, erfolgt die Klassifikation der Tumorstadien nach dem international anerkannten *TNM-System* der UICC (*Union International Contre Cancer*) und beschreibt die Größe des Primärtumors (*T1* bis *T4*), das Ausmaß der lymphogenen Metastasierung (*N0* bis *N3*) und das Auftreten von Fernmetastasen (*M0* oder *M1*). Anhand der *TNM*-Klassifikation hat die UICC eine vierstufige

Stadieneinteilung zur Übersicht über die Schweregrade und Prognose der Tumorstadien abgeleitet.

Bei Betrachtung der TNM-Stadien (siehe Tab. 2-1 und 2-2) der einzelnen Patienten fiel auf, dass keine signifikante Korrelation zwischen dem Tumor-Stadium und der Anzahl der zirkulierenden Treg-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor bestand (Abb. 3-4). Trotz fortgeschrittener Tumorstadien – zunehmend vom Stadium I bis hin zum Stadium IV - zeigte sich keine signifikante Zunahme der jeweiligen prozentualen Anzahl regulatorischer T-Zellen in den HNSCC-Patienten.

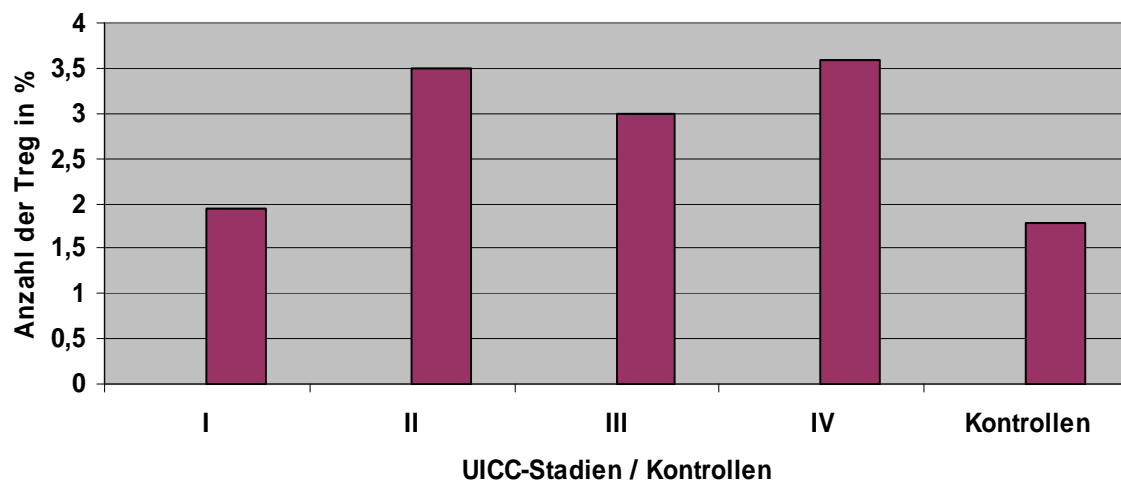


Abb. 3-4: Keine Korrelation zwischen der Treg-Anzahl in HNSCC-Patienten und den Tumorstadien

Darstellung der vierstufigen Stadieneinteilung (I-IV) der UICC zur Übersicht über die Schweregrade und Prognose eines Tumors. UICC I-II stellen frühe Tumorstadien und UICC III-IV stellen fortgeschrittene Tumorstadien dar. Zwischen den einzelnen UICC-Stadien konnte bezüglich der Anzahl der Treg-Zellen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

3.1.4 Phänotypische Analyse von CD4⁺ T-Zell Subpopulationen

Regulatorische CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T-Zellen, aber auch Lymphozyten, CD4⁺ T-Zellen, CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25^{low}CD127^{high} T-Zellen im Blut von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren und gesunde Kontrollen wurden auf eine Expression von charakteristischen Treg-Oberflächen- und intrazellulären Markern (Baecher-Allan *et al.*, 2001) im Durchflusszytometer untersucht. Als typische Treg Marker wurden

zur Analyse folgende Rezeptoren herangezogen: FoxP3 (forkhead box P3), GTR (membrane glucocorticoid-induced tumor-necrosis factor receptor family-related gene), das immunregulatorische Protein CTLA-4 (cytolytic T-lymphocyte-associated antigen 4 protein oder CD152), die Chemokinrezeptoren CCR7 und CCR4, der `homing receptor` CD62L, CD45RA und die β -Kette des IL-2-Rezeptors CD122. Bis auf die Marker CTLA-4 und Foxp3 handelt es sich um Oberflächenrezeptoren. CTLA-4 wird sowohl intra- als auch extrazellulär exprimiert, wohingegen Foxp3 als ein rein intrazellulärer Marker angesehen wird.

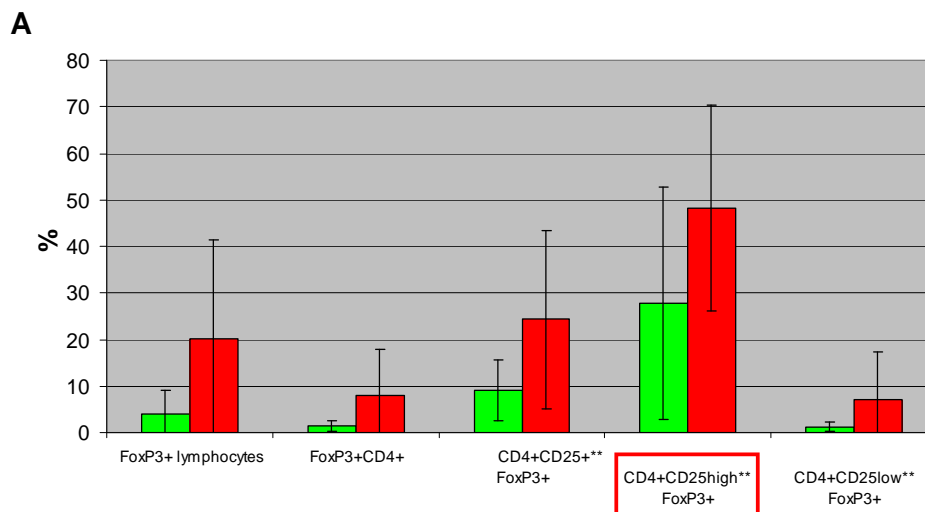
3.1.4.1 Expressionsanalyse der Treg-Marker bei HNSCC-Patienten

Durch die Messungen der unter 3.1.4. genannten Zellen im Durchflusszytometer konnte festgestellt werden, dass in HNSCC-Patienten 48,3% der analysierten $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ Treg Zellen den Transkriptionsfaktor Foxp3, 22,7% GTR, 68,6% CTLA-4, 54,8% CCR7, 86,9% CCR4, 78,5% CD62L, 51,4% CD45RA und 34,96% CD122 exprimieren. Beim Vergleich dieser Prozentangaben der verschiedenen Marker auf den $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ Treg Zellen von Tumorpatienten mit den gesunden Kontrollen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der prozentualen Expression der Marker GTR, CTLA-4, CD45RA, CCR4 und CD62L. Der Chemokinrezeptor CCR7 wies jedoch eine tendenziell ($0,05 < p < 0,1$) höhere Expression auf $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ Treg Zellen in HNSCC-Patienten auf.

Hingegen zeigte sich, dass die prozentuale Expression des Rezeptors CD122 (Interleukin-2 [IL-2]/IL-15 Rezeptor β -Kette), der eine Rolle in der Regulation der Entwicklung der Lymphozyten *in vivo* spielt, auf $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ Treg Zellen im Blut von gesunden Kontrollen hoch signifikant im Vergleich zu Treg Zellen von Tumorpatienten erhöht ist (60,8% vs. 35%; $p < 0,01$).

Weiterhin zeigten die Messungen, dass, entsprechend zu der unter 3.1.2 beschriebenen signifikanten Zunahme der Anzahl der $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ Treg Zellen in HNSCC-Patienten, in eben diesen Patienten der prozentuale Anteil der Foxp3 (48,3% vs. 27,8%; $p < 0,01$) exprimierenden $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ Treg-Zellen hoch signifikant erhöht ist (Abb. 3-5). Der Transkriptionsfaktor Foxp3

gilt als ein entscheidender Faktor der Entwicklung und Funktion der regulatorischen $CD4^+CD25^{\text{high}}CD127^{\text{low}}$ T-Zellen.



B

Foxp3 on different cells	Average HNSCC in %	Average NC in %	p - value
<i>FoxP3+ lymphocytes</i>	20,1	3,9	$p < 0,01$
<i>CD4+ FoxP3+</i>	8	1,4	$0,01 \leq p \leq 0,05$
<i>CD4+ CD25+</i>	24,3	9	$p < 0,01$
<i>CD4+ CD25^{high}** FoxP3+</i>	48,3	27,8	$p < 0,01$
<i>CD4+ CD25^{low}** FoxP3+</i>	7,2	1,2	$0,01 \leq p \leq 0,05$

Abb. 3-5: Expression von Foxp3 – Einem ‘Master Kontroll-Gen’ der Treg-Funktion
Eine mögliche Expression von Foxp3 auf Lymphozyten im Allgemeinen, auf $CD4^+$, $CD4^+CD25^+$ T Zellen, $CD4^+CD25^{\text{high}}CD127^{\text{low}}$ Treg Zellen (roter Kasten) und auf nicht-suppressive $CD4^+CD25^{\text{low}}CD127^{\text{high}}$ T Zellen wurde analysiert.

(A) Die Expression von Foxp3 auf PBMCs in HNSCC-Patienten (roter Balken) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (grüner Balken) wird als prozentualer Durchschnitt zusammen mit der Standardabweichung dargestellt. Sowohl die analysierten Zellen in PBMCs von HNSCC-Patienten, als auch in PBMCs von gesunden Kontrollen zeigten eine Expression von Foxp3. Allerdings war die Foxp3 Expression signifikant höher ($0,01 \leq p \leq 0,05$) auf den Zellen von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren.

(B) Auflistung der Anzahl und p-Werte der Foxp3 exprimierenden Zellen in HNSCC-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Somit wurde in dieser Doktorarbeit auch eine eventuelle Expression von Foxp3 in Lymphozyten, $CD4^+$ T-Zellen, $CD4^+CD25^+$ und in $CD4^+CD25^{\text{low}}CD127^{\text{high}}$ T Zellen untersucht (Abb. 3-5). Es konnte gezeigt werden, dass all diese analysierten Zellen eine Expression von Foxp3 aufwiesen. Allerdings war der prozentuale Anteil aller Foxp3 exprimierenden Zellen wiederum in Patienten mit Kopf-Hals-

Tumoren signifikant höher ($0,01 \leq p \leq 0,05$) als in gesunden Kontrollen (*Abb. 3-5B*).

Neben der Expression von Foxp3 wurde, wie bereits unter 3.1.4 erwähnt, auch das Vorhandensein anderer typischer Treg Marker auf Lymphozyten, CD4⁺ T Zellen, CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25^{low}CD127^{high} T-Zellen im Blut von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren und gesunden Kontrollen untersucht. Es zeigte sich, dass sowohl im Blut von HNSCC-Patienten als auch im Blut von gesunden Kontrollen nicht nur regulatorische CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T-Zellen, sondern auch Lymphozyten, CD4⁺ T-Zellen, CD4⁺CD25⁺ und nicht-suppressive CD4⁺CD25^{low}CD127^{high} T-Zellen die analysierten Marker exprimierten. Bei dem Chemokinrezeptor CCR7 und dem Marker CTLA-4 fielen keine signifikanten Unterschiede in der Expression zwischen Patienten und gesunden Kontrollen auf. Allerdings bestanden wiederum bei der Expression weiterer Marker zum Teil signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren und gesunden Kontrollen. So zeigte sich, dass die Marker CD45 und CD62L hoch signifikant höher auf CD4⁺ T-Zellen und auf nicht-suppressiven CD4⁺CD25^{low}CD127^{high} T-Zellen im Blut von gesunden Kontrollen zu finden waren. GITR, Foxp3 und CCR4 ergaben signifikant (GITR, Foxp3) ($0,01 \leq p \leq 0,05$) und hochsignifikant (CCR4) ($p < 0,01$) erhöhte prozentuale Messwerte auf bzw. in Lymphozyten, CD4⁺ T-Zellen, CD4⁺CD25⁺ T-Zellen und auf nicht-suppressiven CD4⁺CD25^{low}CD127^{high} T-Zellen von HNSCC-Patienten (*Abb. 3-6A*). Bei dem Chemokinrezeptor CCR4 fiel noch eine Besonderheit im Vergleich zu den restlichen Markern auf. Bei der Darstellung der im Durchflusszytometer gewonnenen Daten in Form der „Mean Fluorescence Intensity (MFI)“ zeigte sich, dass die einzelne Zelle im Blut von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren eine signifikant ($0,01 \leq p \leq 0,05$) höhere absolute Anzahl an CCR4-Molekülen auf der Zelloberfläche exprimiert als die untersuchten Zellen im Blut gesunder Kontrollen (*Abb. 3-6B*). Dies traf für CD4⁺ T Zellen, CD4⁺ CD25⁺ und CD4⁺CD25^{low}CD127^{high} T-Zellen zu, nicht aber für die suppressiven CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Treg Zellen. MFI ist ein Maß, das das Ausmaß der Adhäsion von Antikörpern und somit das absolute Expressionslevel der Antigene, also der Rezeptoren, und vor allem Veränderungen dieses Levels reflektiert (Hevessy *et al.*, 2005). Somit entspricht MFI der absoluten Anzahl der Rezeptoren pro Zelle (Lavabre-Bertrand *et al.*, 1994a; Lavabre-Bertrand *et al.*, 1994b).

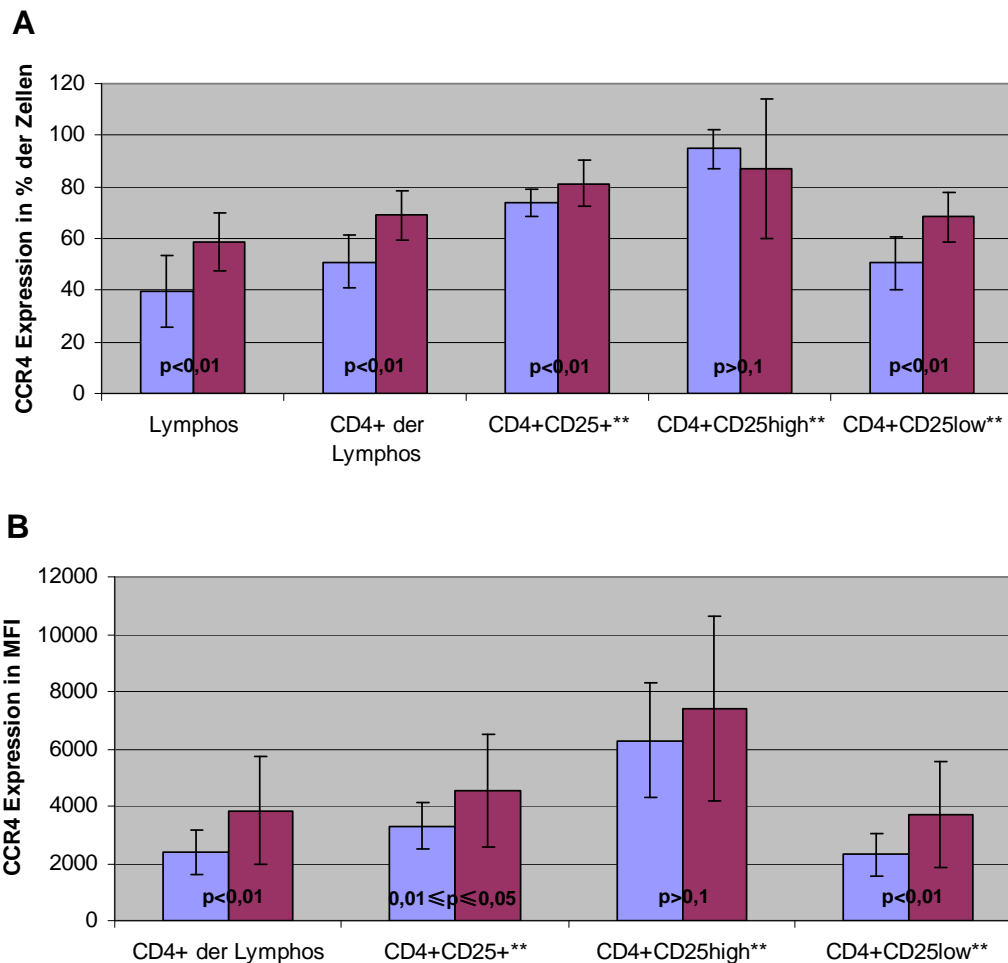


Abb. 3-6 : Expression des Chemokinrezeptors CCR4

Neben regulatorischen $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ T-Zellen zeigten auch Lymphozyten, $CD4^+$ T Zellen, $CD4^+CD25^+$ und $CD4^+CD25^{low}CD127^{high}$ T-Zellen eine Expression des Rezeptors CCR4.

(A) Lymphozyten, $CD4^+$ T-Zellen, $CD4^+CD25^+$ T-Zellen und $CD4^+CD25^{low}CD127^{high}$ T-Zellen von HNSCC-Patienten (blauer Balken) wiesen hoch signifikant ($p < 0,01$) erhöhte prozentuale Messwerte für CCR4 im Vergleich zu gesunden Kontrollen (lila Balken) auf.

(B) Bei der Darstellung der im Durchflusszytometer gewonnenen Daten in Form der „Mean Fluorescence Intensity (MFI)“ zeigte sich, dass die einzelne Zelle ($CD4^+$ T Zellen, $CD4^+CD25^+$ und $CD4^+CD25^{low}CD127^{high}$ T-Zellen) im Blut von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren (blauer Balken) eine signifikant ($0,01 \leq p \leq 0,05$) höhere absolute Anzahl an CCR4-Molekülen auf der Zelloberfläche exprimiert als die untersuchten Zellen im Blut gesunder Kontrollen (lila Balken).

3.1.4.2 Treg-Marker auf HNSCC-Zelllinien

Neben einer Expression von charakteristischen Treg Markern auf nicht suppressiven PBMCs (3.1.4.1), wurde auch eine mögliche Expression dieser Marker auf HNSCC-Zelllinien im Durchflusszytometer (FACS) untersucht. Auch hier wurden folgende Marker für die Analyse herangezogen: CD4, CD25, FoxP3 (forkhead box P3), GITR (membrane glucocorticoid-induced tumor-necrosis factor

receptor family-related gene), das immunregulatorische Protein CTLA-4 (cytolytic T-lymphocyte-associated antigen 4 protein oder CD152), die Chemokinrezeptoren CCR7 und CCR4, der `homing receptor` CD62L, CD45RA und die β -Kette des IL-2-Rezeptors CD122. Als HNSCC-Zelllinien wurden PCI1 und PCI13 verwendet.

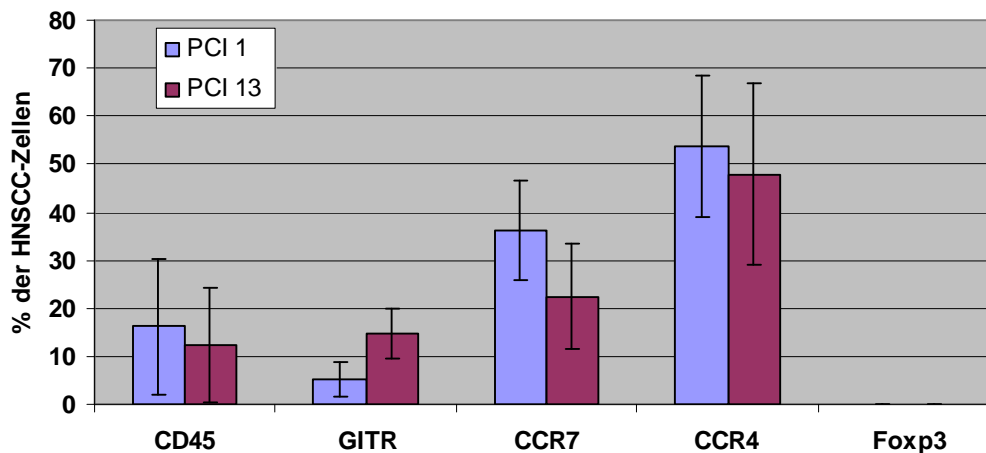


Abb. 3-7: Charakteristische Marker regulatorischer T-Zellen auf HNSCC-Zelllinien. Eine mögliche Expression charakteristischer Treg-Marker auf HNSCC-Zelllinien (PCI-1 und PCI-13) wurde im Durchflusszytometer (FACS) untersucht. Die Messungen zeigten eine Expression der Marker CD45, GITR, CCR7 und CCR4 durch die HNSCC-Zelllinien PCI-1 und PCI-13. In der obigen Abbildung werden die Expressionslevel unter Angabe der Standardabweichung gezeigt. Der Chemokinrezeptor CCR4 wurde am stärksten auf den untersuchten HNSCC-Zelllinien exprimiert. Weder CD4, CD25, noch Foxp3 wurden von den HNSCC-Zelllinien exprimiert.

Es zeigte sich, dass weder die Zelllinien PCI1 noch PCI13 die bedeutendsten Treg-Rezeptoren CD4, CD25 und Foxp3 (3.1.1) exprimieren. Zudem wiesen die HNSCC-Zellen keine Expression der Marker CD62L, CTLA-4, CD122 und CD127 auf. Allerdings zeigten die Messungen im FACS, dass die Marker CD45, GITR, CCR7 und CCR4 von HNSCC-Zellen exprimiert werden (Abb.3-7). Von diesen vier verschiedenen Rezeptoren wurde der Chemokinrezeptor CCR4 am stärksten mit 53,9% der HNSCC-Zellen (Standardabweichung 14,7%) auf der Zelllinie PCI-1 bzw. mit 47,8% (Standardabweichung 18,7%) auf der Zelllinie PCI-13 exprimiert. Der Chemokinrezeptor CCR7 zeigte eine Expression von 36,2% der HNSCC-Zellen (Standardabweichung 10,3%) auf PCI-1 und 22,5% (Standardabweichung 10,8%) auf PCI-13. Die Rezeptoren GITR und CD45 wiesen ein geringeres Expressionslevel als die beiden anderen Marker auf: PCI-1 mit 5% bzw. PCI13 mit 14,8% GITR (Standardabweichung PCI-1 3,6%, Standardabweichung PCI-13 5,1%); PCI-1 mit 16,13% bzw. PCI13 mit 12,15% CD45 (Standardabweichung PCI-1 14%, Standardabweichung PCI-13 11,9%). Die beschriebenen

Expressionslevel (in %) der einzelnen Rezeptoren wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten HNSCC-Zelllinien PCI-1 und PCI-13 auf.

3.1.5 Dauerhafte Veränderung und Beeinflussung des Immunsystems durch HNSCC

Die im Durchflusszytometer im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten HNSCC-Patienten konnten in zwei verschiedene Gruppen unterteilt werden. Eine Gruppe bestand aus 19 Patienten (n=19), die eine aktive HNSCC-Erkrankung aufwiesen (präoperativ). Ein Teil der präoperativen Gruppe (14 HNSCC-Patienten) war zum Zeitpunkt der Blutentnahme noch keiner onkologischen Therapie in Form von Chirurgie oder Radiochemotherapie unterzogen worden. Zudem wurden in dieser Doktorarbeit auch solche Patienten (5 HNSCC-Patienten) zu der Gruppe der aktiv erkrankten Patienten gezählt, die sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme im perioperativen Zeitraum, d.h. bis zu einem Jahr nach der Tumoresektion befanden. Es wurde davon ausgegangen, dass bis zu 12 Monate postoperativ das Immunsystem der Patienten noch durch sezernierte und nach der Operation zurückgebliebene Stoffe des Tumors beeinflusst werden kann.

Die andere analysierte Gruppe setzte sich aus 6 postoperativen Patienten (n=6) zusammen, die alle keine Anzeichen einer aktiven Tumorerkrankung (PO, postoperativ) oder eines Tumorrezidivs aufwiesen (siehe auch „*Material und Methoden*“, Kapitel 2.1.10). Diese postoperativen Patienten waren alle tumorreseziert und 4 dieser Patienten waren zusätzlich mit einer Radio- und/oder Chemotherapie behandelt worden (Tab.2-2, Kapitel 2.1.10). Sie galten über einen Zeitraum von 12 Monaten bis zu 9 Jahren als tumorfrei. Die Anzahl der Treg-Zellen innerhalb dieser zwei Patientengruppen wurden miteinander verglichen.

Überraschenderweise zeigte sich, dass der durchschnittliche prozentuale Anteil der CD4⁺CD25^{high}CD127⁺ Treg Zellen an der Gesamtheit der CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut auch nach durchgeführter onkologischer Therapie weiterhin signifikant ($0,01 \leq p \leq 0,05$) gegenüber gesunden Kontrollen erhöht ist (Abb.3-3). Diese Aussage traf unabhängig von der prä-/ peri-/ postoperativen Zeitdauer zu und konnte somit selbst bei Patienten mit einer postoperativen Zeitdauer von bis

zu 9 Jahren nach aktiver Erkrankung und onkologischer Therapie gefunden werden (Abb.3-3).

3.2 Bedeutung von CCL22 in HNSCC-Patienten

Es ist bekannt, dass Tumorzellen und durch den Tumor rekrutierte Immunzellen in der Lage sind, zahlreiche immunsuppressive Mediatoren und Chemokine zu produzieren und so zu einer Beeinträchtigung des Immunsystems zu führen (Dunn *et al.*, 2004; Whiteside, 2005; Pries *et al.*, 2006a; Pries und Wollenberg, 2006). Einer der durch unterschiedliche Tumoren produzierten Mediatoren ist das Chemokin CCL22 (macrophage derived chemokine; MDC oder STCP-1), welches die Migration von u.a. regulatorischen T-Zellen über den Chemokinrezeptor CCR4 in die Tumorumgebung induziert (Curiel *et al.*, 2004). In einem gesunden Immunsystem hingegen wird CCL22 normalerweise von Makrophagen, dendritischen Zellen, aktivierten B- und T-Lymphozyten und Monozyten gebildet (Andrew *et al.*, 1998; Jakubzick *et al.*, 2004; Echigo *et al.*, 2006) und als Sekretprotein in den Extrazellulärraum abgegeben. Neben regulatorischen T-Zellen wirkt CCL22 chemotaktisch auf chronisch aktivierte T-Lymphozyten, Monozyten, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen über den CCL22-Rezeptor CCR4.

In dieser Arbeit wurde, unter anderem auf den erwähnten Erkenntnissen beruhend, untersucht, welche Bedeutung dem Chemokin CCL22 bei der Pathogenese von HNSCC im Zusammenspiel mit regulatorischen T-Zellen zugeschrieben werden kann.

3.2.1 HNSCC produzieren das Chemokin CCL22

Als Grundlage der weiteren Versuche wurde zunächst eine mögliche Produktion des Chemokins CCL22 durch HNSCC-Zellen untersucht.

3.2.1.1 Nachweis von CCL22-Produktion bzw. Expression mittels Durchflusszytometrie

Zur Messung einer eventuellen CCL22-Produktion durch HNSCC-Zellen wurden Zellen der permanenten HNSCC-Zelllinien PCI-1 und PCI-13 mit dem Antikörper Maus-Anti-CCL22/MDC inkubiert. Eine Isotyp-Kontrolle wurde zum Ausschluss unspezifischer Bindungen mitgeführt, und HNSCC-Zellen, die nicht mit Antikörpern, bzw. mit der entsprechenden Isotyp-Kontrolle markiert wurden, dienten als Negativ-Kontrolle. Pro Zelllinie wurden mindestens 5 Einzel-Messungen durchgeführt.

Die Ergebnisse der FACS-Messungen zeigten, dass sowohl die PCI-1 als auch die PCI-13 HNSCC-Zelllinie in der Lage waren, CCL22 zu produzieren. In der *Abb. 3-8* wird dieses Ergebnis anhand der Messung von PCI-1 verdeutlicht. Die FACS-Messung zeigte, dass die Mehrheit der HNSCC-Zellen CCL22 produzieren; im Mittel ließen sich bei 99,4% der gemessenen PCI-1-Zellen (Standardabweichung 0,8%) und bei 99,9% der PCI-13-Zellen (Standardabweichung 0,1%) das Chemokin CCL22 intrazellulär nachweisen (*Abb. 3-8C/D*). Die gewonnenen Ergebnisse legten nahe, dass maligne HNSCC-Zellen durch die Produktion und Expression des Chemokins CCL22 in der Lage sind, eine Migration von regulatorischen T-Zellen zum Tumor zu bedingen. Dieser Prozess resultiert in der erhöhten Anzahl von Treg-Zellen und in einer verstärkten Suppression von Anti-Tumor-Immunantworten in Patienten mit HNSCC.

Die Ergebnisse zeigten des Weiteren (*Abb.3-8B*), dass CCL22, neben einer überwiegend intrazellulären Produktion und Expression, auch mit einer schwächeren Expression auf der Zelloberfläche der HNSCC-Zellen zu finden waren. Diese extrazelluläre CCL22-Expression manifestierte sich allerdings hoch signifikant geringer als die intrazelluläre Expression ($p < 0,01$) und betrug 46,8% bei PCI-1 bzw. 48,6% bei PCI-13 (*Abb.3-8D*).

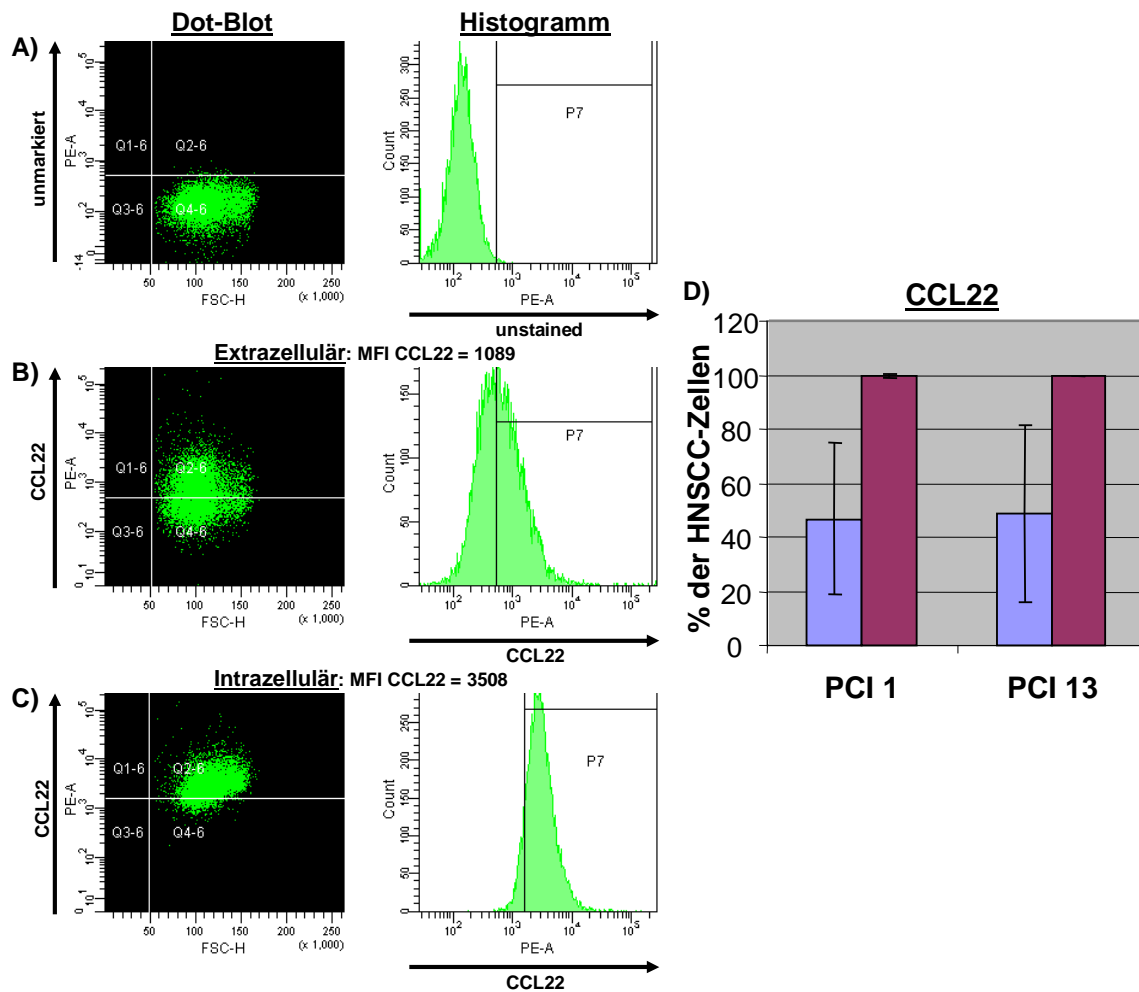


Abb. 3-8: Produktion und Expression von CCL22 in HNSCC-Zellen.

Permanente HNSCC-Zellen **PCI-1** und **PCI-13** wurden mit FIX/Perm Buffer und Anti-CCL22 Antikörper für die intrazelluläre Messung der CCL22-Produktion bzw. nur mit Anti-CCL22 Antikörper für die Messung der extrazellulären Expression inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer gemessen.

A)-C) CCL22-APC Dot-Blot-Fenster und Histogramme. **A)** Unmarkierte **PCI-1**-Zellen als Dot-plot und Histogramm. **B)** Mit Primärantikörper Anti-CCL22 und APC-konjugiertem Sekundärantikörper markierte **PCI-1**-Zellen zeigten eine deutliche extrazelluläre CCL22-Expression, die aber hoch signifikant niedriger ($p < 0,01$) war als die intrazelluläre Expression (**C**). **C)** und **D)** Die FACS-Analyse zeigte, dass die Mehrheit der **PCI-1** und **PCI-13** Zellen eine intrazelluläre CCL22-Produktion aufwiesen. **D)** Im Mittel ließen sich bei 99,4% der gemessenen **PCI-1**-Zellen (Standardabweichung 0,8%) und bei 99,9% der **PCI-13**-Zellen (Standardabweichung 0,1%) das Chemokin CCL22 intrazellulär (**lila** Balken) nachweisen. Die extrazelluläre (**blauer** Balken) CCL22-Expression manifestierte sich allerdings hoch signifikant geringer als die intrazelluläre Expression ($p < 0,01$) und betrug 46,8% bei **PCI-1** bzw. 48,6% bei **PCI-13**.

3.2.2 Nachweis von CCL22-Produktion bzw. Expression mittels Western-Blot

Zur Untersuchung der CCL22 Expression in HNSCC-Tumoren wurden neben der Analyse im Durchflusszytometer Proteinextrakte von 4 permanenten HNSCC-Zelllinien (PCI-1, PCI-13, BHY und Cal-27) und Proteinextrakte von adenoiden Vegetationen bzw. immortalisierten Keratinozyten (HaCat) erstellt. Anschließend wurde eine Proteinanalyse mittels Western Blot durchgeführt. Die adenoiden Vegetationen (GP437) dienen als Negativkontrolle und HaCat, dessen CCL22-Produktion bereits in der Literatur (Fujii-Maeda *et al.*, 2004; Purwar *et al.*, 2006) bekannt ist, wurde als Positivkontrolle verwendet. Zudem wurde Beta-Actin zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung der zu untersuchenden Banden mitgeführt. Die analysierten Gewebeproben und zugehörigen Daten sind unter 6.1.1.8 zusammengefasst. Für die Western-Blot-Analysen wurden gleiche Proteinmengen verwendet. CCL22 ist ein Chemokin mit einem Molekulargewicht von 10,6 kDa und besteht aus 93 Aminosäuren. Unsere Ergebnisse zeigten eine signifikante Expression und Produktion von CCL22 in allen 4 HNSCC-Zelllinien PCI-1, BHY (Abb. 3-9A) bzw. PCI-13 und Cal-27 (Abb. 3-9B). Wie vorausgesetzt, konnte bei der HaCat-Probe (Abb. 3-9B) als Positivkontrolle ebenfalls eine deutliche CCL22-Expression nachgewiesen werden. GP437 zeigte als gesundes Gewebe und Negativkontrolle erwartungsgemäß keine CCL22-Produktion.

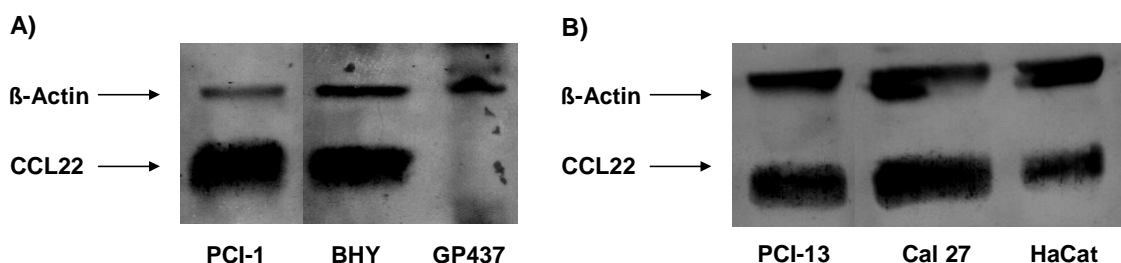


Abb. 3-9: Expression des Chemokins CCL22 in verschiedenen HNSCC-Zelllinien

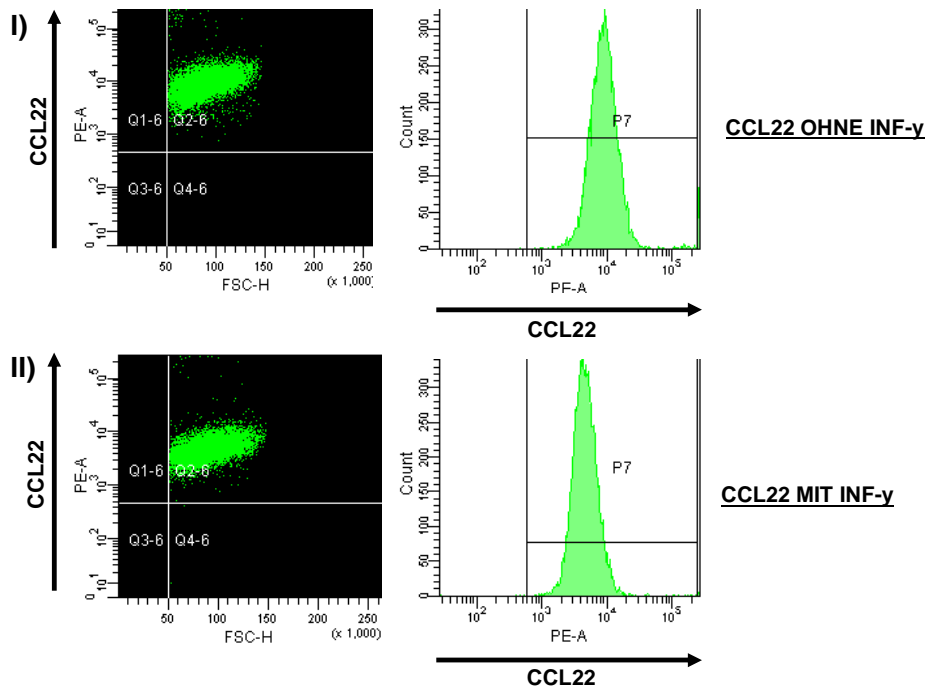
Die permanenten HNSCC-Zelllinien PCI-1, BHY (A) und PCI-13, CAL-27 (B) zeigten alle eine deutliche Expression bzw. Produktion des Chemokins CCL22. GP437 (A) ist ein Proteinextrakt bestehend aus Adenoiden Vegetationen und wurde in diesem Versuch als Negativkontrolle genutzt. Die Produktion von CCL22 durch immortalisierte Keratinozyten (HaCat) (B) war bereits bekannt und wurde somit als Positivkontrolle verwendet. β -Actin diente als 'loading control'.

3.3 Einfluss von IFN- γ auf die CCL22-Produktion durch HNSCC

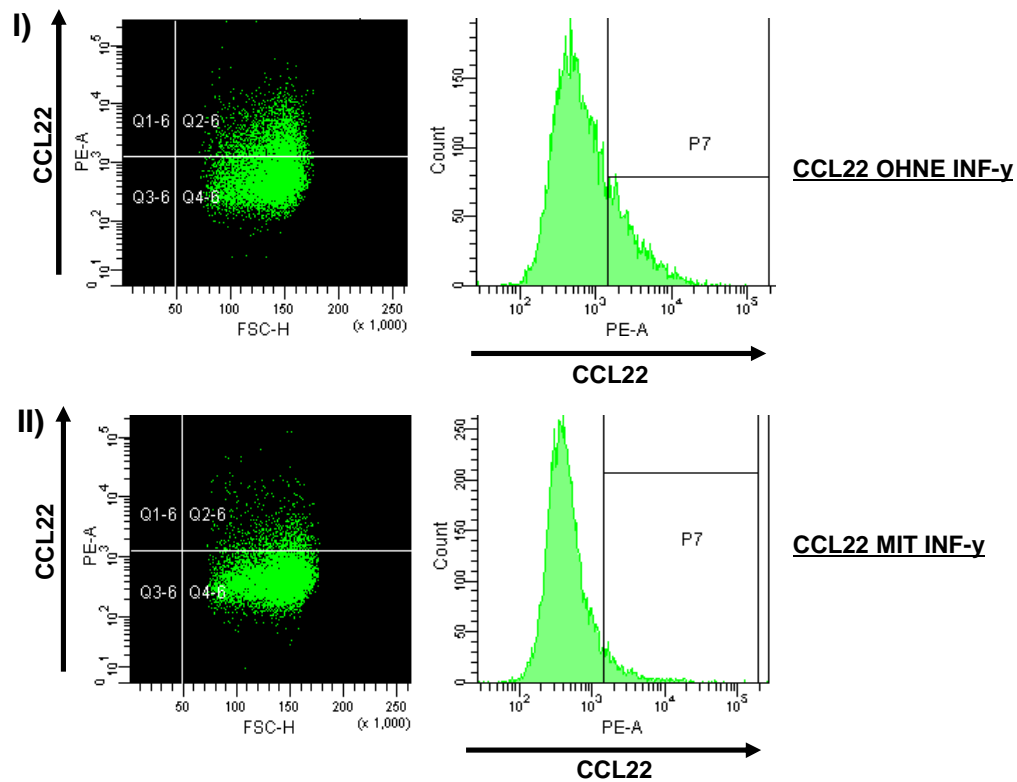
Interferon-gamma (IFN- γ) ist ein TH1-Zytokin, das eine immunstimulierende, vor allem aber eine antivirale und antitumorale Wirkung besitzt. Es ist bekannt, dass IFN- γ in der Lage ist, die konstitutive Expression von CCL22 in reifen Makrophagen und dendritischen Zellen zu supprimieren (Bonecchi *et al.*, 1998). Aufgrund dieses Wirkungsspektrums wurde in dieser Arbeit ein möglicher Einfluss von IFN- γ auf die Produktion des Chemokins CCL22 und die Expression des CCL22-Rezeptors CCR4 durch HNSCC-Tumorzellen untersucht. Zunächst wurden die permanenten HNSCC-Zelllinien PCI-1 und PCI-13 in 5ml DMEM-Medium mit 2 μ l (4000 pg/ml) rekombinantem Interferon-gamma inkubiert. Die Inkubation wurde nach 12, 48 und/oder 72 Stunden gestoppt und das Level der CCL22-Expression vor und nach der Inkubation durch die Messung der 'Mean Fluorescence Intensity' (MFI) im Durchflusszytometer ermittelt (siehe „*Material & Methoden*“, Kapitel 2.1.4). Wie bereits unter 3.1.4.1 beschrieben, entspricht MFI der absoluten Anzahl der Antigene pro Zelle (Lavabre-Bertrand *et al.*, 1994a; Lavabre-Bertrand *et al.*, 1994b; Hevessy *et al.*, 2005) und somit der Produktion und Expression von CCL22. Pro Inkubationsdauer der HNSCC-Zelllinien mit IFN- γ wurden mindestens fünf Messungen durchgeführt.

Die Analyse im FACS demonstrierte (Abb. 3-10), dass IFN- γ einen inhibierenden Effekt sowohl auf die intrazelluläre CCL22-Produktion (Abb. 3-10A) als auch auf die extrazelluläre CCL22-Expression (Abb. 3-10B) durch HNSCC-Zellen ausübt. Sowohl PCI-1 als auch PCI-13 zeigten somit eine Abnahme der CCL22-Expression und Produktion nach Inkubation mit IFN- γ . In Abb. 3-10C wird die Abnahme der CCL22-Produktion am Beispiel der HNSCC-Zelllinie PCI-1 über einen Inkubationszeitraum bis hin zu 72 Stunden in Prozent gezeigt. Nach der Inkubation mit IFN- γ konnte für PCI-1 und PCI-13 ein Maximum der Produktionsabnahme nach 48 Stunden Inkubationsdauer angenommen werden. Nach dem Erreichen des Maximums der CCL22-Produktionsabnahme nach 48h wurde bei beiden verwendeten HNSCC-Zelllinien ein Rückgang des Inhibierungspotentials beobachtet.

A) Intrazelluläre Produktion:



B) Extrazelluläre Expression:



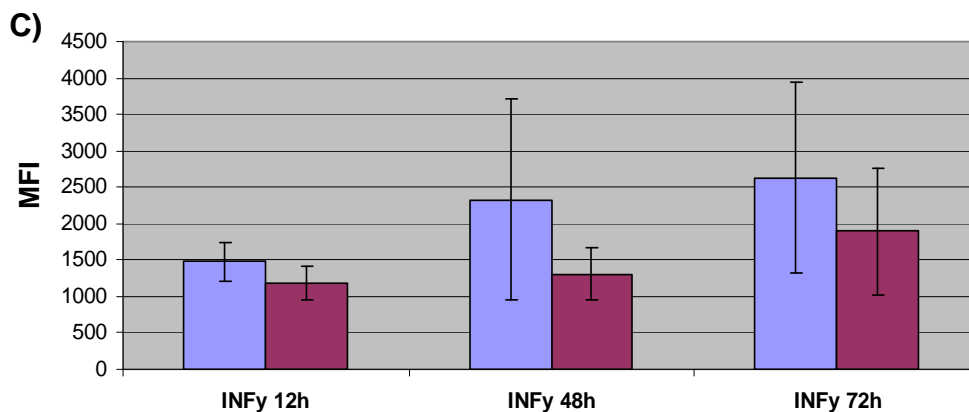


Abb. 3-10: Einfluss von IFN- γ auf die CCL22-Produktion durch HNSCC, am Beispiel von PCI-1 als Dot-Blot-Fenster (links) und Histogramm (rechts).

Die permanenten HNSCC-Zelllinien PCI-1 und PCI-13 wurden mit 2 μ l (4000 pg/ml) rekombinatem Interferon-gamma inkubiert und die Inkubation nach 12, 48 oder 72 Stunden gestoppt. Das Level der CCL22-Expression wurde vor und nach der Inkubation durch die Messung der 'Mean Fluorescence Intensity' (MFI) im Durchflusszytometer ermittelt. **(A)** und **(B)** Darstellung des inhibierenden Effekts von IFN- γ sowohl auf die intrazelluläre CCL22-Produktion **(A)** als auch auf die extrazelluläre CCL22-Expression **(B)** von HNSCC-Zellen. **I)** stellt die CCL22-Expression ohne IFN- γ Einfluss dar, während **II)** die CCL22-Expression nach Inkubation (Dauer 48h) mit IFN- γ zeigt. **(C)** Darstellung der Abnahme der CCL22-Produktion am Beispiel der HNSCC-Zelllinie PCI-1 über einen Inkubationszeitraum bis hin zu 72 Stunden (12h, 48h, 72h) in Prozent gezeigt.

Betrachtet man außerdem den inhibierenden Einfluss von IFN- γ auf die Expression des CCL22 Chemokinrezeptors CCR4, so fiel auf, dass sich die CCR4-Expression auf den HNSCC-Zelllinien PCI-1 und PCI-13 ebenfalls nach der Inkubation mit IFN- γ veränderte. Beide untersuchten Zelllinien zeigten die deutlichste Abnahme der CCR4-Expression nach einer Inkubationsdauer von 48h. Die Suppression der CCR4-Expression unterlag allerdings deutlicheren Schwankungen als die CCL22-Expression.

3.4 Serumkonzentrationen des Chemokins CCL22 in HNSCC-Patienten

In den vorherigen Versuchen (siehe auch 3.1.2) konnte gezeigt werden, dass Patienten mit HNSCC im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine signifikant erhöhte Anzahl an CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Treg-Zellen innerhalb der Population der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aufweisen. Um ein mögliches Verhältnis zwischen dem

Level des migratorischen Chemokins CCL22 und der Menge an $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ Treg-Zellen in Patienten mit HNSCC beurteilen zu können, wurde die quantitative Bestimmung von CCL22 (MDC) in den Seren von 19 HNSCC-Tumorpatienten (TB) und 21 gesunden Kontrollen (G) mittels ELISA (*Quantikine[®] Human MDC Immunoassay* von *R&D Systems*) durchgeführt. Die zellfreien Seren wurden aus gesunden Einzelblutproben freiwilliger Spender bzw. aus Blutproben von HNSCC-Patienten gewonnen. 11 Tumorpatienten wiesen eine aktive HNSCC-Erkrankung auf; 8 mit "po" gekennzeichnete Patienten zeigten keine Hinweise auf eine Tumorerkrankung (post-operativ) und eine onkologische Therapie des HNSCC lag zwischen 1,5 und 9 Jahren zurück.

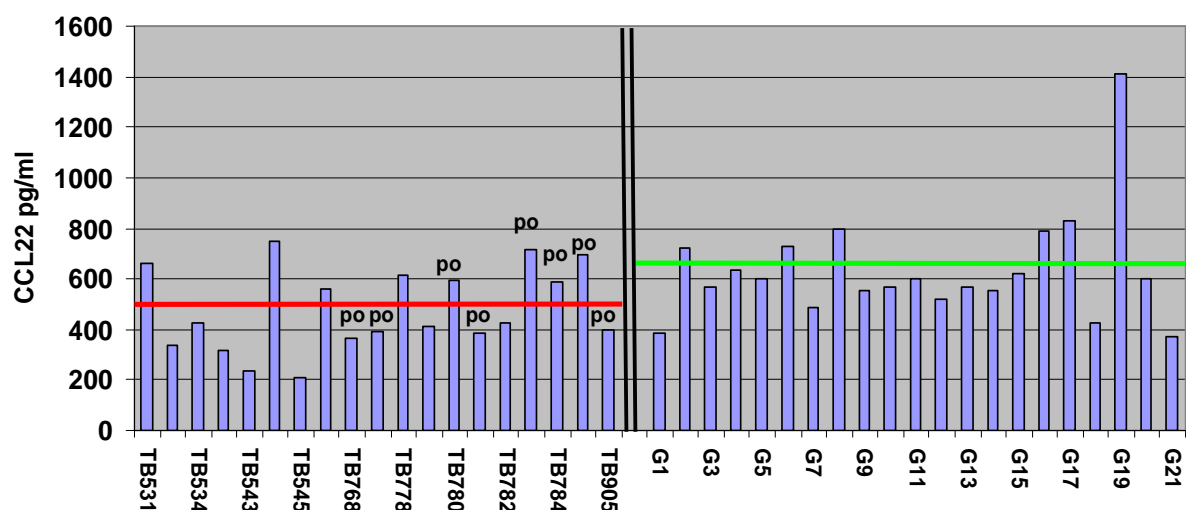


Abb. 3-11: Konzentration (pg/ml) des Chemokins CCL22/MDC im Serum.

Darstellung der CCL22-Konzentrationen (pg/ml) in den Seren von 19 HNSCC-Patienten (TB) im Vergleich zu 21 gesunden Einzelblutproben freiwilliger Spender (G). 11 Tumorpatienten zeigten Anzeichen für eine aktive HNSCC-Erkrankung; 8 mit "po" gekennzeichnete Patienten wiesen keine Hinweise einer Tumorerkrankung (post-operativ) oder eines Rezidivs auf und eine onkologische Therapie des HNSCC lag zwischen 1,5 und 9 Jahren zurück. Die Bestimmung des CCL22-Levels in wurde mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) durchgeführt. Der rote bzw. der grüne Querbalken gibt den Mittelwert der CCL22-Konzentrationen in den Seren der HNSCC-Patienten bzw. der gesunden Kontrollen an. Die CCL22-Konzentration im Serum von HNSCC-Patienten (Mittelwert 476,73 pg/ml; Standardabweichung 163,25) – sowohl mit einer aktiven Tumorerkrankung als auch nach erfolgreicher Therapie – unterschied sich nicht von der CCL22-Konzentration (Mittelwert 634,87 pg/ml; Standardabweichung 218,56), die in den Seren gesunder Kontrollen gemessen wurde.

Überraschenderweise zeigte sich, dass außer individuellen Differenzen keine signifikanten Unterschiede zwischen der CCL22-Konzentration in den Seren von HNSCC-Patienten und den Seren gesunder Kontrollen bestanden (Abb. 3-11). Des Weiteren ließen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der CCL22-Werte zwischen den Seren der prä- und postoperativen Patienten feststellen.

Beim Vergleich der CCL22-Konzentrationen der einzelnen Patientenseren mit dem jeweiligen TNM-Stadium der HNSCC-Tumoren zeigte sich ebenfalls keine signifikante Korrelation. Betrachtet man zum Beispiel in der *Abb. 3-11* die CCL22-Konzentrationen von den Seren TB544 und TB534, so fallen deutliche Konzentrationsunterschiede (746,75 pg/ml bei T544 versus 428 pg/ml bei T534) auf, obwohl die beiden Patienten ähnliche TNM-Stadien aufweisen; cT4bcN2bcM1 bei T544 und cT3-4cN2ccM1 bei TB534. Auch bestand keine Korrelation zwischen der unter 3.1.2 beschriebenen Anzahl der regulatorischen T-Zellen und der Höhe der CCL22-Konzentrationen einzelner Seren. Sowohl die Menge der Tregs in den Tumorpatienten als auch in den gesunden Kontrollen waren unabhängig von der CCL22-Konzentration.

Allerdings zeigten Messungen im Durchflusszytometer eine Verbindung zwischen regulatorischen T-Zellen und der Produktion von CCL22. Wie bereits beschrieben, wird CCL22 konstitutiv von dendritischen Zellen, B-Zellen, Makrophagen und thymischen medullären epithelialen Zellen exprimiert, wohingegen Monozyten, NK-Zellen, aber auch T-Lymphozyten das Chemokin erst nach adäquater Stimulation produzieren (Galli *et al.*, 2000). Es zeigte sich, dass Lymphozyten sowie unterschiedliche CD4⁺ T-Zellsubpopulationen, vor allen Dingen CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Treg Zellen, in Patienten mit HNSCC und gesunden Kontrollen CCL22 produzieren und/oder auf ihrer Zelloberfläche exprimieren (*Abb. 3-12*).

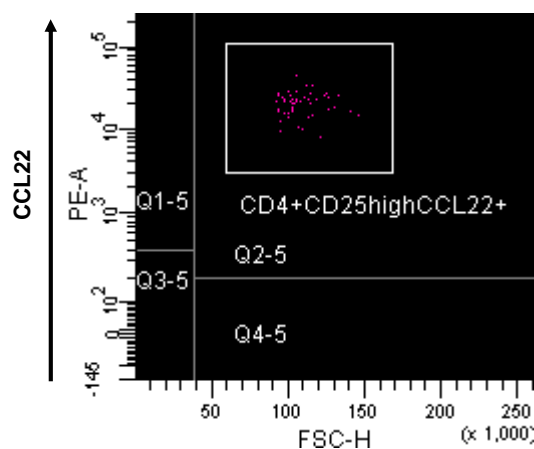


Abb. 3-12: CCL22 Produktion durch Treg-Zellen.

Darstellung der Produktion bzw. Expression von CCL22 durch Lymphozyten im Dot-Plot-Fenster, hier am Beispiel von CD4⁺CD25^{high} Treg Zellen.

Zwischen Treg Zellen und weiteren CD4⁺ T-Zellsubpopulationen wie Lymphozyten, CD4⁺ T-Zellen im Allgemeinen oder CD4⁺CD25⁺ und CD4⁺CD25^{low}CD127^{high} T-Zellen in HNSCC-Patienten und gesunden Kontrollen bestand kein signifikanter Unterschied sondern nur ein Trend in Bezug auf eine Differenz ($p=0,046$; Trend: $0,05 < p < 0,1$).

3.5 Überblick über die Ergebnisse

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass HNSCC Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine hochsignifikante Zunahme der Anzahl regulatorischer CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Zellen innerhalb der PBMC aufweisen. Zudem ergaben die gewonnenen Ergebnisse, dass Malignome des Oropharyngealtraktes (HNSCC) wider Erwarten einen bedeutenden und vor allen Dingen einen lang über das Therapieende hinaus bestehenden Einfluss auf die Anzahl regulatorischer CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} T-Zellen im peripheren Blut von HNSCC-Patienten ausüben. Die Anzahl regulatorischer T-Zellen steht in keiner Relation zum jeweiligen Tumorstadium.

Es ist bekannt, dass T-Zellen, aber auch Treg Zellen im Tumor akkumulieren. In dieser Arbeit sollte die Bedeutung des Chemokin CCL22, einem potentiellen Attraktant regulatorischer T-Zellen, in HNSCC Patienten untersucht werden. Die Ergebnisse ergaben eine deutliche Produktion von CCL22 durch permanente HNSCC-Zelllinien.

4 Diskussion

4.1 Bedeutung regulatorischer T-Zellen in Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren (HNSCC)

Malignome und insbesondere Plattenepithelkarzinome des Oropharyngealtraktes zeigen zunehmende Inzidenzraten. Im Kopf-Hals-Bereich vorkommende maligne Tumore rangieren in der Tumorstatistik momentan weltweit an sechster Stelle unter den am häufigsten auftretenden Malignomen (Parker *et al.*, 1996; Parkin *et al.*, 1999; Chin *et al.*, 2006; St John *et al.*, 2006). Trotz aller Weiterentwicklungen und Anstrengungen in Therapie und Diagnostik konnte die ungünstige Prognose in den vergangenen Jahrzehnten insgesamt nicht verbessert werden. Zum einen liegt ein Grund hierfür in der Tatsache, dass bei zwei Dritteln der Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCC) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung schon ein fortgeschrittenes Tumorstadium mit Lymphknotenmetastasierung vorliegt, was die Prognose deutlich verschlechtert (Remmert *et al.*, 2001). Zum anderen spielt das menschliche Immunsystem sowohl bei der Entstehung und dem Wachstum als auch bei der Bekämpfung von Malignomen jeglicher Art eine entscheidende Rolle. Die Vergangenheit hat gezeigt, dass sich Kopf-Hals-Karzinome effektiven Anti-Tumor-Immunantworten durch das Immunsystem entziehen und Immunzellen sogar suppressiv beeinflussen können (Grandis *et al.*, 2000; Hoffmann *et al.*, 2002; Pries *et al.*, 2006a; Pries *et al.*, 2006b; Pries und Wollenberg, 2006). Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen zeigen eine massiv unterdrückte Anti-Tumor-Immunität durch die Bildung eines immunsuppressiven Mikroenvironments. HNSCC-Zellen sezernieren Zytokine, durch die nicht nur die Funktion der Immunzellen beeinträchtigt und herunterreguliert, sondern die Immunzellen auch dazu stimuliert werden, selbst Th2- und immunsupprimierende Zytokine zu produzieren (Pries und Wollenberg, 2006). Die Immunantwort verschiebt sich somit unter Einfluss der Kopf-Hals-Tumoren in Richtung einer für die Tumorbekämpfung wenig effektiven Th2-Antwort (Young, 2004). Diese Th2-Antwort inhibiert die Produktion von Th1-Zytokinen, die eigentlich für eine erfolgreiche Bekämpfung der Tumorzellen

notwendig sind und die die Komponenten der zellulären Immunantwort, wie Zytotoxischen T-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen, stimulieren (Pries *et al.*, 2006a; Young, 2006). Neben Zytokinen scheinen aber auch vor allem regulatorische T-Zellen (Treg) für die Regulation von Immuntoleranzmechanismen und für die Immunmodulation im Rahmen von Anti-Tumorantworten von großer Bedeutung zu sein (Baecher-Allan und Anderson, 2006a; Young, 2006; Wang und Wang, 2007). In der Literatur wurde in den vergangenen Jahren eine Vielzahl immunregulatorischer Funktionen und verschiedener Subtypen regulatorischer T-Zellen (Treg) in Tumorpatienten beschrieben (Wang und Wang, 2007). Mehrere Studien (Shimizu *et al.*, 1999; Suttmüller *et al.*, 2001; Elpek *et al.*, 2007) haben gezeigt, dass die Entfernung von Treg Zellen zu verstärkten Immunantworten gegen Tumor-Antigene und schließlich zu der Vernichtung des Tumors führt. Treg sind sowohl in gesunden als auch in Tumor-Patienten an der Erhaltung der peripheren Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen maßgeblich beteiligt. Die Konzepte verschiedener Autoren postulieren, dass die in Tumorpatienten zu findende periphere immunologische Toleranz gegenüber Tumorzellen und Tumorwachstum durch Treg Zellen generiert und aufrechterhalten wird, indem Treg Zellen Immunantworten gegen Tumorantigene (TAA) supprimieren. (Ferrone und Whiteside, 2007; Wang und Wang, 2007; Bergmann *et al.*, 2008; Szczepanski *et al.*, 2009). Die Kontrolle dendritischer Zellen, Makrophagen, B-Zellen und natürlicher Killerzellen (NK) (Barnett *et al.*, 2005; Ralainirina *et al.*, 2006) bzw. die Suppression der Aktivität und Proliferation von T-Effektorzellen (Alhamarneh *et al.*, 2008) lässt Treg Zellen entscheidend zum „Immune escape“ der Kopf-Hals-Tumore beitragen. Es wurde bereits eine deutliche Zunahme der Anzahl der regulatorischen $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ T-Zellen in der peripheren Blutzirkulation von Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten wie Bronchialkarzinom, Mammakarzinom (Pakravan *et al.*, 2007), Prostatakarzinom (Miller *et al.*, 2006), Magenkarzinom (Shen *et al.*, 2009) und B-Zell non Hodgkin Lymphom (Yang *et al.*, 2006) beschrieben.

Angesichts dieser Erkenntnisse wurde in dieser Arbeit deshalb umfassend die Rolle regulatorischer T-Zellen innerhalb des Immunsystems in Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren (HNSCC) analysiert. Um die Therapiemöglichkeiten von HNSCC zu verbessern, ist ein umfassendes Verständnis der gegenseitigen Einflüsse von HNSCC und regulatorischen T-Zellen notwendig. Im Einklang mit der Literatur

konnte in dieser Doktorarbeit gezeigt werden, dass im peripheren Blut von Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor im Vergleich zu gesunden Kontrollen ebenfalls eine hoch signifikant höhere Anzahl an CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Treg Zellen innerhalb der Population der CD4⁺ Lymphozyten zu finden ist. Die untersuchten HNSCC-Patienten dieser Arbeit wiesen einen Prozentanteil von 3,4% ± 2,5 CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Treg Zellen im Vergleich zu einem Prozentanteil von 1,8% ± 1,7 (p<0,01) im Blut von gesunden Kontrollen auf. In der Literatur findet man allerdings schwankende Angaben von 2% bis hin zu 10% der gesamten CD4⁺ T-Zellen (Yamazaki *et al.*, 2003; Piccirillo und Thornton, 2004). Die Ursache dieser schwankenden Angaben in der Literatur ist in der Problematik der Definition regulatorischer T-Zellen zu sehen. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, haben Sakaguchi *et al.* (Sakaguchi *et al.*, 1995) gezeigt, dass ein charakteristisches Merkmal der CD4⁺ Treg die stetige Expression der α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors (CD25) darstellt. Obwohl die Expression von CD25 spezifisch für Tregs in Mäusen zu sein scheint, findet man in Menschen die α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors (CD25) zusätzlich auch auf aktivierten Effektor-T-Zellen (Baecher-Allan und Anderson, 2006a). Allerdings exprimieren aktivierte T-Zellen im Vergleich zu Treg den Rezeptor CD25 deutlich niedriger – bis zu 30 % der CD4⁺ T-Zellen - und mehrere Studien betonen, dass nur die CD4⁺CD25⁺ T-Zellen mit einer hohen Expression von CD25 (CD25^{high}) suppressive Aktivität aufzeigen (Baecher-Allan *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2006). Folglich bestehen die humanen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus zwei verschiedenen Populationen: suppressive CD4⁺CD25^{high} Treg Zellen versus aktivierte CD4⁺CD25^{low} T-Zellen ohne regulatorische Aktivität. Neben dieser hohen Expression von CD25 weisen Treg Zellen im Gegensatz zu aktivierten T-Zellen zudem eine niedrige Expression von CD127 (CD127^{low}), der α -Kette des Interleukin-7 Rezeptors, auf (Liu *et al.*, 2006; Hartigan-O'Connor *et al.*, 2007; Ardon *et al.*, 2009; Klein *et al.*, 2009). CD127 wird auf allen humanen T-Zellen nach der Aktivierung zunächst herunterreguliert. Im Gegensatz zu einer deutlichen Reexpression von CD127 auf Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen, verbleiben Treg Zellen CD127^{low} (Liu *et al.*, 2006). Demzufolge erlaubt die Kombination von einer niedrigen CD127- (CD127^{low}) und einer hohen CD25- (CD25^{high}) Expression eine spezifische Analyse (Hartigan-O'Connor *et al.*, 2007) der suppressiven Treg Zellen im Durchflusszytometer. Demnach stellen etwa 2-4 % der CD4⁺ T-Lymphozyten Treg Zellen mit hohen

Leveln des Rezeptors CD25 (CD25^{high}) dar (Baecher-Allan und Anderson, 2006a) und diese Angaben stimmen mit den Ergebnissen dieser Doktorarbeit überein.

Die gemessene Anzahl der Treg Zellen stand in keiner Korrelation zu der Lokalisation des Tumors bzw. des Tumorstadiums (TNM-Stadium) (Strauss *et al.*, 2007a) und erwies sich somit unabhängig von der Größe des Malignoms, des Ausmaßes der lymphogenen Metastasierung und dem Vorkommen von Fernmetastasen.

Für solide Tumoren im Bereich des Gastrums, des Ösophagus (Cao *et al.*, 2007) und des Ovars (Curiel *et al.*, 2004) ist beschrieben worden, dass die Akkumulation von Treg Zellen mit einer reduzierten Überlebensrate der Tumorpatienten und mit der Wahrscheinlichkeit von Rezidiven korreliert (Curiel *et al.*, 2004; Barnett *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2005; Bates *et al.*, 2006; Kono *et al.*, 2006; Petersen *et al.*, 2006; Elpek *et al.*, 2007; Gobert *et al.*, 2009). Zudem nimmt man an, dass die Anzahl regulatorischer T-Zellen deutlich mit einer Tumorprogression und invers mit dem Erfolg einer Tumortherapie im Zusammenhang steht (Kosmaczewska *et al.*, 2008). Somit spiegelt die erhöhte Anzahl regulatorischer Zellen in HNSCC-Patienten die gesteigerte Suppression des Immunsystems durch Abschwächung von Anti-Tumor-Immunantworten gegen Tumorantigene, die in Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren zu finden sind, wieder (Schaefer *et al.*, 2005; Lau *et al.*, 2007). Diese Suppression spezifischer Immunantworten kann dazu beitragen, dass HNSCC-Standardtherapien die schlechte 5-Jahresüberlebensrate von HNSCC-Patienten nur geringfügig verbessern. Allerdings findet man in der Literatur auch kontroverse Aussagen. *Badoual et al* (Badoual *et al.*, 2006; Alhamarneh *et al.*, 2008) schreiben, dass regulatorische Fop3⁺CD4⁺ T-Zellen abhängig vom klinischen Tumorstadium positiv mit lokoregionaler Kontrolle in HNSCC korrelieren. Dies soll durch die Abschwächung schädlicher Entzündungsreaktionen, die eine Tumorentstehung begünstigen können, geschehen. Da sich die untersuchten Patienten hinsichtlich Nebenerkrankungen, Alter und Allgemeinzustand unterscheiden, ist es schwierig aufgrund der erhaltenen Werte der regulatorischen T-Zellen eine allgemein gültige Aussage zu treffen. Weitere Studien sind erforderlich, um eine eindeutige Rolle regulatorischer T-Zellen als einen prognostischen Faktor zu etablieren.

4.2 Phänotyp regulatorischer T-Zellen

Die gewonnenen Ergebnisse offenbarten außerdem, dass zirkulierende $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ T-Zellen in HNSCC-Patienten einen charakteristischen Phänotyp aufwiesen. Dieser Phänotyp wurde durch Marker wie die α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors (CD25), den Transkriptionsaktivator Foxp3, das immunregulatorische Protein CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4; CD152), den Glucocorticoid-induzierten Tumornekrosefaktorrezeptor GITR, CD45RA, die Chemokinrezeptoren CCR7 und CCR4 und den 'homing' Rezeptor CD62L bestimmt. Die Expression dieser Marker durch $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ T-Zellen belegt, dass es sich bei den untersuchten Zellen um regulatorische T-Zellen handelt (Lau *et al.*, 2007). Bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren im Vergleich zu gesunden Kontrollen konnten signifikant erhöhte Level an Foxp3⁺ exprimierenden $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ Treg Zellen gefunden werden. Der Transkriptionsfaktor Foxp3 gilt als ein entscheidender Faktor der Entwicklung und Funktion der regulatorischen $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ T-Zellen, und für unterschiedliche solide Tumoren ist in der Vergangenheit beschrieben worden, dass die Akkumulation von Foxp3⁺ Treg Zellen mit einer schlechteren Prognose für die Tumorpatienten assoziiert ist (Curiel *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2005; Bates *et al.*, 2006; Petersen *et al.*, 2006). Somit kann die erhöhte Anzahl Foxp3 exprimierender Treg Zellen die gesteigerte Suppression des Immunsystems, die in Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren zu finden ist, reflektieren (Lau *et al.*, 2007). Es ist hingegen allerdings auch wichtig zu betonen, dass laut Hori *et al* (Hori, 2008) die Expression von Foxp3 in T-Lymphozyten nicht spezifisch mit suppressiven Funktionen und Eigenschaften in Verbindung zu bringen ist. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass im Menschen die Expression des intrazellulären Rezeptors Foxp3 durch eine Aktivierung von $CD4^+$ T-Zellen (Ziegler, 2007) induziert werden kann und dass diese Foxp3-Expression nicht unbedingt spezifisch für regulatorische T-Zellen ist. Deshalb gilt Foxp3 als alleiniger Marker für die Identifizierung regulatorischer T-Zellen innerhalb der $CD4^+$ Lymphozyten nach heutigen Erkenntnissen als ungeeignet (Liu *et al.*, 2006; Seddiki *et al.*, 2006; Strauss *et al.*, 2007c).

Bei HNSCC-Patienten konnten neben dem signifikant erhöhten Level an $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ Foxp3⁺ Treg Zellen auch erhöhte Anzahlen von Foxp3

exprimierenden Lymphozyten, $CD4^+$ T-Zellen, $CD4^+CD25^+$ und $CD4^+CD25^{low}CD127^{high}$ T-Zellen gefunden werden. Es ist anzunehmen, dass diese Zellen aufgrund der beschriebenen Stimulation und Aktivierung durch Tumorantigene des HNSCC den Rezeptor Foxp3 hochregulieren (Ziegler, 2007).

In dieser Doktorarbeit konnte bestätigt werden, dass Treg Zellen CCR7 und CD62L, so genannte T-Lymphozyten „homing“ Rezeptoren, exprimieren. Die Expression des Chemokinrezeptors CCR7 und des Rezeptors CD62L auf der Oberfläche von Lymphozyten ist mit dem Erlangen eines migratorischen Phänotyps verbunden (Sallusto *et al.*, 1999; Campbell *et al.*, 2001; Valzasina *et al.*, 2006; Lau *et al.*, 2007; Strauss *et al.*, 2007a). Dies lässt annehmen, dass dieser Chemokinrezeptor eine verstärkte Migration regulatorischer T-Zellen zu lokalen Lymphknoten und möglicherweise auch in die nähere Umgebung des Tumors bedingen kann (Strauss *et al.*, 2007b). In Lymphknoten bzw. in der Tumorumgebung können die rekrutierten Treg Zellen dann ihre immunsuppressive Funktion ausüben und so Anti-Tumor-Immunantworten verhindern.

Neben der Expression des Chemokinrezeptors CCR7 konnte auch eine Expression des Chemokinrezeptors CCR4 auf den regulatorischen $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ T-Zellen und den restlichen untersuchten PBMCs, wie Lymphozyten, $CD4^+$ T-Zellen, $CD4^+CD25^+$ und auf $CD4^+CD25^{low}CD127^{high}$ T Zellen bestätigt werden. CCR4 ist ein Rezeptor, der nach Aktivierung durch zum Beispiel Tumorantigene oder durch TCR- (T-Zellrezeptor) und CD28-Kontakt auf T-Zellen hochreguliert werden kann (D'Ambrosio *et al.*, 1998). Dieses Phänomen kann als Ursache der in den HNSCC-Patienten signifikant erhöhten absoluten Anzahl an CCR4-Molekülen auf der Zelloberfläche einzelner Zellen angesehen werden.

4.3 Langfristiger Einfluss des Immunsystems durch HNSCC

Zudem ergaben die gewonnenen Ergebnisse, dass Malignome des Oropharyngealtraktes (HNSCC) wider Erwarten einen bedeutenden und vor allen Dingen einen lang über das Therapieende hinaus bestehenden Einfluss auf die Anzahl regulatorischer $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ T-Zellen im peripheren Blut von

HNSCC-Patienten ausüben. Dies äußert sich dadurch, dass der durchschnittliche prozentuale Anteil der CD4⁺CD25^{high}CD127⁺ Treg Zellen an der Gesamtheit der CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut der untersuchten HNSCC-Patienten auch nach durchgeführter onkologischer Therapie weiterhin signifikant gegenüber gesunden Kontrollen erhöht ist; dies lässt sich sogar nach bis zu 9 Jahren nach erfolgreich durchgeführter onkologischer Therapie ohne Anzeichen eines Rezidivs finden. Die Daten der Messungen im Durchflusszytometer legten somit dar, dass Kopf-Hals-Tumoren zu einer permanenten Veränderung und Verschiebung der Anzahl regulatorischer T-Zellen mit kaum erkennbaren Erholungsraten trotz erfolgreicher kurativer Therapie in HNSCC-Patienten führen. Diese Daten stimmen mit anderen in den letzten Jahren veröffentlichten Studien überein (Schaefer *et al.*, 2005; Strauss *et al.*, 2007a). Diese Studien postulieren, dass maligne Tumoren, unabhängig vom Krankheitsstadium (TNM-Stadium), Lokalisation des Tumors oder einer Lymphknotenbeteiligung, einen starken, lang anhaltenden Einfluss auf die Homeostase und Verteilung der Lymphozyten haben. Dieser bedeutende Einfluss scheint unabhängig von der Art der onkologischen Therapie zu sein und zeigt sich sowohl nach Resektion des Tumors als auch nach einer Therapie mit einer Kombination aus Resektion des Tumors und Chemo- oder Radiochemotherapie (Kuss *et al.*, 2004; Schaefer *et al.*, 2005). Als eine mögliche Ursache für die permanente postoperative Erhöhung der Anzahl regulatorischer T-Zellen wird in der Literatur ein postoperativ in Abwesenheit des Tumors bestehender Einfluss entzündungsfördernder und suppressiver Zytokine, die durch den Tumor vor der durchgeführten Therapie sezerniert wurden, angesehen (Strauss *et al.*, 2007a). Zudem wird angenommen, dass Treg Zellen resistent gegenüber konventioneller Chemotherapie sind (Szczepanski *et al.*, 2009). Diese Annahmen sollte allerdings für HNSCC noch näher abgeklärt werden.

Darüber hinaus schreiben Strauss *et al.* (Strauss *et al.*, 2007a) in ihrer Veröffentlichung, dass HNSCC-Patienten nach einer erfolgreich durchgeführten onkologischen HNSCC-Therapie sogar signifikant höhere Treg-Anzahlen aufweisen als Patienten mit einer aktiven HNSCC-Erkrankung. Diese Aussage kann mit den Ergebnissen dieser Doktorarbeit nicht bestätigt werden.

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit erlauben somit die Annahme, dass regulatorische T-Zellen eine zentrale Rolle innerhalb des Kontaktbereichs des Immunsystems mit Malignomen spielen (Schaefer *et al.*, 2005).

4.4 Herkunft regulatorischer T-Zellen

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse haben eine Vielzahl Fragen bezüglich der Ursache der erhöhten Anzahl regulatorischer Zellen in Patienten mit Kopf-Hals Karzinomen und deren Rolle im HNSCC „Immune escape“ aufgeworfen. Welcher Prozess kann als Ursache der veränderten Anzahl regulatorischer T-Zellen angenommen werden?

Studien, die die Herkunft der Treg Zellen in Tumoren untersucht haben, konnten die Komplexität der Treg Proliferation, Expansion bzw. Konversion und die unterschiedlichen Einflüsse auf diese Vorgänge aufzeigen. Ein definitiver Mechanismus ist bisher allerdings unklar. Wahrscheinlich ist ein Zusammenspiel aus Proliferation regulatorischer T-Zellen und/oder Konversion regulatorischer T-Zellen aus naiven $CD4^+CD25^-$ T-Zellen bzw. eine Interaktion von Zytokinen einerseits und Stimulation durch Tumorantigene andererseits (Nishikawa *et al.*, 2003; Baecher-Allan und Anderson, 2006b; Zou, 2006; Liu *et al.*, 2007). Obwohl die zentrale Entstehung regulatorischer $CD4^+CD25^+$ T-Zellen im Thymus als sicher gilt, wird bezweifelt, dass dies der einzige Weg ihrer Entstehung ist (Valzasina *et al.*, 2006; Zou, 2006; Zhou und Levitsky, 2007). Im Rahmen der altersbedingten Thymusinvolution sinkt die Zahl an thymusgenerierten Lymphozyten (Zou, 2006). Daher müsste bei einer ausschließlichen zentralen Entstehung die Zahl an $CD4^+CD25^+$ Tregs mit der Zeit abnehmen. Dies ist jedoch nicht der Fall (Fernandez-Martin *et al.*, 2006), es ist sogar ein altersbedingter Anstieg dieser Zellpopulation zu beobachten (Gregg *et al.*, 2005). Demnach ist anzunehmen, dass regulatorische T-Zellen in der Peripherie, wie zum Beispiel in der Tumorumgebung, induziert und differenziert werden können. Als eine Ursache der gesteigerten Treg Anzahl wird die Proliferation von $CD4^+CD25^+$ Tregs in der Anwesenheit von Zytokinen wie IL-2 oder TGF- β angesehen (Valzasina *et al.*, 2006). Studien haben unter anderem gezeigt, dass TGF- β von Kopf-Hals-Tumoren sehr stark sezerniert und exprimiert wird (Logullo *et al.*, 2003; Rosenthal *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007). Zudem können Tumor-assoziierte dysfunktionelle dendritische Zellen die Expansion regulatorischer Zellen induzieren (Zou, 2006). Neben dieser Expansion von $CD4^+CD25^+$ Treg besteht außerdem die Möglichkeit der Neuentstehung bzw. Konversion von sogenannten induzierten T-

regulatorischen Zellen aus naiven peripheren CD4⁺CD25⁻ T-Zellen durch die Aktivierung von T-Lymphozyten durch eine suboptimale Antigen-Präsentation in der Anwesenheit von immunsuppressiven Zytokinen wie TGF- β und IL-10 und/oder Kostimulation (Maggi *et al.*, 2005) durch unreife dendritische Zellen (Lohr *et al.*, 2006; Sojka *et al.*, 2008). Tumorzellen induzieren zudem die Entstehung von induzierten Treg aus naiven T-Zellen über direkten Zell-Zellkontakt zwischen Tumorzellen und T-Zellen und über TGF- β -Produktion (Liu *et al.*, 2007; Mittal *et al.*, 2008). Diese neu generierten regulatorischen CD4⁺CD25⁺ Treg Zellen unterscheiden sich nicht hinsichtlich ihres Phänotyps und ihrer Funktion (Valzasina *et al.*, 2006) von den im Thymus entstandenen natürlichen regulatorischen T-Zellen. Es wird angenommen, dass die Konversion die entscheidende Grundlage für die erhöhte Anzahl an Treg Zellen darstellt und vom Tumor für den „Immune escape“ genutzt wird (Valzasina *et al.*, 2006). Ob diese Annahme allerdings auch auf Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches zu übertragen ist, müsste in entsprechenden Versuchen genauer geprüft und bestätigt werden.

4.5 CCL22 – ein wichtiges Chemokin in HNSCC

In einem gesunden Immunsystem wird das Chemokin CCL22 (Chemokinligand CCL22; macrophage derived chemokine; MDC oder STCP-1) normalerweise nur von Makrophagen, dendritischen Zellen, aktivierten B- und T-Lymphozyten und Monozyten gebildet (Andrew *et al.*, 1998; Jakubzick *et al.*, 2004; Echigo *et al.*, 2006) und als Sekretprotein in den Extrazellulärraum abgegeben. CCL22 kann sowohl als ein entzündliches als auch ein die Homeostase des Immunsystems unterstützendes Chemokin klassifiziert werden (Cronshaw *et al.*, 2004). Normalerweise bedingt CCL22 im Immunsystem vor allem die Migration Antigen-spezifischer T-Zellen zu dendritischen Zellen (Tang und Cyster, 1999; Wu *et al.*, 2001). Der Chemokinligand CCL22 wirkt aber auch als Botenmolekül neben Antigen-spezifischen T-Zellen chemotaktisch auf regulatorische T-Zellen (Baecher-Allan und Anderson, 2006b), chronisch aktivierte T-Lymphozyten, Monozyten, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen über den G-Proteingekoppelten Rezeptor CCR4. Zudem soll CCL22 neben der Migration von diesen Entzündungszellen auch deren Aktivitätszustand beeinflussen können. CCR4

zusammen mit dem korrespondierenden Liganden CCL22 wird somit als ein wichtiger Faktor der Regulation des Gleichgewichts und des Zusammenspiels des Immunsystems angesehen (Ishida und Ueda, 2006).

In dieser Doktorarbeit konnte allerdings durch die Experimente im Durchflusszytometer und Western-Blot gezeigt werden, dass auch permanente HNSCC-Zelllinien wie PCI 1, PCI 13, BHY und Cal 27 in der Lage sind, das Chemokin CCL22 zu produzieren (Abb. 4-1). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Studien. *Curiel et al.* (Curiel *et al.*, 2004) haben in einer Studie mit 104 Patientinnen mit Ovarialkarzinom verdeutlicht, dass Tumorzellen und die infiltrierenden Makrophagen in Ovarialkarzinomen in der Lage sind, CCL22 zu produzieren. Dieses CCL22 bedingt die Migration der Treg Zellen zum Tumor (Curiel *et al.*, 2004; Shevach, 2004; Miller *et al.*, 2006), wo sich die regulatorischen Zellen anreichern. Neben Ovarialkarzinomen zeigt die Literatur zudem, dass andere Tumoren wie Prostatakarzinome (Miller *et al.*, 2006), B-Zell non-Hodgkin Lymphome (Yang *et al.*, 2006), Hodgkin Lymphome (Niens *et al.*, 2008), Bronchialkarzinome (Nakanishi *et al.*, 2006), Glioblastome (Jacobs *et al.*), Ösophaguskarzinome (Maruyama *et al.*, 2010) und gastrale Adenokarzinome (Mizukami *et al.*, 2008) ebenfalls CCL22 sezernieren. CCL22 stellt somit eines der durch unterschiedliche Tumoren produzierten Zytokinen dar, das die Migration von u.a. regulatorischen T-Zellen, aber auch naiver $CD4^+CD25^-$ T-Effektorzellen über den Chemokinrezeptor CCR4 in die Tumorumgebung induziert (Curiel *et al.*, 2004) und deren Aktivitätszustand beeinflusst.

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit konnten bestätigen, dass Treg Zellen in HNSCC-Patienten den Chemokinrezeptor CCR4 exprimieren. Zudem ist bekannt, dass HNSCC-Patienten neben einer erhöhten Anzahl an Treg Zellen im peripheren Blut auch signifikant gesteigerte Werte regulatorischer T-Zellen innerhalb der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) aufweisen (Albers *et al.*, 2005). Diese erhöhte Anzahl regulatorischer T-Zellen innerhalb der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten und die CCR4-Expression zusammen mit dem geschilderten Ergebnis der CCL22-Produktion durch HNSCC-Zelllinien machen eine Rekrutierung und Akkumulierung regulatorischer T-Zellen durch CCL22 auch in HNSCC sehr wahrscheinlich. Diese Rekrutierung und Anhäufung von Treg Zellen in der Umgebung des jeweiligen Tumors vermag zu einer Verstärkung der in Tumorpatienten bereits bestehenden Suppression der Anti-Tumor-

Immunantwort führen (Shimizu *et al.*, 1999; Lau *et al.*, 2007) und somit den Tumor bei seinem Versuch unterstützen, sich der Kontrolle des Immunsystems zu entziehen (Shevach, 2004; Baecher-Allan und Anderson, 2006a; Needham *et al.*, 2006; Whiteside, 2006).

Wie bereits erwähnt, können neben regulatorischen T-Zellen auch naive CD4⁺CD25⁻ T-Effektorzellen über CCL22 in die Tumorumgebung rekrutiert werden (Curiel *et al.*, 2004; Niens *et al.*, 2008), da sie ebenfalls – wie in dieser Doktorarbeit gezeigt werden konnte (3.1.4.2) - den CCL22-Rezeptor CCR4 exprimieren. In der Tumorumgebung können diese naiven CD4⁺ T-Zellen dann unter dem Einfluss von Zytokinen wie TGF- β und IL-10, die von Tumorzellen bzw. den Tumor umgebenden dendritischen Zellen (Liu *et al.*, 2007) produziert werden, in regulatorische T-Zellen mit suppressiven Eigenschaften konvertiert werden. Dieser Prozess bedingt wiederum – wie im Kapitel 4.4 beschrieben - eine Zunahme der Anzahl regulatorischer T-Zellen in HNSCC-Patienten.

Für Patienten mit Hodgkin Lymphome (Ishida und Ueda, 2006; Niens *et al.*, 2008), aber auch für Malignome der Kopf-Hals-Region (Schaefer, 2005) findet man in der Literatur Angaben über signifikant erhöhte Serumwerte von CCL22 gegenüber gesunden Kontrollen. Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit konnten diese Aussage für HNSCC allerdings nicht bestätigen, sondern wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen HNSCC-Patienten und gesunden Kontrollen auf, obwohl im FACS und Western-Blot eine CCL22-Produktion durch HNSCC-Zelllinien gezeigt werden konnte. Dieses Ergebnis findet man in der Literatur auch für Patienten mit kolorektalem Adenokarzinom, für die niedrigere CCL22-Werte im Plasma bei allerdings signifikanter Zunahme des CCL22-Protein-Levels im Tumorgewebe im Vergleich zu normalen Kontrollen nachgewiesen werden konnten (Wagsäter, 2007). Die Ursache für diese Diskrepanz der Ergebnisse ist unklar. Allerdings könnte eine mögliche Erklärung in der Wahl der gesunden Kontrollen liegen. Als interne gesunde Kontrollen für die CCL22-ELISA-Messungen haben wir unter anderem zunächst „Buffy coats“ mitlaufen lassen. „Buffy coats“ sind leukozytenhaltige Präparate, die von mindestens 4 Blutspendern gewonnen werden und neben Leukozyten und Thrombozyten noch Reste von Erythrozyten und Plasma enthalten (Kreuz, 2009). Im Gegensatz zu Einzelblutproben erwies sich allerdings, dass sich „Buffy coats“ nicht als gesunde Kontrollen eignen.

Zusammenfassend kann aufgrund der gewonnenen CCL22-Ergebnisse dieser Doktorarbeit angenommen werden, dass die CCL22-Produktion durch HNSCC-Zellen nicht mit den CCL22-Konzentrationen im Serum von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen assoziiert ist. Trotzdem stellt CCL22 allerdings einen wichtigen Pfeiler des „Immune escapes“ der Kopf-Hals-Tumoren dar (Abb. 4-1).

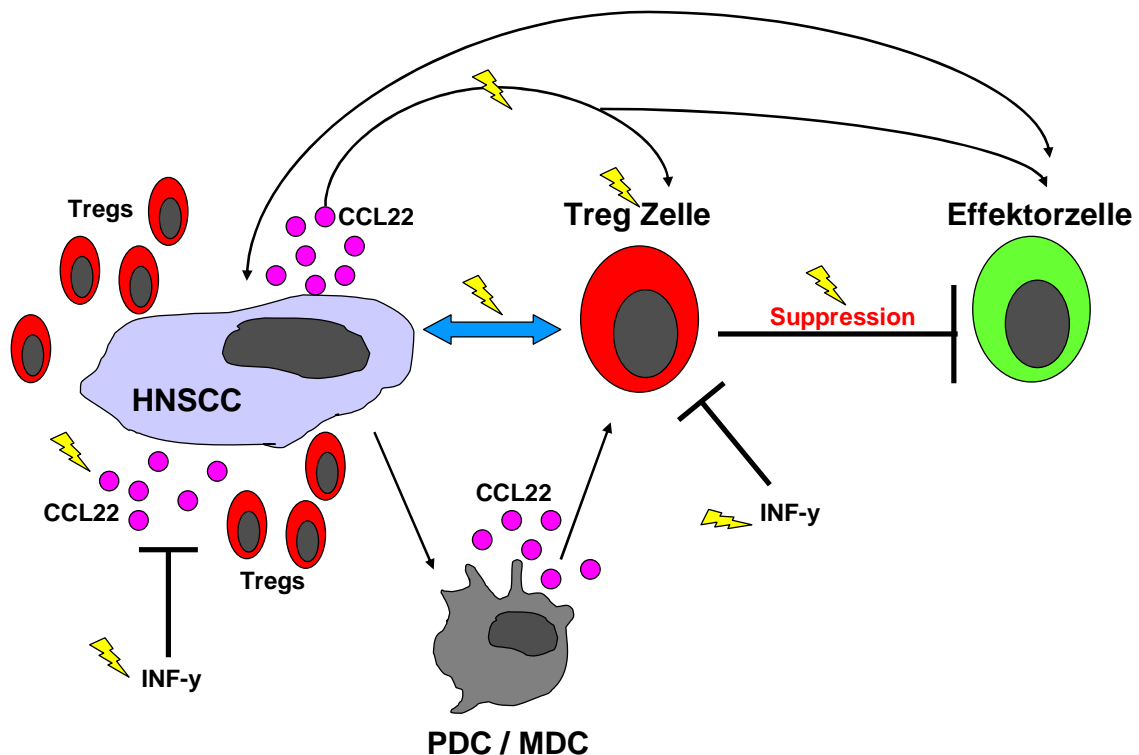


Abb. 4- 1 Modell der Interaktion von Tumor (HNSCC), regulatorischer T-Zellen und Effektorzelle (Immunzelle) im Rahmen des HNSCC „Immune escape“.

HNSCC und Tumor-umgebende dendritische Zellen produzieren das Chemokin CCL22, welches die Migration der Treg-Zellen zum Tumor induziert. Dies führt zu einer Akkumulation regulatorischer Zellen in der Tumorumgebung. Treg-Zellen supprimieren die Aktivität und Proliferation von T-Effektorzellen und tragen so entscheidend zum „Immune escape“ der Kopf-Hals-Tumoren bei. Die gelben Gewitterblitze stellen mögliche Therapieinterventionsansätze dar, die die Suppression des Immunsystems durch Treg-Zellen abschwächen und im Gegenzug Anti-Tumor-Antworten stärken sollen.

4.6 IFN- γ – eine mögliche Therapiestrategie

Die Tatsache, dass sich HNSCC Anti-Tumor-Immunantworten durch das Immunsystem entziehen und HNSCC-Patienten eine Immundefizienz aufweisen (Grandis *et al.*, 2000; Hoffmann *et al.*, 2002; Pries *et al.*, 2006a; Pries *et al.*, 2006b; Pries und Wollenberg, 2006), hat in den letzten Jahren das Konzept entstehen lassen, HNSCC durch die Gabe von immunologisch aktiven Stoffen zu therapieren (Richtsmeier *et al.*, 1990). Interferon-gamma (IFN- γ) stellt einen dieser Stoffe dar. IFN- γ wird zu den sogenannten Th1 Zytokinen (Yamashita und Kuroda, 2002) gerechnet und wird im menschlichen Körper von Th1 Zellen, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen sezerniert. Diesem Zytokin werden antivirale, immunregulatorische und antitumoröse Eigenschaften zugeschrieben (Schroder *et al.*, 2004; Assudani *et al.*, 2007). Studien haben gezeigt, dass die Gabe von IFN- γ die Lyse von Tumorzellen durch spezifische zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) signifikant erhöht und dieser zytolytische Effekt für Kulturen mit HNSCC-Zellen nach IFN- γ -Gabe nachgewiesen werden konnte (Street *et al.*, 1997; Ikeda *et al.*, 2002). Studien konnten zudem in Mäusen zeigen, dass IFN- γ -defiziente Mäuse Tumoren wie Lymphome und epitheliale Malignome entwickeln (Street *et al.*, 2002). Als wichtiger Eckpfeiler der Therapie der Kopf-Hals-Tumoren mit IFN- γ ist zu nennen, dass Th1 Zytokine - wie IFN- γ - in HNSCC-Patienten deutlich erniedrigt sind (Pries und Wollenberg, 2006), wohingegen die Immunantwort in diesen Patienten durch die Sekretion von Th2 Zytokinen bestimmt und beeinflusst wird, die wiederum eine durch Th1 Zytokine bedingte effektive Anti-Tumor-Immunantwort verhindern. Zudem kann durch Th2-Zytokine die Produktion von CCL22 gesteigert werden, was zu einer verstärkten Migration regulatorischer T-Zellen zum Tumor führt (Pries *et al.*, 2006b; Pries und Wollenberg, 2006).

Aus diesen Gründen wurde in dieser Doktorarbeit ein möglicher Effekt von Interferon-gamma auf die beschriebene CCL22-Produktion durch permanente HNSCC-Zelllinien untersucht (*Abb.4-1*). Die gewonnenen Daten offenbarten, dass Interferon-gamma (IFN- γ) eine Herunterregulation der CCL22-Produktion in HNSCC-Zelllinien bewirken kann. In der Literatur (Bonecchi *et al.*, 1998) ist durch IFN- γ eine direkte Suppression der Produktion bzw. Expression von CCL22 durch Makrophagen und dendritische Zellen bekannt. Somit beleuchten die Ergebnisse

der Suppression der CCL22-Produktion durch IFN- γ eine mögliche Therapiestrategie bei HNSCC, durch die das in Tumorpatienten bestehende Th1-Zykin-Defizit durch Gabe von IFN- γ zum einen behoben und zum anderen auch die Migration regulatorischer T-Zellen zum Tumor unterbrochen werden kann. Diese Therapiestrategie der Kopf-Hals-Tumoren in Form von einer Inhibierung der Funktion des Chemokins CCL22 ist allerdings sehr kritisch zu betrachten, da CCL22, wie bereits unter 4.5 beschrieben, von einer Vielzahl von Immunzellen sezerniert wird (Andrew *et al.*, 1998; Jakubzick *et al.*, 2004; Echigo *et al.*, 2006) und einen entscheidenden und wichtigen Beitrag sowohl zu Entzündungsvorgängen als auch zur Homeostase des Immunsystems liefert (Cronshaw *et al.*, 2004). Zudem bedingt CCL22 die Migration verschiedener Immunzellen und CCL22 wird zusammen mit dem korrespondierenden Rezeptor CCR4 als ein wichtiger Faktor des Zusammenspiels des Immunsystems angesehen (Ishida und Ueda, 2006). Somit könnte bei einer Inhibierung des Chemokins CCL22 die reguläre Immunabwehr abgeschwächt oder sogar komplett verhindert werden, was das Verwenden von CCL22 als Angriffsziel einer Immuntherapie erschwert.

Laut Literatur kann allerdings als ein interessanter Aspekt einer Immuntherapie mit Interferon-gamma die inhibierende Wirkung von IFN- γ auf die Generation und Proliferation regulatorischer T-Zellen angesehen werden (Caretto *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 2009). Dieser Inhibierung scheint eine Unterbrechung des Zellzyklus regulatorischer T-Zellen zu Grunde zu liegen (Cao *et al.*, 2009), was den Beitrag von regulatorischen T-Zellen am „Immune escape“ von HNSCC-Tumoren abschwächen könnte.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der Einsatz von Interferon-gamma im Rahmen einer Immuntherapie von HNSCC-Tumoren und die Folgen und Auswirkungen auf das gesamte Immunsystem noch näher untersucht werden muss.

4.7 Treg Charakteristika in HNSCC

Neben einer Expression von charakteristischen Treg Markern auf nicht suppressiven PBMCs wurde auch eine mögliche Expression dieser Marker auf

HNSCC-Zelllinien im Durchflusszytometer untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Rezeptoren CD45, GITR, CCR7 und CCR4 von HNSCC-Zellen auf ihrer Oberfläche exprimiert werden. Die Bedeutung der Expression von CD45 und GITR ist unklar. Hingegen findet man in der Literatur bestätigende Angaben zu einer Expression der Chemokinrezeptoren CCR7 und CCR4 auf Tumorzellen. Studien haben gezeigt, dass Tumorzellen wie zum Beispiel im Mammakarzinom (Ben-Baruch, 2008), Prostatakarzinom (Nakata *et al.*, 2008), pulmonalen Adenokarzinom (Maekawa *et al.*, 2008) und auch Tumorzellen in Kopf-Hals-Tumoren (Wang *et al.*, 2008) den Chemokinrezeptor CCR7 exprimieren. CCR7 spielt normalerweise eine wichtige Rolle innerhalb des Immunsystems, indem dieser Rezeptor die Migration aktivierter dendritischer Zellen von der Peripherie zu Lymphknoten induziert (Ben-Baruch, 2008). Es konnte allerdings in der Vergangenheit (Muller *et al.*, 2001) demonstriert werden, dass die Expression von CCR7 auf Tumorzellen des Mammakarzinoms mit Pseudopodenbildung, Invasivität und erhöhter Metastasenbildung verbunden ist. Zudem wurde eine Assoziation von CCR7 mit einer reduzierten 5-Jahresüberlebensrate beschrieben. Ähnliche Ergebnisse konnten für weitere solide Malignome wie kolorektale (Gunther *et al.*, 2005), gastrale (Mashino *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2004) und ösophageale (Ding *et al.*, 2003) Karzinome und Gebärmutterhalskrebs (Kodama *et al.*, 2007) gefunden werden. Von Bedeutung für die Diskussion der CCR7 Expression auf der Oberfläche permanenter HNSCC-Zelllinien ist die Aussage zweier Studien (Wang *et al.*, 2005; Ueda *et al.*, 2009), dass CCR7 auch in HNSCC eine wichtige Rolle bei der Metastasierung spielt. Wang *et al.* (Wang *et al.*, 2008) nehmen zudem an, dass CCR7 einen brauchbarer Indikator einer HNSCC-Progression und in Zukunft auch einen therapeutischen Angriffspunkt zur Bekämpfung von HNSCC-Metastasen darstellen könnte. Allerdings ist der genaue Mechanismus der durch den Rezeptor CCR7 bedingten Metastasenbildung und Lymphknotenbeteiligung bisher unklar (Ben-Baruch, 2008) und sollte noch eingehender untersucht werden. In diesem Zusammenhang wäre außerdem interessant, ob die Liganden – die Chemokine CCL19 und CCL21 – des Chemokinrezeptors CCR7 in HNSCC-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht sind.

Neben dem Rezeptor CCR7 scheint auch CCR4 an der Metastasenbildung von Tumoren beteiligt zu sein (Lee *et al.*, 2009). Lee *et al.* (Lee *et al.*, 2009) konnten

kürzlich für gastrale Malignome zeigen, dass CCR4-positive Tumoren eine signifikant schlechtere Prognose als CCR4-negative Tumoren aufweisen. Somit soll auch CCR4 auf Tumorzellen mit einer erhöhten Rezidivrate und einer verschlechterten Überlebensrate verbunden sein. Auch hier sollten weitere Versuche zur Klärung der Bedeutung dieser Aussage für Kopf-Hals-Malignome durchgeführt werden.

4.8 Ausblick

Mehrere Studien der letzten Jahre haben die aktive Suppression durch regulatorische T-Zellen als eines der Haupthindernisse einer erfolgreichen Anti-Tumor-Therapie identifiziert (Elkord *et al.*, 2010 ; Mougiakakos *et al.*, 2010 ; Zou, 2006; Ruter *et al.*, 2009). Die gesteigerte Anzahl regulatorischer T-Zellen in Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren steht für eine verminderte Anti-Tumor-Immunantwort auf Tumor-assoziierte Antigene (TAA) (Lau *et al.*, 2007), und als Konsequenz resultiert ein verstärktes Tumorwachstum sowie eine erhöhte Rezidivrate von Kopf-Hals-Tumoren. Diese Erkenntnisse zusammen mit der relativen Ineffizienz der zur Verfügung stehenden HNSCC-Therapieverfahren machen die Suche nach alternativen therapeutischen Strategien dringend erforderlich (Alhamarneh *et al.*, 2010).

Als neue Strategien der Tumorthherapie werden unterschiedliche Ansatzpunkte diskutiert (Golovina und Vonderheide, 2010 ; Whelan *et al.*, 2010). Zum einen ist die noch gründlichere Erforschung und bessere Kenntnis der beschriebenen Zunahme regulatorischer T-Zellen und der Immunmodulation im peripheren Blut von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren von großer Bedeutung für eine erfolgreiche Diagnostik und Therapie. Studien sollten folgen, die den definitiven Mechanismus der Treg-Proliferation, Expansion oder Konversion aus naiven T-Zellen klären, um ihn anschließend unterbinden zu können.

Zum anderen sollte eine Reduktion der Anzahl regulatorischer T-Zellen oder eine Inhibierung der Treg-Funktion (*Abb.4-1*) erwogen werden (Zou, 2006; Miyara und Sakaguchi, 2007). Versuche mit Mäusen haben gezeigt, dass die Reduktion der Anzahl regulatorischer T-Zellen oder die Abschwächung der Treg-Funktion zum Erfolg einer Immuntherapie gegen Malignome führt (Miyara und Sakaguchi, 2007).

Dies kann durch den Einsatz von Antikörpern gegen charakteristische Rezeptoren regulatorischer T-Zellen wie zum Beispiel GITR (Burckhart *et al.*, 2010) und CTLA-4 (Cools *et al.*, 2007), die immunregulatorische Funktionen haben, erreicht werden. Die Literatur zeigt, dass zum Beispiel die systemische oder lokale Verwendung eines agonistischen und somit stimulierenden anti-GITR Antikörpers eine effektive Anti-Tumor-Immunantwort in Mäusen hervorrufen kann (Miyara und Sakaguchi, 2007).

Als eine weitere Möglichkeit, die Suppression der Anti-Tumor-Antwort zu minimieren, liegt in der Intervention mit der Migration regulatorischer T-Zellen (Abb.4-1). Für das Chemokin CCL22, welches unter anderem, laut den Ergebnissen dieser Doktorarbeit, durch HNSCC-Zelllinien produziert wird, wird angenommen, dass es den 'Tumor-escape'-Mechanismus durch Attraktion regulatorischer T-Zellen in die Tumorumgebung unterstützt (Curiel *et al.*, 2004). Der Effekt einer Unterbindung dieser Migration regulatorischer T-Zellen sollte für Kopf-Hals-Tumoren näher untersucht werden. Allerdings ist diese Therapiestrategie der Kopf-Hals-Tumoren in Form von einer Inhibierung der Funktion des Chemokins CCL22 sehr kritisch zu betrachten, da CCL22 einen wichtigen Bestandteil der Homeostase und der Interaktion des Immunsystems darstellt (Cronshaw *et al.*, 2004). Bei einer Inhibierung des Chemokins CCL22 könnte die reguläre Immunabwehr abgeschwächt oder sogar komplett verhindert werden, was das Verwenden von CCL22 als Angriffsziel einer Immuntherapie erschwert. Somit sollte bei diesen beschriebenen, unterschiedlichen Forschungsansätzen berücksichtigt werden, dass eine Depletion regulatorischer T-Zellen und ihrer suppressiven Funktion Autoimmunerkrankungen bedingen kann (Jacob *et al.*, 2009), da die Suppression autoreaktiver Effektor-T-Zellen und der Erhalt der Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen (Yamaguchi und Sakaguchi, 2006; Alhamarneh *et al.*, 2008) eine der Hauptaufgaben der Treg Zellen darstellen. Somit bedeutet die Immuntherapie von Kopf-Hals-Tumoren einen Balanceakt zwischen maximal möglicher Reduktion der Funktion regulatorischer T-Zellen auf der einen Seite und Vermeidung von autoimmunen Reaktionen auf der anderen Seite.

5 Zusammenfassung

Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCC) zeigen eine massiv unterdrückte Anti-Tumor-Immunität durch die Bildung eines immunsuppressiven Mikroenvironments, so dass effektive Immunantworten ausbleiben. Regulatorische T-Zellen (Treg) spielen neben der Regulation von Immuntoleranzmechanismen, der Verhinderung von Autoimmunreaktionen gegen körpereigene Antigene, bei der Immunmodulation im Rahmen von Anti-Tumorantworten eine zentrale Rolle.

In dieser Arbeit sollte umfassend die Rolle regulatorischer T-Zellen in Patienten mit HNSCC analysiert und dargestellt werden. Zu diesem Zweck wurden Tumorpatienten mit einem HNSCC, die sich entweder in einem aktiven, präoperativen Krankheitszustand befanden oder bereits einer onkologischen Therapie zugeführt worden waren, hinsichtlich des Vorkommens und der Anzahl von CD4⁺CD25^{high} Treg Zellen mittels Durchflusszytometer untersucht. Es konnte bestätigt werden, dass HNSCC Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine hoch signifikante Zunahme der Anzahl der CD4⁺CD25^{high} Treg Zellen in PBMCs aufweisen. Allerdings bestand keine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl regulatorischer T-Zellen und dem jeweiligen Tumorstadium (TNM-Stadium). Weitere Untersuchungen sollten Aufschluss über den Phänotyp der Treg Zellen in Tumorpatienten und gesunden Kontrollen geben. Es konnte gezeigt werden, dass der prozentuale Anteil aller Foxp3 exprimierenden Zellen wiederum in Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren signifikant höher ($0,01 \leq p \leq 0,05$) als in gesunden Kontrollen war.

Des Weiteren sollte eine eventuelle langfristige Beeinflussung des Immunsystems durch HNSCC in Hinblick auf Treg Zellen analysiert werden. Beim Vergleich der präoperativen HNSCC-Patienten, die eine aktive HNSCC-Erkrankung aufwiesen und noch keiner onkologischen Therapie unterzogen worden waren und der postoperativen Patienten, die alle keine Anzeichen einer aktiven Tumorerkrankung oder eines Tumorrezidivs aufwiesen, zeigte sich, dass selbst erfolgreich onkologisch behandelte HNSCC-Patienten weiterhin eine erhöhte Treg Anzahl aufweisen.

Es ist bekannt, dass T-Zellen, aber auch Treg Zellen im Tumor akkumulieren. In dieser Arbeit sollte die Bedeutung des Chemokin CCL22, einem potentiellen Attraktant regulatorischer T-Zellen, in HNSCC-Patienten untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden HNSCC hinsichtlich einer eigenständigen CCL22-Produktion mittels Western Blot bzw. Durchflusszytometer untersucht und das CCL22-Level im Serum von HNSCC-Patienten versus gesunden Kontrollen mittels ELISA analysiert. Die Ergebnisse ergaben eine deutliche Produktion des Chemokins CCL22 durch permanente HNSCC-Zelllinien.

Die Tatsache, dass sich HNSCC Anti-Tumor-Immunantworten durch das Immunsystem entziehen und HNSCC-Patienten eine Immundefizienz aufweisen, hat in den letzten Jahren das Konzept entstehen lassen, HNSCC durch die Gabe von immunologisch aktiven Stoffen zu therapieren. In dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass Interferon-gamma (IFN- γ) eine Herunterregulation der CCL22-Produktion in HNSCC-Zelllinien bewirken kann. Allerdings ist CCL22 als Angriffsziel einer Immuntherapie von HNSCC-Tumoren sehr kritisch zu betrachten, da CCL22 einen wichtigen Bestandteil der Homeostase des Immunsystems darstellt und an zahlreichen immunologischen Interaktionen teilnimmt. Durch eine Inhibierung des Chemokins CCL22 könnte die reguläre Immunabwehr abgeschwächt oder sogar komplett verhindert werden, was das Verwenden von CCL22 als Angriffsziel einer Immuntherapie unmöglich macht.

Zusammenfassend deuten die gewonnen Daten dieser Doktorarbeit stark darauf hin, dass CD4⁺CD25^{high} Treg Zellen maßgeblich an der Immunmodulation in malignen Kopf-Hals Karzinome beteiligt sind und dass HNSCC zu einer permanenten Veränderung der Immunzelllevel mit nur minimaler Erholungsrate führen.

6 Literaturverzeichnis

1. **Albers AE, Ferris RL, Kim GG, Chikamatsu K, DeLeo AB, Whiteside TL:** Immune responses to p53 in patients with cancer: enrichment in tetramer+ p53 peptide-specific T cells and regulatory T cells at tumor sites. *Cancer Immunol Immunother* 54:1072-1081 (2005).
2. **Alhamarneh O, Agada F, Madden L, Stafford N, Greenman J:** Serum IL10 and circulating CD4(+)/CD25(high) regulatory T cell numbers as predictors of clinical outcome and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* (2010)
3. **Alhamarneh O, Amarnath SM, Stafford ND, Greenman J:** Regulatory T cells: what role do they play in antitumor immunity in patients with head and neck cancer? *Head Neck* 30:251-261 (2008).
4. **Andrew DP, Chang MS, McNinch J, Wathen ST, Rihanek M, Tseng J, Spellberg JP, Elias CG, 3rd:** STCP-1 (MDC) CC chemokine acts specifically on chronically activated Th2 lymphocytes and is produced by monocytes on stimulation with Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol* 161:5027-5038 (1998).
5. **Ardon H, Verbinnen B, Maes W, Beez T, Van Gool S, De Vleeschouwer S:** Technical advancement in regulatory T cell isolation and characterization using CD127 expression in patients with malignant glioma treated with autologous dendritic cell vaccination. *J Immunol Methods* (2009).
6. **Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL:** Head and neck cancer. *Lancet* 371:1695-1709 (2008).
7. **Assudani DP, Horton RB, Mathieu MG, McArdle SE, Rees RC:** The role of CD4+ T cell help in cancer immunity and the formulation of novel cancer vaccines. *Cancer Immunol Immunother* 56:70-80 (2007).
8. **Badoual C, Hans S, Rodriguez J, Peyrard S, Klein C, Agueznay Nel H, Mosseri V, Laccourreye O, Bruneval P, Fridman WH, Brasnu DF, Tartour E:** Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res* 12:465-472 (2006).
9. **Baecher-Allan C, Anderson DE:** Immune regulation in tumor-bearing hosts. *Curr Opin Immunol* 18:214-219 (2006a).
10. **Baecher-Allan C, Anderson DE:** Regulatory cells and human cancer. *Semin Cancer Biol* 16:98-105 (2006b).
11. **Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA:** CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 167:1245-1253 (2001).
12. **Bagan JV, Scully C:** Recent advances in Oral Oncology 2007: epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis and prognostication. *Oral Oncol* 44:103-108 (2008).
13. **Barnett B, Kryczek I, Cheng P, Zou W, Curiel TJ:** Regulatory T cells in ovarian cancer: biology and therapeutic potential. *Am J Reprod Immunol* 54:369-377 (2005).
14. **Basile J, Thiers B, Maize J, Sr., Lathers DM:** Chemokine receptor expression in non-melanoma skin cancer. *J Cutan Pathol* 35:623-629 (2008).

15. **Bataini JP, Bernier J, Brugere J, Jaulerry C, Picco C, Brunin F:** Natural history of neck disease in patients with squamous cell carcinoma of oropharynx and pharyngolarynx. *Radiother Oncol* 3:245-255 (1985).
16. **Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, Banham AH:** Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol* 24:5373-5380 (2006).
17. **Battaglia M, Roncarolo MG:** Induction of transplantation tolerance via regulatory T cells. *Inflamm Allergy Drug Targets* 5:157-165 (2006).
18. **Ben-Baruch A:** Organ selectivity in metastasis: regulation by chemokines and their receptors. *Clin Exp Metastasis* 25:345-356 (2008).
19. **Bergmann C, Strauss L, Wang Y, Szczepanski MJ, Lang S, Johnson JT, Whiteside TL:** T regulatory type 1 cells in squamous cell carcinoma of the head and neck: mechanisms of suppression and expansion in advanced disease. *Clin Cancer Res* 14:3706-3715 (2008).
20. **Berlinger NT, Tsakraklides V, Pollak K, Adams GL, Yang M, Good RA:** Prognostic significance of lymph node histology in patients with squamous cell carcinoma of the larynx, pharynx, or oral cavity. *Laryngoscope* 86:792-803 (1976).
21. **Bertz JG, K.; Haberland, J.; Hentschel, S.; Kaatsch, P.; Katalinic, A.; Stabenow R.; Stegmaier, C.; Ziegler, H.:** Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends. *Gesellschaft für epidemiologische Krebsregister in Deutschland e.V. GEKID* (2006).
22. **Betelli E, Dastrange M, Oukka M:** Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5138-5143 (2005).
23. **Beyer M, Schultze JL:** Regulatory T cells: major players in the tumor microenvironment. *Curr Pharm Des* 15:1879-1892 (2009).
24. **Bonecchi R, Sozzani S, Stine JT, Luini W, D'Amico G, Allavena P, Chantry D, Mantovani A:** Divergent effects of interleukin-4 and interferon-gamma on macrophage-derived chemokine production: an amplification circuit of polarized T helper 2 responses. *Blood* 92:2668-2671 (1998).
25. **Bradford MM:** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254 (1976).
26. **Brandau P, Glanz H:** [Multicentric cancer spread in the mouth cavity and oropharynx]. *Hno* 37:485-489 (1989).
27. **Burckhart T, Thiel M, Nishikawa H, Wuest T, Muller D, Zippelius A, Ritter G, Old L, Shiku H, Renner C:** Tumor-specific Crosslinking of GITR as Costimulation for Immunotherapy. *J Immunother* 33:925-934 (2010)
28. **Campbell JJ, Murphy KE, Kunkel EJ, Brightling CE, Soler D, Shen Z, Boisvert J, Greenberg HB, Vierra MA, Goodman SB, Genovese MC, Wardlaw AJ, Butcher EC, Wu L:** CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *J Immunol* 166:877-884 (2001).
29. **Campoli M, Chang CC, Ferrone S:** HLA class I antigen loss, tumor immune escape and immune selection. *Vaccine* 20 Suppl 4:A40-45 (2002).
30. **Cao M, Cabrera R, Xu Y, Firpi R, Zhu H, Liu C, Nelson DR:** Hepatocellular carcinoma cell supernatants increase expansion and function of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Lab Invest* 87:582-590 (2007).

31. **Cao X:** Regulatory T cells and immune tolerance to tumors. *Immunol Res* (2009).
32. **Cao X, Leonard K, Collins LI, Cai SF, Mayer JC, Payton JE, Walter MJ, Piwnica-Worms D, Schreiber RD, Ley TJ:** Interleukin 12 stimulates IFN-gamma-mediated inhibition of tumor-induced regulatory T-cell proliferation and enhances tumor clearance. *Cancer Res* 69:8700-8709 (2009).
33. **Caretto D, Katzman SD, Villarino AV, Gallo E, Abbas AK:** Cutting edge: the Th1 response inhibits the generation of peripheral regulatory T cells. *J Immunol* 184:30-34 (2010)
34. **Cartmel B, Bowen D, Ross D, Johnson E, Mayne ST:** A randomized trial of an intervention to increase fruit and vegetable intake in curatively treated patients with early-stage head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:2848-2854 (2005).
35. **Chatila TA:** Role of regulatory T cells in human diseases. *J Allergy Clin Immunol* 116:949-959; quiz 960 (2005).
36. **Chaubal S, Wollenberg B, Kastenbauer E, Zeidler R:** Ep-CAM--a marker for the detection of disseminated tumor cells in patients suffering from SCCHN. *Anticancer Res* 19:2237-2242 (1999).
37. **Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM:** Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198:1875-1886 (2003).
38. **Chin D, Boyle GM, Porceddu S, Theile DR, Parsons PG, Coman WB:** Head and neck cancer: past, present and future. *Expert Rev Anticancer Ther* 6:1111-1118 (2006).
39. **Chin D, Boyle GM, Theile DR, Parsons PG, Coman WB:** Molecular introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis. *Br J Plast Surg* 57:595-602 (2004).
40. **Chou J, Lin YC, Kim J, You L, Xu Z, He B, Jablons DM:** Nasopharyngeal carcinoma--review of the molecular mechanisms of tumorigenesis. *Head Neck* 30:946-963 (2008).
41. **Chung CH, Gillison ML:** Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. *Clin Cancer Res* 15:6758-6762 (2009).
42. **Cojocariu OM, Huguet F, Lefevre M, Perie S:** [Prognosis and predictive factors in head-and-neck cancers]. *Bull Cancer* 96:369-378 (2009).
43. **Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN:** Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol* 2007:89195 (2007).
44. **Copper MP, Jovanovic A, Nauta JJ, Braakhuis BJ, de Vries N, van der Waal I, Snow GB:** Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 121:157-160 (1995).
45. **Cronshaw DG, Owen C, Brown Z, Ward SG:** Activation of phosphoinositide 3-kinases by the CCR4 ligand macrophage-derived chemokine is a dispensable signal for T lymphocyte chemotaxis. *J Immunol* 172:7761-7770 (2004).
46. **Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W:** Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian

- carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10:942-949 (2004).
47. **Curtin JF, Candolfi M, Fakhouri TM, Liu C, Alden A, Edwards M, Lowenstein PR, Castro MG:** Treg depletion inhibits efficacy of cancer immunotherapy: implications for clinical trials. *PLoS ONE* 3:e1983 (2008).
 48. **D'Ambrosio D, Iellem A, Bonecchi R, Mazzeo D, Sozzani S, Mantovani A, Sinigaglia F:** Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. *J Immunol* 161:5111-5115 (1998).
 49. **Dejaco C, Duftner C, Grubeck-Loebenstien B, Schirmer M:** Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Immunology* 117:289-300 (2006).
 50. **Ding Y, Shimada Y, Maeda M, Kawabe A, Kaganoi J, Komoto I, Hashimoto Y, Miyake M, Hashida H, Imamura M:** Association of CC chemokine receptor 7 with lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 9:3406-3412 (2003).
 51. **Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD:** The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21:137-148 (2004).
 52. **Echigo T, Hasegawa M, Shimada Y, Inaoki M, Takehara K, Sato S:** Both Th1 and Th2 chemokines are elevated in sera of patients with autoimmune blistering diseases. *Arch Dermatol Res* 298:38-45 (2006).
 53. **Elkord E, Alcantar-Orozco EM, Dovedi SJ, Tran DQ, Hawkins RE, Gilham DE:** T regulatory cells in cancer: recent advances and therapeutic potential. *Expert Opin Biol Ther* 10:1573-1586 (2010)
 54. **Elpek KG, Lacelle C, Singh NP, Yolcu ES, Shirwan H:** CD4+CD25+ T regulatory cells dominate multiple immune evasion mechanisms in early but not late phases of tumor development in a B cell lymphoma model. *J Immunol* 178:6840-6848 (2007).
 55. **Ermann J, Hoffmann P, Edinger M, Dutt S, Blankenberg FG, Higgins JP, Negrin RS, Fathman CG, Strober S:** Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood* 105:2220-2226 (2005).
 56. **Ferlito A, Rinaldo A, Devaney KO:** Malignant laryngeal tumors: phenotypic evaluation and clinical implications. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 104:587-589 (1995).
 57. **Fernandez-Martin A, Gonzalez-Rey E, Chorny A, Ganea D, Delgado M:** Vasoactive intestinal peptide induces regulatory T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 36:318-326 (2006).
 58. **Ferrone S, Whiteside TL:** Tumor microenvironment and immune escape. *Surg Oncol Clin N Am* 16:755-774, viii (2007).
 59. **Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY:** Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-336 (2003).
 60. **Foulkes WD, Brunet JS, Sieh W, Black MJ, Shenouda G, Narod SA:** Familial risks of squamous cell carcinoma of the head and neck: retrospective case-control study. *Bmj* 313:716-721 (1996).
 61. **Fujii-Maeda S, Kajiwara K, Ikizawa K, Shinazawa M, Yu B, Koga T, Furue M, Yanagihara Y:** Reciprocal regulation of thymus and activation-regulated chemokine/macrophage-derived chemokine production by interleukin (IL)-4/IL-13 and interferon-gamma in HaCaT keratinocytes is

- mediated by alternations in E-cadherin distribution. *J Invest Dermatol* 122:20-28 (2004).
62. **Galli G, Chantry D, Annunziato F, Romagnani P, Cosmi L, Lazzeri E, Manetti R, Maggi E, Gray PW, Romagnani S:** Macrophage-derived chemokine production by activated human T cells in vitro and in vivo: preferential association with the production of type 2 cytokines. *Eur J Immunol* 30:204-210 (2000).
63. **Gershon RK, Kondo K:** Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18:723-737 (1970).
64. **Gershon RK, Kondo K:** Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21:903-914 (1971).
65. **Gillespie MB, Rubinchik S, Hoel B, Sutkowski N:** Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer: What You Need to Know in 2009. *Curr Treat Options Oncol* (2009).
66. **Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, Biota C, Doffin AC, Durand I, Olive D, Perez S, Pasqual N, Faure C, Ray-Coquard I, Puisieux A, Caux C, Blay JY, Menetrier-Caux C:** Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res* 69:2000-2009 (2009).
67. **Golovina TN, Vonderheide RH:** Regulatory T cells: overcoming suppression of T-cell immunity. *Cancer J* 16:342-347 (2010)
68. **Grandis JR, Falkner DM, Melhem MF, Gooding WE, Drenning SD, Morel PA:** Human leukocyte antigen class I allelic and haplotype loss in squamous cell carcinoma of the head and neck: clinical and immunogenetic consequences. *Clin Cancer Res* 6:2794-2802 (2000).
69. **Grandis JR, Twardy DJ:** Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 53:3579-3584 (1993).
70. **Grau JJ, Cuchi A, Traserra J, Firvida JL, Arias C, Blanch JL, Estape J:** Follow-up study in head and neck cancer: cure rate according to tumor location and stage. *Oncology* 54:38-42 (1997).
71. **Greenberg JS, El Naggar AK, Mo V, Roberts D, Myers JN:** Disparity in pathologic and clinical lymph node staging in oral tongue carcinoma. Implication for therapeutic decision making. *Cancer* 98:508-515 (2003).
72. **Gregg R, Smith CM, Clark FJ, Dunnion D, Khan N, Chakraverty R, Nayak L, Moss PA:** The number of human peripheral blood CD4+ CD25high regulatory T cells increases with age. *Clin Exp Immunol* 140:540-546 (2005).
73. **Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG:** A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742 (1997).
74. **Gunther K, Leier J, Henning G, Dimmler A, Weissbach R, Hohenberger W, Forster R:** Prediction of lymph node metastasis in colorectal carcinoma by expression of chemokine receptor CCR7. *Int J Cancer* 116:726-733 (2005).
75. **Hartigan-O'Connor DJ, Poon C, Sinclair E, McCune JM:** Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *J Immunol Methods* 319:41-52 (2007).

76. **Haugland RP:** Detecting enzymatic activity in cells using fluorogenic substrates. *Biotech Histochem* 70:243-251 (1995).
77. **Henle W, Henle G, Ho HC, Burtin P, Cachin Y, Clifford P, de Schryver A, de-The G, Diehl V, Klein G:** Antibodies to Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma, other head and neck neoplasms, and control groups. *J Natl Cancer Inst* 44:225-231 (1970).
78. **Hevessy Z, Nagy B, Jr., Kiss F, Kiss A, Kappelmayer J:** Mean fluorescence intensity rate is a useful marker in the detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones. *Clin Chem Lab Med* 43:919-923 (2005).
79. **Hoffmann P, Eder R, Boeld TJ, Doser K, Piseshka B, Andreesen R, Edinger M:** Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion. *Blood* 108:4260-4267 (2006).
80. **Hoffmann P, Eder R, Kunz-Schughart LA, Andreesen R, Edinger M:** Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)-CD25high regulatory T cells. *Blood* 104:895-903 (2004).
81. **Hoffmann TK, Dworacki G, Tsukihira T, Meidenbauer N, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL:** Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. *Clin Cancer Res* 8:2553-2562 (2002).
82. **Hori S:** Rethinking the molecular definition of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 38:928-930 (2008).
83. **Hori S, Nomura T, Sakaguchi S:** Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061 (2003).
84. **Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD:** The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* 13:95-109 (2002).
85. **Ishida T, Ueda R:** CCR4 as a novel molecular target for immunotherapy of cancer. *Cancer Sci* (2006).
86. **Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S:** Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 162:5317-5326 (1999).
87. **Jacob JB, Kong YC, Nalbantoglu I, Snower DP, Wei WZ:** Tumor regression following DNA vaccination and regulatory T cell depletion in neu transgenic mice leads to an increased risk for autoimmunity. *J Immunol* 182:5873-5881 (2009).
88. **Jacobs JF, Idema AJ, Bol KF, Grotenhuis JA, de Vries IJ, Wesseling P, Adema GJ:** Prognostic significance and mechanism of Treg infiltration in human brain tumors. *J Neuroimmunol* 225:195-199
89. **Jakubzick C, Wen H, Matsukawa A, Keller M, Kunkel SL, Hogaboam CM:** Role of CCR4 ligands, CCL17 and CCL22, during *Schistosoma mansoni* egg-induced pulmonary granuloma formation in mice. *Am J Pathol* 165:1211-1221 (2004).
90. **Jones AS, Morar P, Phillips DE, Field JK, Husband D, Helliwell TR:** Second primary tumors in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 75:1343-1353 (1995).
91. **Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuetttenberg A, Knop J, Enk AH:** Identification and functional characterization of human CD4(+)-CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 193:1285-1294 (2001).

92. **Kalyankrishna S, Grandis JR:** Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol* 24:2666-2672 (2006).
93. **Kamel AH, el B, Hashish MH, el-Sheikh SM:** Epstein-Barr virus in head and neck squamous cell carcinoma. *East Mediterr Health J* 9:364-371 (2003).
94. **Klein S, Kretz CC, Krammer PH, Kuhn A:** CD127(low/-) and FoxP3(+) Expression Levels Characterize Different Regulatory T-Cell Populations in Human Peripheral Blood. *J Invest Dermatol* (2009).
95. **Kodama J, Hasengaowa, Kusumoto T, Seki N, Matsuo T, Ojima Y, Nakamura K, Hongo A, Hiramatsu Y:** Association of CXCR4 and CCR7 chemokine receptor expression and lymph node metastasis in human cervical cancer. *Ann Oncol* 18:70-76 (2007).
96. **Kono K, Kawaida H, Takahashi A, Sugai H, Mimura K, Miyagawa N, Omata H, Fujii H:** CD4(+)CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. *Cancer Immunol Immunother* 55:1064-1071 (2006).
97. **Kosmaczewska A, Ciszak L, Potoczek S, Frydecka I:** The significance of Treg cells in defective tumor immunity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 56:181-191 (2008).
98. **Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S:** Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:467-475 (2005).
99. **Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H:** Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 6:1219-1227 (2005).
100. ###Kreuz DR###
101. **Ku TK, Crowe DL:** Impaired T lymphocyte function increases tumorigenicity and decreases tumor latency in a mouse model of head and neck cancer. *Int J Oncol* 35:1211-1221 (2009).
102. **Kumar B, Cordell KG, Lee JS, Prince ME, Tran HH, Wolf GT, Urba SG, Worden FP, Chepeha DB, Teknos TN, Eisbruch A, Tsien CI, Taylor JM, D'Silva NJ, Yang K, Kurnit DM, Bradford CR, Carey TE:** Response to therapy and outcomes in oropharyngeal cancer are associated with biomarkers including human papillomavirus, epidermal growth factor receptor, gender, and smoking. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 69:S109-111 (2007).
103. **Kuss I, Hathaway B, Ferris RL, Gooding W, Whiteside TL:** Decreased absolute counts of T lymphocyte subsets and their relation to disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 10:3755-3762 (2004).
104. **Laemmli UK:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685 (1970).
105. **Lang S, Wollenberg B, Dellian M, Steuer-Vogt MK, Schwenzer K, Sautier W, Chucholowski M, Eckel R, Faas I, Wilmes E, Ehrenfeld M, Arnold W, Kastenbauer E, Holzel D:** [Clinical and epidemiological data of patients with malignomas of the head and neck]. *Laryngorhinootologie* 81:499-508 (2002).
106. **Lau KM, Cheng SH, Lo KW, Lee SA, Woo JK, van Hasselt CA, Lee SP, Rickinson AB, Ng MH:** Increase in circulating Foxp3+CD4+CD25(high) regulatory T cells in nasopharyngeal carcinoma patients. *Br J Cancer* 96:617-622 (2007).

107. **Lavabre-Bertrand T, George F, Brunet C, Sampol J:** Quantitative immune phenotyping: a new dimension for the monitoring of haemopoietic malignancies. *Nouv Rev Fr Hematol* 36:373-382 (1994a).
108. **Lavabre-Bertrand T, Janossy G, Exbrayat C, Bourquard P, Duperray C, Navarro M:** Leukemia-associated changes identified by quantitative flow cytometry. II. CD5 over-expression and monitoring in B-CLL. *Leukemia* 8:1557-1563 (1994b).
109. **Lee JH, Cho YS, Lee JY, Kook MC, Park JW, Nam BH, Bae JM:** The chemokine receptor CCR4 is expressed and associated with a poor prognosis in patients with gastric cancer. *Ann Surg* 249:933-941 (2009).
110. **Leon X, del Prado Venegas M, Orus C, Lopez M, Garcia J, Quer M:** Influence of the persistence of tobacco and alcohol use in the appearance of second neoplasm in patients with a head and neck cancer. A case-control study. *Cancer Causes Control* 20:645-652 (2009).
111. **Lewin F, Norell SE, Johansson H, Gustavsson P, Wennerberg J, Biorklund A, Rutqvist LE:** Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case-referent study in Sweden. *Cancer* 82:1367-1375 (1998).
112. **Li B, Samanta A, Song X, Furuuchi K, Iacono KT, Kennedy S, Katsumata M, Saouaf SJ, Greene MI:** FOXP3 ensembles in T-cell regulation. *Immunol Rev* 212:99-113 (2006).
113. **Li X, Di B, Shang Y, Zhou Y, Cheng J, He Z:** Clinicopathologic risk factors for distant metastases from head and neck squamous cell carcinomas. *Eur J Surg Oncol* 35:1348-1353 (2009).
114. **Licitra L, Perrone F, Bossi P, Suardi S, Mariani L, Artusi R, Oggionni M, Rossini C, Cantu G, Squadrelli M, Quattrone P, Locati LD, Bergamini C, Olmi P, Pierotti MA, Pilotti S:** High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 24:5630-5636 (2006).
115. **Liu S, Yang H, Liang C:** Combined IL-2 and IL-12 gene therapy for murine head and neck squamous cell carcinoma. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 24:323-326 (2002).
116. **Liu VC, Wong LY, Jang T, Shah AH, Park I, Yang X, Zhang Q, Lonning S, Teicher BA, Lee C:** Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J Immunol* 178:2883-2892 (2007).
117. **Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA:** CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 203:1701-1711 (2006).
118. **Logullo AF, Nonogaki S, Miguel RE, Kowalski LP, Nishimoto IN, Pasini FS, Federico MH, Brentani RR, Brentani MM:** Transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) expression in head and neck squamous cell carcinoma patients as related to prognosis. *J Oral Pathol Med* 32:139-145 (2003).
119. **Lohr J, Knoechel B, Abbas AK:** Regulatory T cells in the periphery. *Immunol Rev* 212:149-162 (2006).
120. **Luce D, Guenel P, Leclerc A, Brugere J, Point D, Rodriguez J:** Alcohol and tobacco consumption in cancer of the mouth, pharynx, and larynx: a study of 316 female patients. *Laryngoscope* 98:313-316 (1988).

121. **Maekawa S, Iwasaki A, Shirakusa T, Kawakami T, Yanagisawa J, Tanaka T, Shibaguchi H, Kinugasa T, Kuroki M:** Association between the expression of chemokine receptors CCR7 and CXCR3, and lymph node metastatic potential in lung adenocarcinoma. *Oncol Rep* 19:1461-1468 (2008).
122. **Maggi E, Cosmi L, Liotta F, Romagnani P, Romagnani S, Annunziato F:** Thymic regulatory T cells. *Autoimmun Rev* 4:579-586 (2005).
123. **Mahnke K, Bedke T, Enk AH:** Regulatory conversation between antigen presenting cells and regulatory T cells enhance immune suppression. *Cell Immunol* 250:1-13 (2007).
124. **Malmberg KJ, Ljunggren HG:** Escape from immune- and nonimmune-mediated tumor surveillance. *Semin Cancer Biol* 16:16-31 (2006).
125. **Maruyama T, Kono K, Izawa S, Mizukami Y, Kawaguchi Y, Mimura K, Watanabe M, Fujii H:** CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to infiltration of regulatory T cells in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 23:422-429 (2010)
126. **Mashino K, Sadanaga N, Yamaguchi H, Tanaka F, Ohta M, Shibuta K, Inoue H, Mori M:** Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer Res* 62:2937-2941 (2002).
127. **Meissner M, Reichert TE, Kunkel M, Gooding W, Whiteside TL, Ferrone S, Seliger B:** Defects in the human leukocyte antigen class I antigen processing machinery in head and neck squamous cell carcinoma: association with clinical outcome. *Clin Cancer Res* 11:2552-2560 (2005).
128. **Miller AM, Lundberg K, Ozenci V, Banham AH, Hellstrom M, Egevad L, Pisa P:** CD4+CD25high T cells are enriched in the tumor and peripheral blood of prostate cancer patients. *J Immunol* 177:7398-7405 (2006).
129. **Mills KH:** Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* 4:841-855 (2004).
130. **Mittal S, Marshall NA, Duncan L, Culligan DJ, Barker RN, Vickers MA:** Local and systemic induction of CD4+CD25+ regulatory T-cell population by non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 111:5359-5370 (2008).
131. **Miyara M, Sakaguchi S:** Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med* 13:108-116 (2007).
132. **Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y, Akaike H, Kamimura K, Sugai H, Fujii H:** CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3(+) regulatory T cells in gastric cancer. *Int J Cancer* (2008).
133. **Moore C:** Cigarette smoking and cancer of the mouth, pharynx, and larynx. A continuing study. *Jama* 218:553-558 (1971).
134. **Mougiakakos D, Choudhury A, Lladser A, Kiessling R, Johansson CC:** Regulatory T cells in cancer. *Adv Cancer Res* 107:57-117 (2010)
135. **Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A:** Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410:50-56 (2001).
136. **Nakanishi T, Imaizumi K, Hasegawa Y, Kawabe T, Hashimoto N, Okamoto M, Shimokata K:** Expression of macrophage-derived chemokine (MDC)/CCL22 in human lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 55:1320-1329 (2006).

137. **Nakata B, Fukunaga S, Noda E, Amano R, Yamada N, Hirakawa K:** Chemokine receptor CCR7 expression correlates with lymph node metastasis in pancreatic cancer. *Oncology* 74:69-75 (2008).
138. **Needham DJ, Lee JX, Beilharz MW:** Intra-tumoural regulatory T cells: A potential new target in cancer immunotherapy. *Biochem Biophys Res Commun* (2006).
139. **Neufcoeur PE, Arafa M, Delvenne P, Saussez S:** [Involvement of human papillomavirus in upper aero-digestive tracts cancers]. *Bull Cancer* 96:941-950 (2009).
140. **Niens M, Visser L, Nolte IM, van der Steege G, Diepstra A, Cordano P, Jarrett RF, Te Meerman GJ, Poppema S, van den Berg A:** Serum chemokine levels in Hodgkin lymphoma patients: highly increased levels of CCL17 and CCL22. *Br J Haematol* 140:527-536 (2008).
141. **Nishikawa H, Kato T, Tanida K, Hiasa A, Tawara I, Ikeda H, Ikarashi Y, Wakasugi H, Kronenberg M, Nakayama T, Taniguchi M, Kuribayashi K, Old LJ, Shiku H:** CD4+ CD25+ T cells responding to serologically defined autoantigens suppress antitumor immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10902-10906 (2003).
142. **Nocentini G, Riccardi C:** GITR: a multifaceted regulator of immunity belonging to the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Eur J Immunol* 35:1016-1022 (2005).
143. **Nocentini G, Ronchetti S, Cuzzocrea S, Riccardi C:** GITR/GITRL: more than an effector T cell co-stimulatory system. *Eur J Immunol* 37:1165-1169 (2007).
144. **Ormerod MG, Orr RM, Peacock JH:** The role of apoptosis in cell killing by cisplatin: a flow cytometric study. *Br J Cancer* 69:93-100 (1994).
145. **Pakravan N, Hassan AT, Hassan ZM:** Naturally Occurring Self-Reactive CD4(+)CD25(+) Regulatory T Cells: Universal Immune Code. *Cell Mol Immunol* 4:197-201 (2007).
146. **Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA:** Cancer statistics, 1996. *CA Cancer J Clin* 46:5-27 (1996).
147. **Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P:** Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55:74-108 (2005).
148. **Parkin DM, Pisani P, Ferlay J:** Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 80:827-841 (1999).
149. **Petersen RP, Campa MJ, Sperlazza J, Conlon D, Joshi MB, Harpole DH, Jr., Patz EF, Jr.:** Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer* 107:2866-2872 (2006).
150. **Piccirillo CA, Thornton AM:** Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *Trends Immunol* 25:374-380 (2004).
151. **Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J:** Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 83:18-29 (1999).
152. **Pries R, Nitsch S, Wollenberg B:** Role of cytokines in head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 6:1195-1203 (2006a).
153. **Pries R, Thiel A, Brocks C, Wollenberg B:** Secretion of tumor-promoting and immune suppressive cytokines by cell lines of head and neck squamous cell carcinoma. *In Vivo* 20:45-48 (2006b).

154. **Pries R, Wollenberg B:** Cytokines in head and neck cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 17:141-146 (2006).
155. **Psyrrri A, DiMaio D:** Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 5:24-31 (2008).
156. **Psyrrri A, Gouveris P, Vermorken JB:** Human papillomavirus-related head and neck tumors: clinical and research implication. *Curr Opin Oncol* 21:201-205 (2009).
157. **Purwar R, Werfel T, Wittmann M:** IL-13-stimulated human keratinocytes preferentially attract CD4+CCR4+ T cells: possible role in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 126:1043-1051 (2006).
158. **Ralainirina N, Poli A, Michel T, Poos L, Andres E, Hentges F, Zimmer J:** Control of natural killer (NK) cell functions by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol* (2006).
159. **Rapidis AD, Wolf GT:** Immunotherapy of head and neck cancer: current and future considerations. *J Oncol* 2009:346345 (2009).
160. **Remmert S, Rottmann M, Reichenbach M, Sommer K, Friedrich HJ:** [Lymph node metastasis in head-neck tumors]. *Laryngorhinootologie* 80:27-35 (2001).
161. **Richtsmeier WJ, Koch WM, McGuire WP, Poole ME, Chang EH:** Phase I-II study of advanced head and neck squamous cell carcinoma patients treated with recombinant human interferon gamma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 116:1271-1277 (1990).
162. **Ronchetti S, Zollo O, Bruscoli S, Agostini M, Bianchini R, Nocentini G, Ayroldi E, Riccardi C:** GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations. *Eur J Immunol* 34:613-622 (2004).
163. **Rosenthal E, McCrory A, Talbert M, Young G, Murphy-Ullrich J, Gladson C:** Elevated expression of TGF-beta1 in head and neck cancer-associated fibroblasts. *Mol Carcinog* 40:116-121 (2004).
164. **Rubin Grandis J, Melhem MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM, Drenning SD, Twardy DJ:** Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 90:824-832 (1998).
165. **Ruter J, Barnett BG, Kryczek I, Brumlik MJ, Daniel BJ, Coukos G, Zou W, Curiel TJ:** Altering regulatory T cell function in cancer immunotherapy: a novel means to boost the efficacy of cancer vaccines. *Front Biosci* 14:1761-1770 (2009).
166. **Saba NF, Hammond A, Shin DM, Khuri FR:** Moving toward bioadjuvant approaches to head and neck cancer prevention. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 69:S132-135 (2007).
167. **Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M:** Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-1164 (1995).
168. **Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A:** Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-712 (1999).
169. **Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA:** B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12:431-440 (2000).

170. **Sankaranarayanan R, Masuyer E, Swaminathan R, Ferlay J, Whelan S:** Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis. *Anticancer Res* 18:4779-4786 (1998).
171. **Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth AA, Frosina D, Gnjjatic S, Ambrosone C, Kepner J, Odunsi T, Ritter G, Lele S, Chen YT, Ohtani H, Old LJ, Odunsi K:** Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18538-18543 (2005).
172. **Scalapino KJ, Daikh DI:** CTLA-4: a key regulatory point in the control of autoimmune disease. *Immunol Rev* 223:143-155 (2008).
173. **Schaefer C:** Regulatory T cells attracted by chemokines are enriched in Head and Neck Cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* (2005).
174. **Schaefer C, Kim GG, Albers A, Hoermann K, Myers EN, Whiteside TL:** Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *Br J Cancer* 92:913-920 (2005).
175. **Schietinger A, Philip M, Schreiber H:** Specificity in cancer immunotherapy. *Semin Immunol* (2008).
176. **Schmid I, Krall WJ, Uittenbogaart CH, Braun J, Giorgi JV:** Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry* 13:204-208 (1992).
177. **Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA:** Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75:163-189 (2004).
178. **Scully C, Bagan JV:** Recent advances in Oral Oncology 2007: imaging, treatment and treatment outcomes. *Oral Oncol* 44:211-215 (2008).
179. **Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B:** Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 203:1693-1700 (2006).
180. **Seddon B, Mason D:** The third function of the thymus. *Immunol Today* 21:95-99 (2000).
181. **Seitz HK, Simanowski UA:** Alcohol and carcinogenesis. *Annu Rev Nutr* 8:99-119 (1988).
182. **Shen LS, Wang J, Shen DF, Yuan XL, Dong P, Li MX, Xue J, Zhang FM, Ge HL, Xu D:** CD4(+)CD25(+)CD127(low/-) regulatory T cells express Foxp3 and suppress effector T cell proliferation and contribute to gastric cancers progression. *Clin Immunol* 131:109-118 (2009).
183. **Shevach EM:** CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2:389-400 (2002).
184. **Shevach EM:** Fatal attraction: tumors beckon regulatory T cells. *Nat Med* 10:900-901 (2004).
185. **Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S:** Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 163:5211-5218 (1999).
186. **Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S:** Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3:135-142 (2002).

187. **SKono K, Kawaida H, Takahashi A, Sugai H, Mimura K, Miyagawa N, Omata H, Fujii H:** CD4(+)CD25(high) regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. *Cancer Immunol Immunother* 1-8 (2005).
188. **Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W:** Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 6:963-968 (1953).
189. **Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ:** Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology* 124:13-22 (2008).
190. **St John MA, Abemayor E, Wong DT:** Recent new approaches to the treatment of head and neck cancer. *Anticancer Drugs* 17:365-375 (2006).
191. **Strauss L, Bergmann C, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL:** The frequency and suppressor function of CD4+CD25highFoxp3+ T cells in the circulation of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 13:6301-6311 (2007a).
192. **Strauss L, Bergmann C, Szczepanski M, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL:** A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res* 13:4345-4354 (2007b).
193. **Strauss L, Whiteside TL, Knights A, Bergmann C, Knuth A, Zippelius A:** Selective survival of naturally occurring human CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells cultured with rapamycin. *J Immunol* 178:320-329 (2007c).
194. **Street D, Kaufmann AM, Vaughan A, Fisher SG, Hunter M, Schreckenberger C, Potkul RK, Gissmann L, Qiao L:** Interferon-gamma enhances susceptibility of cervical cancer cells to lysis by tumor-specific cytotoxic T cells. *Gynecol Oncol* 65:265-272 (1997).
195. **Street SE, Trapani JA, MacGregor D, Smyth MJ:** Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *J Exp Med* 196:129-134 (2002).
196. **Sutmuller RP, van Duivenvoorde LM, van Elsas A, Schumacher TN, Wildenberg ME, Allison JP, Toes RE, Offringa R, Melief CJ:** Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 194:823-832 (2001).
197. **Szczepanski MJ, Szajnik M, Czystowska M, Mandapathil M, Strauss L, Welsh A, Foon KA, Whiteside TL, Boyiadzis M:** Increased frequency and suppression by regulatory T cells in patients with acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* 15:3325-3332 (2009).
198. **Tan EH, Adelstein DJ, Droughton ML, Van Kirk MA, Lavertu P:** Squamous cell head and neck cancer in nonsmokers. *Am J Clin Oncol* 20:146-150 (1997).
199. **Tang HL, Cyster JG:** Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science* 284:819-822 (1999).
200. **Tang Q, Henriksen KJ, Boden EK, Tooley AJ, Ye J, Subudhi SK, Zheng XX, Strom TB, Bluestone JA:** Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 171:3348-3352 (2003).

201. **Towbin H, Staehelin T, Gordon J:** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354 (1979).
202. **Tryggvason G, Sveinsson TE, Hjartarson H, Halfdanarson TR:** [Head and neck squamous cell cancer]. *Laeknabladid* 95:671-680 (2009).
203. **Trzonkowski P, Szarynska M, Mysliwska J, Mysliwski A:** Ex vivo expansion of CD4(+)CD25(+) T regulatory cells for immunosuppressive therapy. *Cytometry A* 75:175-188 (2009).
204. **Ueda M, Shimada T, Goto Y, Tei K, Nakai S, Hisa Y, Kannagi R:** Expression of CC-chemokine receptor 7 (CCR7) and CXC-chemokine receptor 4 (CXCR4) in head and neck squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx* (2009).
205. **Valzasina B, Piconese S, Guiducci C, Colombo MP:** Tumor-induced expansion of regulatory T cells by conversion of CD4+CD25- lymphocytes is thymus and proliferation independent. *Cancer Res* 66:4488-4495 (2006).
206. **Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK:** Head and neck cancer. *N Engl J Med* 328:184-194 (1993).
207. **von Boehmer H:** Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 6:338-344 (2005).
208. **Vu HL, Sikora AG, Fu S, Kao J:** HPV-induced oropharyngeal cancer, immune response and response to therapy. *Cancer Lett* (2009).
209. **Wagsäter D:** Quantification of the chemokines CCL17 and CCL22 in human colorectal adenocarcinomas. *Molecular Medicine Reports* 1:211-217 (2007).
210. **Wang HY, Wang RF:** Regulatory T cells and cancer. *Curr Opin Immunol* 19:217-223 (2007).
211. **Wang J, Seethala RR, Zhang Q, Gooding W, van Waes C, Hasegawa H, Ferris RL:** Autocrine and paracrine chemokine receptor 7 activation in head and neck cancer: implications for therapy. *J Natl Cancer Inst* 100:502-512 (2008).
212. **Wang J, Xi L, Gooding W, Godfrey TE, Ferris RL:** Chemokine receptors 6 and 7 identify a metastatic expression pattern in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Adv Otorhinolaryngol* 62:121-133 (2005).
213. **Wang LX, Agulnik M:** Promising newer molecular-targeted therapies in head and neck cancer. *Drugs* 68:1609-1619 (2008).
214. **Wei S, Kryczek I, Zou W:** Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. *Blood* 108:426-431 (2006).
215. **Whelan MC, Casey G, MacConmara M, Lederer JA, Soden D, Collins JK, Tangney M, O'Sullivan GC:** Effective immunotherapy of weakly immunogenic solid tumours using a combined immunogene therapy and regulatory T-cell inactivation. *Cancer Gene Ther* 17:501-511 (2010)
216. **Whiteside TL:** 22. Immune responses to malignancies. *J Allergy Clin Immunol* 111:S677-686 (2003).
217. **Whiteside TL:** Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol* 16:3-15 (2006).
218. **Whiteside TL:** Immunobiology of head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* 24:95-105 (2005).
219. **Wing K, Suri-Payer E, Rudin A:** CD4+CD25+-regulatory T cells from mouse to man. *Scand J Immunol* 62:1-15 (2005).

220. **Wiseman SM, Swede H, Stoler DL, Anderson GR, Rigual NR, Hicks WL, Jr., Douglas WG, Tan D, Loree TR:** Squamous cell carcinoma of the head and neck in nonsmokers and nondrinkers: an analysis of clinicopathologic characteristics and treatment outcomes. *Ann Surg Oncol* 10:551-557 (2003).
221. **Wollenberg B, Walz A, Kolbow K, Pauli C, Chaubal S, Andratschke M:** Clinical relevance of circulating tumour cells in the bone marrow of patients with SCCHN. *Onkologie* 27:358-362 (2004).
222. **Wrangle JM, Khuri FR:** Chemoprevention of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Curr Opin Oncol* 19:180-187 (2007).
223. **Wright ME, Virtamo J, Hartman AM, Pietinen P, Edwards BK, Taylor PR, Huttunen JK, Albanes D:** Effects of alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation on upper aerodigestive tract cancers in a large, randomized controlled trial. *Cancer* 109:891-898 (2007).
224. **Wu AA, Niparko KJ, Pai SI:** Immunotherapy for head and neck cancer. *J Biomed Sci* 15:275-289 (2008).
225. **Wu M, Fang H, Hwang ST:** Cutting edge: CCR4 mediates antigen-primed T cell binding to activated dendritic cells. *J Immunol* 167:4791-4795 (2001).
226. **Yamaguchi T, Sakaguchi S:** Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer. *Semin Cancer Biol* 16:115-123 (2006).
227. **Yamashita U, Kuroda E:** Regulation of macrophage-derived chemokine (MDC, CCL22) production. *Crit Rev Immunol* 22:105-114 (2002).
228. **Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, Steinman RM:** Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med* 198:235-247 (2003).
229. **Yan C, Zhu ZG, Yu YY, Ji J, Zhang Y, Ji YB, Yan M, Chen J, Liu BY, Yin HR, Lin YZ:** Expression of vascular endothelial growth factor C and chemokine receptor CCR7 in gastric carcinoma and their values in predicting lymph node metastasis. *World J Gastroenterol* 10:783-790 (2004).
230. **Yang ZZ, Novak AJ, Stenson MJ, Witzig TE, Ansell SM:** Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 107:3639-3646 (2006).
231. **Yoshizaki T, Wakisaka N, Kondo S, Murono S, Shimizu Y, Nakashima M, Tsuji A, Furukawa M:** Treatment of locally recurrent Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma using the anti-viral agent cidofovir. *J Med Virol* 80:879-882 (2008).
232. **Young MR:** Protective mechanisms of head and neck squamous cell carcinomas from immune assault. *Head Neck* 28:462-470 (2006).
233. **Young MR:** Trials and tribulations of immunotherapy as a treatment option for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Immunol Immunother* 53:375-382 (2004).
234. **Yuan Q, Bromley SK, Means TK, Jones KJ, Hayashi F, Bhan AK, Luster AD:** CCR4-dependent regulatory T cell function in inflammatory bowel disease. *J Exp Med* 204:1327-1334 (2007).
235. **Zbaren P, Lehmann W:** Frequency and sites of distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma. An analysis of 101 cases at autopsy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 113:762-764 (1987).
236. **Zenclussen AC:** Regulatory T cells in pregnancy. *Springer Semin Immunopathol* 28:31-39 (2006).

237. **Zhou G, Levitsky HI:** Natural regulatory T cells and de novo-induced regulatory T cells contribute independently to tumor-specific tolerance. *J Immunol* 178:2155-2162 (2007).
238. **Ziegler SF:** FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. *Eur J Immunol* 37:21-23 (2007).
239. **Zou W:** Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 6:295-307 (2006).
240. **Zwar TD, IR VAND, Gleeson PA:** Guarding the immune system: Suppression of autoimmunity by CD4CD25 immunoregulatory T cells. *Immunol Cell Biol* (2006).

7 Anhang

7.1. Material und Methoden

7.1.1. Material

7.1.1.1. Verwendete Laborgeräte

<u>Gerät</u>	<u>Vertrieb</u>
Allegra™ X 12R Zentrifuge	<i>Beckman Coulter Inc , Krefeld</i>
Allegra™ 25R Zentrifuge	<i>Beckman Coulter Inc , Krefeld</i>
Bio Photometer	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Blockthermostat BT 1301	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
CO ₂ Inkubator CB	<i>Binder GmbH, Tuttlingen</i>
Dampfsterilisator	<i>Systec GmbH, Wettenberg</i>
Durchflusszytometer BD FACSCanto™ Flow Cytometer	<i>BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg</i>
Elektrische Feinwaage AK 160	<i>Mettler-Toledo GmbH, Giessen</i>
Elektrophoresekammer Sub-Cell GT	<i>Bio-Rad Laboratories gmbH, München</i>
Gefrierkombination (+4 °C, -20 °C)	<i>Siemens AG, Berlin/München</i>
Gefrierschrank (-80 °C)	<i>Sanyo Electric Co., Ltd., Japan</i>
Gelkassetten	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Kreisschüttler MS 1 Minishaker	<i>IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen</i>
Kryostat LEICA CM3050 S	<i>Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch</i>
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	<i>Heraeus Instruments GmbH, Hanau</i>
Laborabzug Waldner	<i>Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen</i>
Lichtmikroskop: Wilovert S	<i>Helmut Hund GmbH, Wetzlar</i>
MACS Quadro Separator	<i>Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach</i>
MACS Mini Separator	<i>Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach</i>
Magnetrührer RH basic	<i>IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen</i>
Microfuge® 18 Zentrifuge	<i>Beckman Coulter Inc , Krefeld</i>

Microplate spectrophotometer	<i>BIO RAD, München</i>
Microtube Thermomixer Ts 1 ThermoShaker	<i>Biometra, Göttingen</i>
Mikrotiterschüttler MTS 2/4 digital	<i>IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen</i>
Mini-PROTEAN®3 Gelkammer	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Multipipette® plus	<i>Eppendorf, Deutschland</i>
Netzgerät PowerPac HC Power Supply	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Netzgerät Electrophoresis Power Supply EPS600	<i>Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg</i>
Neubauer Zählkammer	<i>Brandt, Ludwigshafen</i>
pH-Meter 766 Calimatic	<i>Knick, Deutschland</i>
Pipettierhilfe pipetus® - akku	<i>Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt</i>
Pipettierhilfe accu-jet pro	<i>Brand GmbH & Co. KG, Wertheim</i>
Pipettiersysteme Ein-Kanal-Pipetten 2- 1000µl	<i>ABIMED GmbH, Langenfeld</i>
Pipettiersysteme Mehr-Kanal-Pipetten 20- 200µl	<i>ABIMED GmbH, Langenfeld</i>
Schüttler ST5CAT	<i>neoLab Migge GmbH, Heidelberg</i>
Semi-Dry Transfer Cell Trans Blot® SD	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Sterile Werkbank: Heraeus® HERAsafe®	<i>Thermo Electron Corporation</i>
Sterile Werkbank: Class II type A/B3	<i>Nuaire, Plymouth, USA</i>
Tischzentrifuge CR 4.22	<i>Jouan GmbH, Fernwald</i>
TissueLyser	<i>Qiagen GmbH, Hilden</i>
Wasserbad GFL 1083	<i>Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze/Hänigsen</i>

7.1.1.2. Laborbedarf

<u>Laborbedarf</u>	<u>Vertrieb</u>
BD Vacutainer® CPT™ System	<i>BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg</i>
Blot-Papier Protean XL size extra thick (Whatman-Papier)	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Cellstar Suspension culture-Plate, 96 well,	<i>Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen</i>

U-shape, steril	
Cellstar Tubes 15ml	<i>Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen</i>
Combitips plus 1ml, 2,5ml, 5ml,10ml steril/unsteril	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Einfrrierbox, Nalgene, IDL	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Deckgläser	<i>Menzel-Gläser, Braunschweig</i>
FACS-Röhrchen	<i>BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg</i>
Glasplatten, Spacer 1,5 mm, 0,75 mm	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Injekt (Spritze) 10ml	<i>B Braun, Deutschland</i>
Kryoröhrchen (2 ml)	<i>Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen</i>
Küvette UVette®	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Magnetührstäbe	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Mahlkugeln für Gewebe	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Mikro-Schraubröhre 1,5ml, 2,0ml	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Multiply Strip 4er Kette 0,2 ml	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Nitrozellulose Membran (0,45 µm)	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Objektträger Super Frost / Plus	<i>Menzel-Gläser, Braunschweig</i>
pH Indikatorstäbchen pH 5,0-10,0 Neutrlit	<i>Merck, KGaA, Darmstadt</i>
Pipettenspitzen 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000µl	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Pipettenspitzen MultiFlex tip, flat	<i>Sorenson BioScience, Salt Lake City, USA</i>
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
Serologische Pipetten 1ml, 5ml, 10ml, 25ml	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Skalpell Feather disposalbe Scalpel No22	<i>Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan</i>
Tissue Culture Dish 60*15mm	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Tissue Culture Flasks T25 (25cm ²)	<i>Greiner Labortechnik</i>
Tissue Culture Flasks T75 (75cm ²), T175 (175cm ²)	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Tissue Culture Plate-6-Well flat bottom	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Zellschaber mit flexibler 2-Positionen-Klinge	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
Zentrifugen-Röhre 25ml, 50ml	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>

7.1.1.3. Chemikalien und Reagenzien

<u>Chemikalien/Reagenzien</u>	<u>Vertrieb</u>
Acrylamid	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
Anodenpuffer Roti-Blot A	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
Aprotinin	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
Aqua Spüllösung	<i>Delta Select, Dreieich</i>
Bacillo [®]	<i>BODE CHEMIE, Hamburg</i>
Bio-Rad Protein Assay	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Bovines Serumalbumin (BSA)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
Bromophenolblau	<i>Merck Eurolab GmbH, Darmstadt</i>
di-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	<i>Merck Eurolab GmbH, Darmstadt</i>
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	<i>Merck Eurolab GmbH, Darmstadt</i>
DMEM (1x) (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (with 4,5 g/L D-glucose, L-glutamine and 25mM HEPES buffer)	<i>GIBCO, New York, USA</i>
Dulbecco's PBS (Phosphate buffered saline)	<i>PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich</i>
Ethanol 99,8 % oder 70 %	<i>Apotheke Uniklinik Lübeck</i>
Ethidiumbromid (1 %)	<i>Invitrogen GmbH, Karlsruhe</i>
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
FACSFlow [™]	<i>BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg</i>
FKS, inaktiviert	<i>GIBCO, New York, USA</i>
Glycerol	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
Glycin	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
Igepal CA-630	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
Interferon-gamma (Recombinant Human Interferon-γ)	<i>BioSource Inc., Ca, USA</i>
Isopropanol (100 %) oder (70%)	<i>Apotheke Uniklinik Lübeck</i>
Kaliumchlorid (KCl) GmbH, Darmstadt	<i>Merck Eurolab</i>

Kathodenpuffer Roti-Blot K	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
LSM 1077 (Lymphocyte Separation Medium / Ficoll)	<i>PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich</i>
Mercaptoethanol	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
Methanol 99,8 %	<i>Merck Eurolab GmbH, Darmstadt</i>
Milchpulver	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Mycoplasma-Off®	<i>Minerva Biolabs GmbH, Berlin</i>
Natriumchlorid (NaCl)	<i>Merck Eurolab GmbH, Darmstadt</i>
Natrium Deoxycholat	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
Natriumdodecylsulfat (SDS)	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
Natrium Orthovanadat	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
Nicht-essentielle Aminosäuren (NAA) (100x)	<i>GIBCO, New York, USA</i>
Opti-MEM I	<i>GIBCO, New York, USA</i>
Paraformaldehyd	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	<i>Sigma</i>
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
Ponceau S	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
Protein-Molekulargewichtsstandard - Precision plus protein standards „Kaleidoscope“ - Prestained SDS Page Standard	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Quick start Bradford Dye Reagent, 1x	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
RPMI 1640	<i>GIBCO, New York, USA</i>
Saponin	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
SDS	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
Sodium Pyruvate Solution	<i>PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich</i>
TEMED (N,N,N,N-Tetramethyl-Ethylendiamin)	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>

Tissue-Tek	<i>Sakura, Zoeterwonde, Niederlande</i>
Trichloressigsäure (TCA)	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
Tris Base	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
Tris-HCl	<i>Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe</i>
Trypanblau	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>
Trypsin-EDTA (1x)	<i>PAA Laboratories GmbH, Cölbe</i>

7.1.1.4. Puffer und Lösungen

10 x Elektrophorese Puffer	250 mM Tris Base 1,9 M Glycin 1 % SDS ad 1L A.dest.
MACS-Puffer (600 ml)	3 ml FCS 2,4 ml EDTA 594,6 ml PBS → vor Verwendung: 10 min, 4000 U/min, 4 °C
10 x PBS (phosphate-buffered saline)	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g K ₂ HPO ₄ → auf 1 L mit A.dest. auffüllen, pH 7,4 einstellen
Ponceau S - Lösung	2 g Ponceau (0,2 %) 30 g Trichloressigsäure (3%) → auf 1 L mit A.dest. auffüllen
RIPA-Puffer	1 % Igepal CA-630 0,5 % Natrium Deoxycholat 0,1 % SDS in 1x PBS
Vor Gebrauch wurden hinzugefügt:	30 µl/ml Aprotinin (10 %) 10 µl/ml PMSF (10 mg/ml) 10 µl/ml Natrium Orthovanadat

0,1 % Saponin	1 % FCS 0,1 % Saponin in 1x PBS → pH-Einstellung pH 7,4 – 7,6
1% SDS	5 g SDS 500 ml A.dest.
2 x SDS Puffer	4 % SDS 10 % 2-Mercaptoethanol 20 % Glycerol 0,002 % Bromophenolblau 0,1 M Tris HCL pH 6,8
1 M Tris pH 6,8	0,5 M Tris Base 8 mM EDTA 0,4 % SDS
1 M Tris pH 8,8	1,5 M Tris Base 8 mM EDTA 0,4 % SDS

7.1.1.5. Zellkulturmedien und Zusätze

DMEM + Zusätze (steril)	500 ml DMEM + 4,5 g/l D-Glucose + L-Glutamin + 25 mM HEPES 50 ml FCS 5 ml Sodumpyruvate Solution 5 ml Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)												
Einfriermedium für Zellkultur (steril)	<table border="0"> <tr> <td></td> <td><u>1-Fach</u></td> <td><u>(2-Fach)</u></td> </tr> <tr> <td></td> <td>10 ml FCS</td> <td>(20 ml)</td> </tr> <tr> <td></td> <td>5 ml DMSO</td> <td>(10 ml)</td> </tr> <tr> <td></td> <td>35 ml Medium</td> <td>(20 ml)</td> </tr> </table>		<u>1-Fach</u>	<u>(2-Fach)</u>		10 ml FCS	(20 ml)		5 ml DMSO	(10 ml)		35 ml Medium	(20 ml)
	<u>1-Fach</u>	<u>(2-Fach)</u>											
	10 ml FCS	(20 ml)											
	5 ml DMSO	(10 ml)											
	35 ml Medium	(20 ml)											
Dimethylsulfonat (DMSO)	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen</i>												
Dulbecco's Modified Eagle Medium	<i>Invitrogen GmbH, Karlsruhe</i>												

(DMEM)	
Dulbecco's Phosphate Buffer (PBS)	<i>PAA Laboratories GmbH, Cölbe</i>
Fetales Kälberserum (FCS)	<i>PAA Laboratories GmbH, Cölbe</i>
Sodium Pyruvat (100 mM)	<i>PAA Laboratories GmbH, Cölbe</i>
LSM 1077 Lymphocyte Separation Medium	<i>PAA Laboratories GmbH, Cölbe</i>

7.1.1.6. Kombinierte Analyseverfahren

<u>Kit</u>	<u>Vertrieb</u>
Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit II	<i>BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg</i>
Anti-Mouse Ig, κ / Negative Control (FBS*) Compensation Particles Set	<i>BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg</i>
PE anti-human FOXP3 Flow Kit	<i>BioLegend, München</i>
CD4 ⁺ T cell Isolation Kit II human	<i>Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach</i>
CD4 Micro Beads Human	<i>Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach</i>
Immun-Blot [®] Assay Kit	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Quick Start [™] Bradford Protein Assay	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Quantikine [®] Human MDC	<i>R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt</i>

7.1.1.7. Antikörper

7.1.1.7.1. Primäre Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Spezifität</u>	<u>Vertrieb</u>
PerCP-conjugated anti- CD4 antibody	mouse IgG1, κ; mouse anti-human monoklonal antibody	<i>BD Pharmingen™</i> , Cat.No.: 550631, Heidelberg
APC-conjugated anti- CD25 (interleukin-2 receptor, IL-2R) antibody	mouse IgG1, κ; mouse anti-human monoklonal antibody	<i>eBioscience</i> , Cat.No.: 17-0259, San Diego
FITC-conjugated anti- CD25 antibody	mouse anti-human	<i>eBioscience</i> ; Cat.No.: 11-0259-71, San Diego
PE-Cy7 labeled anti- CD45RA antibody	mouse IgG1, κ; mouse anti-human monoklonal antibody	<i>BD Pharmingen™</i> , Cat.No.: 337186, Heidelberg
FITC-conjugated anti- CD62L antibody	mouse IgG1, κ; mouse anti-human monoklonal antibody	<i>BD Pharmingen™</i> , Cat.No.: 555543, Heidelberg
R-PE-conjugated anti- CD122 (IL-2 receptor β chain p75) antibody	mouse IgG1, κ; mouse anti-human monoklonal antibody	<i>BD Pharmingen™</i> , Cat.No.: 554525, Heidelberg
R-PE-conjugated anti- CD152 (CTLA-4) antibody	mouse IgG2a, κ; mouse anti-human monoklonal antibody	<i>BD Pharmingen™</i> , Cat.No.: 555853, Heidelberg
PE-Cy7 labeled rat anti- CCR7 (CD197) antibody	rat IgG _{2a} , κ; rat anti-human monoklonal antibody	<i>BD Pharmingen™</i> , Cat.No.: 557648, Heidelberg
PE-Cy7 labeled anti- CCR4 antibody	mouse IgG1, κ; mouse anti-human monoklonal antibody	<i>BD Pharmingen™</i> , Cat.No.: 557864, Heidelberg
Anti- CCL22/MDC antibody;	mouse IgG2B; mouse anti-human antibody	<i>R&D Systems GmbH</i> , Cat.No.: MAB3361,

		Wiesbaden-Nordenstadt
PE-conjugated anti- FOXP3 antibody	mouse IgG1, κ ; mouse anti-human antibody	BioLegend, Cat.No.: 320117, München
FITC-conjugated anti- GITR antibody	mouse IgG1; mouse anti-human monoklonal antibody	R&D Systems GmbH.No.: FAB689F, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti- β -Actin	Mouse IgG, monoklonal	Abcam, Cambridge, GB

7.1.1.7.2. Sekundäre Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Fluoreszenz</u>	<u>Vertrieb</u>
Goat anti-Mouse IgG (H + L)	AP	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Goat anti-mouse Ig (multiple adsorption)	PE	BD Pharmingen TM , Cat.No.: 550589, Heidelberg
Goat anti-mouse Ig (multiple adsorption)	APC	BD Pharmingen TM , Cat.No.: 550826, Heidelberg

7.1.1.7.3. Isotyp-Kontrollen

<u>Isotyp-Kontrolle/Spezifität</u>	<u>Fluoreszenz</u>	<u>Vertrieb</u>
Mouse IgG ₁ , κ	APC	BD Pharmingen TM , Cat.No.: 554681, Heidelberg
Mouse IgG ₁ , κ	PE	BD Pharmingen TM , Cat.No.: 345816, Heidelberg
Mouse IgG ₁ , κ	FITC	BD Pharmingen TM ,

		<i>Cat.No.: 345815, Heidelberg</i>
Mouse IgG _{2a} , κ	PE	<i>BD Pharmingen™, Cat.No.: 349053, Heidelberg</i>
Mouse IgG _{2b} , κ	PE	<i>Miltenyi Biotec, Cat.No.: 130-092-215 Bergisch Gladbach</i>

7.1.1.8. Verwendete permanente Zelllinien

<u>Zelllinie*</u>	<u>Entität</u>	<u>Herkunft</u>
BHY (HNSCC Zelllinie)	Humanes Plattenepithelkarzinom aus dem Oropharynx (hochdifferenziert)	DMSZ Braunschweig (Deutschland)
CAL-27 (HNSCC Zelllinie)	Humanes Plattenepithelkarzinom aus der Zunge	American Type Culture Collection (USA)
HaCat	Immortalisierte Keratinocyten	DMSZ Braunschweig (Deutschland)
MCF-7	Mamma-Karzinom	Lübeck (Deutschland)
PCI-1 (HNSCC Zelllinie)	Humanes Plattenepithelkarzinom aus dem Hypopharynx	Pittsburgh Cancer Institut (USA)
PCI-13 (HNSCC Zelllinie)	Humanes Plattenepithelkarzinom aus dem Kopf-Hals-Bereich	Pittsburgh Cancer Institut (USA)

* Besonderer Dank gilt Frau Dr. Theresa L. Whiteside (Pittsburgh Cancer Institute) für die Bereitstellung der Tumorzelllinien.

7.1.1.9. Verwendete Gewebeproben für Negativ-Kontrollen

<u>Probe</u>	<u>Gewebeart</u>
GP437	Adenoid

7.1.1.10. Computer und Software

<u>Internet-Recherche:</u> http://www.ncbi.nlm.nih.gov EndNote 7.0.	<i>Thomson/ISI ResearchSoft, © 2003, USA</i>
<u>Text-, Tabellen-, Abbildungsbearbeitung:</u> Adobe Photoshop Version 7.0 Microsoft Office 2003	<i>Adobe Systems Inc., San Jose, USA Microsoft Corporation, Redmont, USA</i>
<u>FACS-Messungen:</u> BD FACS Diva™ Software Version 4.1.2	<i>BD Biosciences, Heidelberg</i>
<u>Ergebnisauswertung und Statistik:</u> Microsoft Office 2003 SPSS 12.0 für Windows SigmaPlot 10.0	<i>Microsoft Corporation, Redmont, USA SPSS Inc., Chicago, USA Systat Software Inc</i>

7.2. Erklärung der Ethikkommission

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

8 Danksagungen

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die bei der Entstehung dieser Arbeit in irgendeiner Form mitgeholfen haben:

Ich danke Frau Prof. Dr. med. Barbara Wollenberg, die mir die Durchführung der vorliegenden Dissertation an der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohren-Heilkunde an der Universität zu Lübeck und die wissenschaftliche Förderung ermöglichte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Ralph Pries, der die Betreuung dieser Arbeit übernahm, für seine außergewöhnliche Unterstützung, für seine ständige Ansprechbarkeit und seine Motivationsbereitschaft. Unsere lebhaften Diskussionen, seine Anregungen und seine positive Einstellung haben in großem Maße zu der Entstehung dieser Arbeit beigetragen. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke!

Ich möchte mich ganz herzlich bei Brigitte Wollmann, Ewelina Szymanski, Birgit Hüsing und Britta Dannenberg bedanken, die mich in zahlreiche Techniken eingearbeitet haben. Sie hatten immer für alle Fragen ein offenes Ohr und ich danke ihnen für die ständige Bereitschaft zu erklären und zu helfen.

Außerdem möchte ich mich bei allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe Tumorbioogie/Immuntherapie von Kopf – Hals – Karzinomen für eine tolle Arbeitsatmosphäre, für nette Gespräche, fortwährende Unterstützung und viel Spaß im Laboralltag bedanken!

Vielen Dank auch an die Mitarbeiter der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohren-Heilkunde, an das Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität zu Lübeck und an T.L. Whiteside (Pittsburgh Cancer Center) für die Bereitstellung von Untersuchungsmaterial.

9 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Anne Kathrin Schott

Geburtsdatum / -ort:

Familienstand:

Staatsangehörigkeit:

Konfession:

Schulbildung:

Ausbildung:

Tabellarischer Lebenslauf

von bis

8/92 - 6/00

8/00 - 6/02

10/02 – 5/09

7/08 – 3/09

4/09

seit 10/09

Sprachkenntnisse

Deutsch:

Schwedisch:

Englisch:

Französisch:

Latein:

Stipendium

02/07

10 Publikationen und Präsentationen

Schott, A.K., R. Pries, and B. Wollenberg, *Permanent up-regulation of regulatory T-lymphocytes in patients with head and neck cancer.* Int J Mol Med. 26(1): p. 67-75. (2010)

Robert Böschke, **Anne Kathrin Schott**, Ralph Pries, Barbara Wollenberg; ***Immunmodulation regulatorischer T-Zellen (Treg) in Kopf-Hals-Karzinomen (HNSCC)***; Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. 80. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie; Rostock

Anne K. Schott*, Ralph Pries* and Barbara Wollenberg; ***Einfluss von Kopf-Hals Karzinomen auf regulatorische T-Lymphozyten (Treg)***; Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie; 78. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V.; München, 16.-20.05.2007. Düsseldorf