



# INAUGURAL-DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht - Karls - Universität  
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Yvonne Ziouta  
aus Thessaloniki/Griechenland

Tag der mündlichen Prüfung: .....

# **Thema**

## **T-Zell Gedächtnis und Zytokinmilieu bei Kopf-Hals-Tumoren**

Gutachter: Prof. Dr. Volker Schirmacher  
Prof. Dr. Peter Altevogt

# Danksagung

Zunächst möchte ich mich besonders herzlich bei Herrn Prof. V. Schirmmacher dafür bedanken, dass ich in seiner Abteilung diese Arbeit durchführen konnte. Vor allem aber für seine Ideen und anregenden Diskussionen zu meinem Projekt.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. P. Altevogt, der sich neben meiner Diplomarbeit auch noch bereit erklärt hat, meine Doktorarbeit zu begutachten.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn PD P. Beckhove für seine stete Unterstützung, für sein Interesse an meiner Arbeit und für sein Vertrauen, dass ich im Otto-Meyerhof-Zentrum arbeiten durfte.

Danken möchte ich auch Frau PD C. Herold-Mende und Herrn Dr. G. Dyckhoff für die Zeit, die sie sich für Anrufe/Mails/Analysen nahmen, und somit zum Gelingen dieser Arbeit entscheidend beigetragen haben. Bei Frau Dr. S. Pfannenstiel bedanke ich mich sehr herzlich für die Überlassung ihrer Infiltrationsdaten. Allen Mitarbeiterinnen des molekularbiologischen Labors der Kopfklinik bin ich für ihr Engagement sehr dankbar.

Ebenso möchte ich mich bei Fr. M. Bucur für die Einführung in verschiedene Labortechniken und ihre stete Hilfsbereitschaft bedanken.

Bei allen meinen Arbeitskollegen möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die wertvollen Ratschläge bedanken.

Der Tag an dem Philipp mir gesagt hatte, dass ich in seiner Gruppe Praktikum machen konnte, war wirklich ein sehr glücklicher. Endlich könnte ich die Immunologie richtig lernen. Seitdem sind fünf Jahre vergangen und ich weiß, dass mich die Zeit im DKFZ sehr verändert hat. Daran waren viele beteiligt. Alex, bei dir habe ich mehr über Pflanzen und Tiere gelernt als im ganzen Grundstudium. Danke dafür, dass ich jeden Morgen aufs Neue Lust aufs Labor hatte. Janna, meine liebste Spinning Partnerin! Unsere Abende im Thanner's sind unvergesslich. Svenja und Safwan, danke für die tolle Silvester-Tradition. Nina, my fellow greek Virgo, what a bond! Too bad we met so late! Carmen und Katrin, danke für die Tipps bei ELISA und ELISpot und die Mädchen-Abende. Yingzi, it was such an intellectual challenge having you in the lab! Beatrice und Johann, ihr beiden habt meine Schreibzeit im OMZ sogar schön gemacht! Danke für die tollen Gespräche.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Bei meiner Mutter dafür, dass sie mir Stärke und Selbstständigkeit in die Wiege gelegt hat. Bei meinem Vater dafür, dass ich im zweiten Semester einen Button mit dem Spruch „research makes sense“ in seiner Schublade gefunden habe. Ich habe ihn damals schon getragen, jetzt verstehe ich ihn. Danke dafür, dass ihr mir jede Tür öffnet, durch die ich gehen will.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	I
<b>Zusammenfassung</b>	IV
<b>Abstract</b>	V
<b>1. Einleitung</b>	1
1.1 Die T-Zell vermittelte Immunität	1
1.1.1 Entwicklung von T-Lymphozyten	1
1.1.2 T-Zellaktivierung und Antigenerkennung	2
1.1.3 T-Zellpopulationen	3
1.1.4 Eigenschaften bewaffneter Effektorzellen	5
1.1.4.1 Proinflammatorische Zytokine	5
1.1.4.2 Immunregulatorische Zytokine	7
1.1.5 Immunologisches T-Zellgedächtnis	8
1.2 Tumorimmunologie	10
1.3 Kopf-Hals-Tumore	12
1.4 Aufgabenstellung	14
<b>2. Material</b>	15
2.1 Geräte	15
2.2 Verbrauchsmaterialien	16
2.3 Chemikalien	17
2.4 Medien und Mediensupplemente	18
2.5 Zytokine	18
2.6 Dynabeads®	18
2.7 MACS® MicroBeads	19
2.8 ELISpot Kits	19
2.9 ELISA Kits	19
2.10 Primäre Tumorzelllinien	20
2.11 Etablierte Tumorzelllinien	20
2.12 Antikörper	20
2.13 Proteine	20
2.14 Peptide	21

---

<b>2.15</b>	Zusätzliche Software	21
<b>3.</b>	<b>Methoden</b>	22
<b>3.1</b>	Lösungen und Puffer	22
<b>3.2</b>	Medien und Mediensupplemente	23
<b>3.3</b>	Zellbiologische Methoden	24
3.3.1	Zellkulturbedingungen	24
3.3.2	Kultivierung von humanen Primärzellen	24
3.3.3	Kultivierung von humanen Tumorzellen	25
3.3.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	25
3.3.5	Bestimmung von Zellzahl und Vitalität	25
<b>3.4</b>	Proteinbiochemische Methoden	26
3.4.1	Herstellung von Gewebelysaten	26
3.4.2	Herstellung von Zellysaten	26
3.4.3	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	26
3.4.4	Lösen von Peptiden	27
<b>3.5</b>	Immunologische Methoden	27
3.5.1	Klinisches Material von Kopf-Hals-Tumorpatienten	27
3.5.2	Isolierung und Kultivierung humaner mononuklearer Zellen aus Blut	28
3.5.3	Isolierung und Kultivierung humaner mononuklearer Zellen aus Lymphknoten	28
3.5.4	Isolierung spezifischer Immuzellpopulationen über Zelloberflächen-Moleküle	28
3.5.4.1	Anreicherung von T-Lymphozyten mittels Dynabeads®	29
3.5.4.2	Anreicherung von T-Lymphozyten mittels MACS® MicroBeads	29
3.5.4.3	Anreicherung von dendritischen Zellen mittels Dynabeads®	30
3.5.5	Antigenbeladung von dendritischen Zellen	31
3.5.6	Durchflusszytometrie	31
3.5.6.1	Identifizierung von HLA-A2 exprimierenden Lymphozyten	31
3.5.7	ELISpot Test ( <i>enzyme-linked immunospot assay</i> )	33
3.5.8	ELISA Test ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )	34
3.5.8.1	IFN- $\alpha$ ELISA Test	35
3.5.8.2	IL-10 und IL-12 (p70) ELISA Test	35
3.5.8.3	IL-17 ELISA Test	36
3.5.8.4	TGF- $\beta$ 1 ELISA Test	36
3.5.9	Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten	36
3.5.10	<sup>51</sup> Chrom-Freisetzungstest	38

---

<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	40
<b>4.1</b>	Tumorreaktive Gedächtnis T-Zellen bei primär operierten Kopf-Hals-Tumorpatienten	40
4.1.1	Nachweis tumorreaktiver Gedächtnis T-Zellen bei Kopf-Hals-Tumorpatienten	41
4.1.2	Lokalisation tumorreaktiver Gedächtnis T-Zellen bei Kopf-Hals-Tumorpatienten	43
<b>4.2</b>	Lymphozytenpopulationen tumorreaktiver Gedächtnis T-Zellen bei primär operierten Kopf-Hals-Tumorpatienten	51
4.2.1	Verteilung von CD4 und CD8 T-Zellsubpopulationen in Blut und Lymphknoten bei Kopf-Hals-Tumorpatienten	51
4.2.2	Tumorreaktive CD4 und CD8 T-Zellen innerhalb der Gedächtnispopulation von Blut und Lymphknoten bei Kopf-Hals-Tumorpatienten	53
<b>4.3</b>	Nachweis tumorassoziierter antigenreaktiver Gedächtnis T-Zellen bei primär operierten Kopf-Hals-Tumorpatienten	57
<b>4.4</b>	Polarisierte tumorreaktive Gedächtnis T-Zellen primär operierter Kopf-Hals-Tumorpatienten	59
4.4.1	Besonderheiten der tumorspezifischen IFN- $\gamma$ Sekretion von Gedächtnis T-Zellen bei Kopf-Hals-Tumorpatienten	59
4.4.2	Analyse des Zytokinprofils von tumorreaktiven Gedächtnis T-Zellen bei Kopf-Hals-Tumorpatienten	63
<b>4.5</b>	Zytokinmilieu von Tumorlysat und Blutplasma bei primär operierten Kopf-Hals-Tumorpatienten	69
4.5.1	Zytokinprofil von Tumorlysaten und Blutplasmata bei Kopf-Hals-Tumorpatienten	69
4.5.2	Einfluss des Zytokinmilieus im Primärtumor auf die Etablierung einer tumorspezifischen Gedächtnis T-Zellimmunantwort	75
4.5.3	Vergleich des Zytokinmilieus im Primärtumor mit der Zytokinproduktion primärer Kopf-Hals-Tumorzelllinien	78
<b>4.6</b>	T-Zellinfiltration in Kopf-Hals-Tumoren	81
4.6.1	Nachweis der T-Zellinfiltration in Primärtumoren und Metastasengeweben und Vergleich dieser mit der Tumorklassifizierung	81
4.6.2	T-Zellinfiltration in Kopf-Hals-Tumoren und tumorreaktives T-Zellgedächtnis	84
4.6.3	T-Zellinfiltration und Zytokinmilieu in Kopf-Hals-Tumoren	91

---

<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	94
<b>5.1</b>	Tumorreaktive Gedächtnis T-Zellen existieren bei primär operierten Kopf-Hals-Tumorpatienten	95
<b>5.2</b>	Tumorreaktive Gedächtnis T-Zellen lokalisieren bei Kopf-Hals-Tumorpatienten hauptsächlich im Lymphknoten	99
<b>5.3</b>	Kopf-Hals-Tumorpatienten besitzen CD8 T-Zellen mit hoher Tumorreaktivität und hohe Frequenz von tumorspezifischen CD4 T-Zellen	102
<b>5.4</b>	Tumorspezifische Blut T-Zellen sind bei Kopf-Hals-Tumorpatienten hauptsächlich Th2 polarisiert	105
<b>5.5</b>	TGF- $\beta$ 1 ist im Tumorgewebe von nicht IFN- $\gamma$ tumorreaktiven Kopf-Hals-Tumorpatienten erhöht	109
<b>5.6</b>	Nicht IFN- $\gamma$ tumorreaktive Kopf-Hals-Tumorpatienten zeigen verstärkte CD4 Tumorinfiltration, die mit erhöhtem TGF- $\beta$ 1 Vorkommen und kleiner Tumorgroße korreliert	115
<b>5.7</b>	Implikationen auf die Immuntherapie von Kopf-Hals-Tumoren	118
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	121
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	136
<b>7.1</b>	Klinische Charakteristika der untersuchten Kopf-Hals-Tumorpatienten	136
<b>7.2</b>	Zusammenfassung der klinischen Charakteristika untersuchter Kopf-Hals-Patienten	137

## Abkürzungsverzeichnis

aa	<i>amino acid</i>
A	Alanin
Abb.	Abbildung
Abt.	Abteilung
B	Belgien
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Zystein
ca.	circa
CCR7	<i>chemokine (C-C motif) receptor 7</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CH	Schweiz
Ci	Curie
CUP	<i>carcinoma unknown primary</i>
D	Deutschland
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbecco's modifiziertes eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELISpot	<i>enzyme-linked immunosorbent spot</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
F	Frankreich
F	Phenylalanin
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i>
Fas-L	Fas Ligand
Fc	<i>fragment crystallizable</i>
FI	Finnland
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

FKS	fötales Kälberserum
g	9,81m/s <sup>2</sup>
g	Gramm
G	Glyzin
GM-CSF	<i>granulocyte and monocyte colony stimulating factor</i>
Gy	Gray
H	Histidin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin Ethansulfonsäure
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
I	Isoleuzin
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
K	Lysin
l	Liter
L	Leuzin
L	Ligand
LK	Lymphknoten
LKTZ	T-Zellen des Lymphknotens
M	Methionin
M	Molar (mol/l)
M	(Fern-)Metastase
MAGE-3	<i>melanoma-associated antigen-3</i>
µg	Microgramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
ml	Mililiter
µl	Mikroliter
mm	Milimeter
MPC	<i>magnetic particle concentrator</i>
MUC-1	Muzin-1
N	Asparagin
N	<i>nodi lymphatici</i>
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP <sup>+</sup> /NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NDV	<i>newcastle disease virus</i>
NK	<i>natural killer</i>

---

NL	Niederlande
nm	nanometer
NOD/SCID	<i>non-obese diabetic/ severe combined immunodeficiency</i>
P	Prolin
PB	peripheres Blut
PBMZ	Mononukleare Zellen des peripheren Blutes
PBMZ-L	Lysat aus PBMZ
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBTZ	T-Zellen des Blutes
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pg	Pikogramm
Q	Glutamin
R	Arginin
R	Grading
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roosevelt Park Memorial Institute</i>
S	Serin
SEB	<i>Staphylococcus</i> Enterotoxin B
T	Threonin
T	Primärtumor
TAA	tumorassoziiertes Antigen
Tab.	Tabelle
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Th	Helfer T-Zellen
Treg	regulatorische T-Zelle
Tr1	Suppressor T-Zelle
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TU-L	Lysat aus Tumorgewebe
UICC	<i>union internationale contre le cancer</i>
USA	<i>United States of America</i>
UV	ultraviolett
V	Valin
v/v	<i>volume per volume</i>
W	Tryptophan
w/v	<i>weight per volume</i>
Y	Tyrosin

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Präsenz spontan generierter, tumorreaktiver Gedächtnis T-Zellen bei Kopf-Hals-Tumorpatienten gezeigt. Mit Hilfe autologer dendritischer Zellen, die zuvor mit autologem Tumorslysat beladen worden waren, wurden tumorspezifische, inflammatorische Gedächtnis T-Zellen nachgewiesen. 25% der Patienten wiesen eine spontane Tumorimmunität auf. CD4 T-Zellen waren zu 16% tumorreaktiv, CD8 T-Zellen zu 28%. Die Frequenz tumorspezifischer Gedächtnis T-Zellen war in der CD4 Subpopulation signifikant erhöht. CD8 T-Zellen demonstrierten ein polyvalentes T-Zellrepertoire. Die Mehrheit der Tumorpatienten ohne detektierbares Anti-Tumorgedächtnis waren im fortgeschrittenen Spätstadium (Stadium IV). Umfangreichere Analysen der zellulären Tumorimmunität ergaben, dass diese zu 50% Th2 polarisiert war, während 25% der Patientenlymphozyten Th1 Polarisierung aufwiesen.

Tumorspezifische, inflammatorische Gedächtnis T-Zellen wurden im peripheren Blut und tumordrainierenden, nicht metastasierten Lymphknoten in ähnlicher Frequenz detektiert. Tumor-Immunreaktivität war im lymphatischen Organ auffällig öfter nachweisbar: 19% Immunreaktivität der Lymphknoten T-Zellen und 5% der Blutlymphozyten. Im Lymphknoten waren CD4 und CD8 T-Zellantworten gleich vertreten. Im Blut war Tumor-Immunreaktivität tendenziell öfter in der CD8 Subpopulation detektierbar. Lymphatische Gedächtnis T-Zellen waren doppelt so oft Th1 polarisiert als entsprechende Lymphozyten im Blut. Die Th2 Polarisierung war in beiden Zellkompartimenten gleich.

In Tumorgewebe und Blutplasmata von Kopf-Hals-Tumorpatienten wurden immunsuppressive und -stimulatorische Zytokine detektiert. Im Vergleich zu gesunden Donoren waren erstere in der Regel erhöht, letztere erniedrigt. Eine signifikant inverse Korrelation bestand zwischen erhöhtem TGF- $\beta$ 1 Vorkommen von Tumorgewebe und IFN- $\alpha$  Nachweis in solchen, sowie Induktion von Th1 Tumor-Immunreaktivität. Kopf-Hals-Tumorpatienten mit 3-Jahres-Rezidivmanifestation zeigten signifikant erhöhte TGF- $\beta$ 1 Konzentrationen im Tumorgewebe.

Malignome von Kopf-Hals-Tumorpatienten ohne Th1 Tumorreaktivität wurden tendenziell von mehr naiven T-Zellen im Vergleich zu reaktiven Patienten infiltriert. In Tumoren von nicht Th1 tumorreaktiven Patienten wanderten signifikant mehr CD4 T-Zellen ein. Dieser Befund korrelierte signifikant mit einer erhöhten Stadium IV Zuordnung der Patienten und mit einem erhöhten TGF- $\beta$ 1 Nachweis im Tumorgewebe. Erhöhtes Vorkommen von tumorinfiltrierenden CD4 T-Zellen und/oder viel TGF- $\beta$ 1 beeinflussten die Tumorgöße signifikant. In Anwesenheit von Th1 tumorreaktiven Gedächtnis T-Zellen im Blut wurden die Malignome von signifikant mehr CD8 als CD4 T-Zellen infiltriert. Die CD8 T-Zellen konzentrierten sich peritumoral und drangen nicht tiefer ins Tumoriinnere ein. Die Tumore wurden bei einer Th1 Tumorreaktivität von Lymphknoten T-Zellen gleichmäßig von CD4 und CD8 T-Zellen infiltriert. Letztere waren sowohl peri- als auch intratumoral nachweisbar.

Die hiesigen Analysen liefern einen wichtigen Beitrag zum Verständnis von Tumor-Immuninteraktionen bei Kopf-Hals-Tumorpatienten.

## Abstract

The present study documents T-cell mediated antitumor immune in patients with head and neck cancer. Upon restimulation with autologous tumor antigen presenting dendritic cells, tumor-specific, inflammatory memory T-cells were detected. 25% of tumor patients exhibited spontaneous anti-tumor immunity. Patients' responses consisted of 16% CD4 T-cell-mediated reactivity and 28% CD8 T-cell reactivity. The frequency of anti-tumor memory T cells was significantly higher in the CD4 subpopulation. CD8 T-cells showed a polyvalent T-cell repertoire. The majority of tumor patients with no detectable antitumor immunity were late stage disease patients (stage IV). More complex analyses of cellular tumor immunity showed Th2 polarisation of anti-tumor memory T-cells in 50% of patients in comparison to Th1 polarised responses in 25% of cases.

Anti-Tumor, inflammatory memory T-lymphocytes were detectable in the peripheral blood and in tumor-draining, non-metastasised lymph nodes with similar frequencies. The reactivity of the memory cell pool was noticeably higher in lymph node cells (19%) compared to blood cells (5%). While CD4 and CD8 T-cells were equally included in lymph node T-cell responses, blood immune reactivity tended to be more frequently CD8 T-cell mediated. Th2 polarisation was similar in both compartments. Lymph node cells included twice as much Th1 polarisation compared to blood cells.

Both immunosuppressive and -stimulatory cytokines were detectable in tumor tissues and in blood plasma of head and neck cancer patients. The former were generally increased, the later were decreased, in comparison to healthy donors. Elevated levels of TGF- $\beta$ 1 in tumor tissue correlated inversely with the IFN- $\alpha$  content of tumors and with Th1 tumor immune reactivity. Patients with relapse during the first three years of tumor disease revealed significantly higher levels of TGF- $\beta$ 1 in their tumors.

Tumor tissues of Th1 non-responding head and neck cancer patients were often infiltrated by naïve T-cells and CD4 T-cells were significantly more frequent in those patients compared to responders. This finding correlated significantly with late stage disease and higher TGF- $\beta$ 1 levels in tumor tissues. Tumor size was significantly influenced by high numbers of tumor infiltrating CD4 T-cells with or without elevated TGF- $\beta$ 1 concentration. Patients with Th1 tumor-reactive memory T-cells in the blood had tumor tissues mainly infiltrated with CD8 T-cells. The cells were mainly located peritumorally. Tumor tissues of patients with lymph node tumor-reactive T-cells were equally infiltrated by CD4 and CD8 T-lymphocytes. These cells were uniformly localised in the tumor tissue.

These data provide important information for understanding tumor-immune interactions in head and neck cancer patients.

# 1. Einleitung

## 1.1 Die T-Zell vermittelte Immunität

### 1.1.1 Entwicklung von T-Lymphozyten

T-Zellen werden aus hämatopoietischen Stammzellen des Knochenmarks gebildet und wandern als Vorläuferlymphozyten zum Thymus, dem Ort ihrer primären Entwicklung. Im Thymus findet zunächst die Rekombination der Gene, die für den Antigenrezeptor (T-Zellrezeptor) kodieren, statt. Die Diversität der T-Zellrezeptoren ist auf die komplementaritätdefinierenden Regionen begrenzt (Rudolph *and* Wilson, 2002) und beinhaltet theoretisch über  $10^{15}$  verschiedene T-Zellrezeptoren (Davis *and* Bjorkman, 1988). Tatsächlich sind im menschlichen Immunsystem ca.  $10^{12}$  verschiedene T-Zellrezeptor Klonotypen präsent (Arstila *et al.*, 1999). Diese Diskrepanz ist durch die zentrale Toleranz, die im Thymus stattfindet, bedingt.

Im Rahmen der zentralen Toleranz werden Thymozyten, deren T-Zellrezeptor keine oder sehr niedrige Affinität zu Selbstantigen-MHC (*major histocompatibility complex*) hat, durch Tod nach Vernachlässigung eliminiert (Zhan *et al.*, 2003). Nur solche Vorläuferlymphozyten überleben und differenzieren sich, deren T-Zellrezeptor eine niedrige Affinität zu Selbstantigen-MHC aufweist. Dieser als positive Selektion bekannte Prozess findet im Kortex des Thymus nach Interaktion mit kortikalen Thymusepithelzellen statt (Bousso *et al.*, 2002) und gewährleistet die Reifung solcher T-Zellvorläufer, die Antigen im Kontext von selbst-MHC Molekülen erkennen.

Nun wandern die positiv selektierten Thymozyten zur Medulla des Thymus (Ueno *et al.*, 2004), wo sie mit medullären Thymusepithelzellen (Derbinski *et al.*, 2001) und dendritischen Zellen interagieren (Gallegos *and* Bevan, 2004). Sind die Kontakte dieser Zellen mit Vorläufer T-Zellen stark affin, so werden die T-Zellen negativ selektiert und sterben durch klonale Deletion (Palmer, 2003) oder sie werden anergisiert (Hammerling *et al.*, 1991).

Die übrigen T-Zellen verlassen als ausgereifte, naive T-Zellen den Thymus und wandern in sekundäre, lymphatische Organe ein.

In manchen Fällen jedoch werden T-Zellrezeptoren mit starker Affinität zu Selbstantigen-MHC gezielt selektiert (Baldwin *et al.*, 2004). Solche T-Zellen differenzieren zu einem regulatorischen Phänotyp, der später die so genannte periphere Toleranz vermittelt. Diese ist essentiell, da nicht sämtliche selbstreaktive Lymphozyten im Thymus eliminiert werden

können. Diese Ineffizienz liegt teilweise daran, dass nicht alle Selbstantigene am Ort der primären Lymphozytenentwicklung exprimiert werden (zusammengefasst in Hogquist *et al.*, 2005).

### 1.1.2 T-Zellaktivierung und Antigenerkennung

Der entscheidende erste Schritt der adaptiven Immunantwort ist die Aktivierung naiver antigenspezifischer T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen zur Proliferation und Differenzierung in bewaffneten Effektorzellen. In sekundären lymphatischen Organen interagieren T-Lymphozyten mit antigenpräsentierenden dendritischen Zellen (von Andrian *and* Mackay, 2000). Diese als immunologische Synapse bekannte dynamische Wechselwirkung an der Stelle des Zell-Zell Kontaktes besteht aus diversen molekularen Verknüpfungen (Friedl *and* Storim, 2004; Miller *et al.*, 2004) und aktiviert verschiedene Signalkaskaden in Lymphozyten. Somit wird der Ausgang der Immunantwort dargelegt (zusammengefasst in Friedl *et al.*, 2005; Trautmann *and* Valitutti, 2003).

Voraussetzung für die Ausbildung einer immunologischen Synapse sind die Antigenerkennung und Kostimulation der T-Zellen (Thery *and* Amigorena, 2001; Banchereau *and* Steinman, 1998). Der Ligand des reifen T-Zellrezeptors besteht aus einem Fremdpeptid, das an ein MHC Molekül gebunden ist. Dieses wiederum wird von den Korezeptoren CD4 und CD8 gebunden. MHC Moleküle sind membranständige Glykoproteine und werden als Klasse I und Klasse II zahlreich auf der Oberfläche dendritischer Zellen nach Aktivierung durch Fremdantigen exprimiert. MHC Klasse I bindet Moleküle, welche durch Prozessierung im Proteasom innerhalb des Zytosols generiert wurden. Mittels MHC Klasse II werden Peptide von Proteinen präsentiert, die von aufgenommenen extrazellulären Fremdantigenen stammen. Dendritische Zellen regulieren kostimulatorische Moleküle, wie B7.1 und B7.2, hoch. Diese binden an CD28 auf naiven T-Zellen und induzieren eine Aktivierung und Proliferation von naiven T-Zellen (Gonzalo *et al.*, 2001). Die Kostimulation verhindert die Anergisierung der Lymphozyten und ist für die Synthese und Sekretion von IL-2, den autokrinen T-Zellwachstumsfaktor, notwendig (Galluci *and* Matzinger, 2001; Cerdan *et al.*, 1995).

Die gesamte Immunantwort sieht folgendermaßen aus (aus Antia *et al.*, 2005), dass die primäre Infektion mit einem Pathogen zu einer rapiden klonalen Expansion (um ca. 4-5 Logskalen) der antigenspezifischen T-Zellen führt. Diese erste Phase generiert die Population von Effektorzellen und dauert nur einige Wochen. Der nachfolgenden Beseitigung von Pathogenen schließt sich die zweite Phase an. Hier findet eine klonale Kontraktion (um ca. 1-2 Logskalen) statt, die eine kleinere Population antigenspezifischer T-Zellen zurücklässt. Es handelt sich hierbei um Gedächtnis T-Zellen, die mehrere Jahre lang ohne

Pathogenbegegnung existieren können (Homann *et al.*, 2001; Murali-Krishna *et al.*, 1998). Die dritte Phase schließt die Erhöhung der Gedächtnis T-Zellzahlen nach einer zweiten Auseinandersetzung mit dem Pathogen und die Protektion des Organismus ein. Auf diesem Prinzip basieren sämtliche Vakzinierungen.

### 1.1.3 T-Zellpopulationen

In sekundären lymphatischen Organen residieren zwei Hauptpopulationen von T-Lymphozyten: CD4 und CD8 positive T-Zellen. Sie differenzieren sich aufgrund verschiedenartiger Erkennung von Fremdartigen-MHC unterschiedlich und besitzen verschiedene Effektorfunktionen (Schlienger *et al.*, 2000).

Naive CD8 positive T-Zellen sind nach antigener Stimulation dazu prädestiniert, zytotoxische Zellen zu werden. Sie können mit intrazellulären Erregern infizierte Zielzellen töten. Ihr T-Zellrezeptor und der Korezeptor CD8 erkennen das Fremdartigen im Kontext von MHC Klasse I (Barry *et al.*, 2000; Callan *et al.*, 2000).

Die Differenzierung naiver CD4 positiver T-Zellen ist komplexer, da nach Aktivierung eine Differenzierung in zwei Hauptgruppen stattfindet (Mosmann *and* Sad, 1996). Aus nicht polarisierten Th0 Zellen entstehen entweder Th1 oder Th2 polarisierte Helfer T-Lymphozyten (Szabo *et al.*, 2003; Glimcher *and* Murphy, 2000; O'Garra *and* Arai, 2000). In beiden Fällen wird extrazelluläres Fremdartigen im Kontext von MHC Klasse II vom T-Zellrezeptor bzw. vom Korezeptor CD4 erkannt. Die verschiedenen Subpopulationen CD4 positiver T-Zellen unterstützen vorzugsweise zellvermittelte (Th1 polarisierte) oder humorale (Th2 polarisierte) Immunität (zusammengefasst in Mosmann *and* Coffman, 1989). Th1-Zellen fördern die zytotoxischen Effektorfunktionen von NK-Zellen und CD8 T-Zellen, sowie die Aktivierung von Makrophagen. Th2-Zellen begünstigen die IgG4 und IgE Antikörperbildung von B-Zellen.

Dysregulierte CD4 Helfer T-Zellen können Immunpathologien induzieren (Li *et al.*, 2006). Überhöhte Th1 Immunantworten sind mit verschiedenen autoimmunen und inflammatorischen Funktionsstörungen assoziiert. Erhöhte Th2 Zytokinproduktion ist in atopischen Krankheiten, wie Allergien und Asthma, involviert. Die Erhaltung des geeigneten Th1/Th2 Gleichgewichts ist eine der wesentlichen Aufgaben des humanen Immunsystems. Wie sich das Profil nach den verschiedenen Pathogenen und den befallenen Geweben verändert, ist größtenteils noch unbekannt (Kalinski *and* Moser, 2005). Eine essentielle Rolle scheinen die dendritischen Zellen zu spielen (Moser *and* Murphy, 2000).

Dendritische Zellen liefern T-Lymphozyten antigene und kostimulatorische Signale (bekannt als Signal 1 und Signal 2 entsprechend), die Spezifität und Stärke der Immunantwort festlegen. Sie übermitteln polarisierende Signale (Signal 3), die das Th1/Th2 Muster verändern können (Liu *et al.*, 2001; Kalinski *et al.*, 1999). Dies kann über zwei Mechanismen

erfolgen. Der erste moduliert die Funktion der dendritischen Zellen, der zweite basiert auf einer Selektion von vordefinierten antigenpräsentierenden Zellen (zusammengefasst in Kalinski *and* Moser, 2005). Der modulierende Mechanismus setzt eine durch die verschiedenen Pathogene qualitative Polarisierung der dendritischen Zellen voraus (Kapsenberg, 2003; Pulendran *et al.*, 2001). Die Engagierung verschiedener Rezeptoren, wie Toll-*like* Rezeptoren, induziert eine Polarisierung der Dendriten, die entweder mit einer Th1 oder einer Th2 Immunantwort kompatibel ist. Der selektive Mechanismus baut auf verschiedene intrinsische Eigenschaften der Dendritenpopulationen auf (Pulendran *et al.*, 1999; Rissoan *et al.*, 1999). So können myeloide dendritische Zellen vorzugsweise Th1 Reaktivität induzieren, während plasmazytoide Dendriten für Th2 zuständig sind. Beide Mechanismen stützen sich auf die Existenz keimbahnkodierender Mustererkennungsrezeptoren (PRRs, pattern-recognition receptors, zusammengefasst in Kapsenberg, 2003) oder auf die Sekretion von Immunmediatoren, wie IL-12 (Szabo *et al.*, 2003) und IL-4 (Glimcher *and* Murphy, 2000).

Th1 und Th2 polarisierte Lymphozyten sind nicht die einzigen Subpopulationen des CD4 T-Zellpools. Regulatorische T-Zellen (Treg) wurden schon in 1.1.1 vorgestellt. Solche Zellen entstehen genauso wie naive CD4 T-Zellen im Thymus (Watanabe *et al.*, 2005). Treg unterscheiden sich von diesen phänotypisch, durch die konstitutive Expression der IL-2 Rezeptor  $\alpha$  Kette (CD25), von CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) und von GITR (*glucocorticoid-induced tumor-necrosis factor-receptor related protein*), und genotypisch, durch die Expression des Transkriptionsfaktors FOXP3 (*forkhead box P3*) (Fontenot *et al.*, 2003; Shevach, 2002; Shimizu *et al.*, 2002; Read *et al.*, 2000). Durch Zell-Zell Kontakte oder durch Sekretion immunsupprimierender Zytokine, wie TGF- $\beta$  (Green *et al.*, 2003) und IL-10 (Annacker *et al.*, 2001), können Treg inflammatorische Symptomatik *in vivo* inhibieren und T-Zellproliferation *in vivo* und *in vitro* kontrollieren (Sakaguchi, 2004). Treg nehmen eine spezielle Rolle in der Kontrolle der angeborenen und adaptiven Immunität ein (Maloy *et al.*, 2003).

Suppressorische CD4 T-Zellen mit ähnlichen Effektorfunktionen wie die regulatorischen T-Zellen können auch in der Peripherie entstehen. Solche als Th3 (MacDonald, 1999) oder Tr1 (Levings *and* Roncarolo, 2000) bekannte Zellen üben ihre suppressorischen Aktivitäten über die Sekretion von TGF- $\beta$  und IL-10 entsprechend aus (Apostolou *and* von Boehmer, 2004).

Die Existenz einer weiteren CD4 Helfer T-Zellpopulation konnte im letzten Jahr nachgewiesen werden. Es handelt sich hierbei um Th17-Zellen, die diese Bezeichnung ihrer IL-17 Produktion nach Aktivierung verdanken (Park *et al.*, 2005). Th17-Zellen repräsentieren eine eigene Hauptpopulation, da sie sich nicht aus Th0 Vorläuferzellen differenzieren und ihr Zytokinprofil weder an das Th1 noch an das Th2 Muster erinnert (Harrington *et al.*, 2005).

Die Th17 Effektorfunktionen sind größtenteils noch unbekannt. Nach ihrer Involvierung in inflammatorischen Krankheiten, wie rheumatoide Arthritis, Asthma und systemischer lupus erythematosus zu beurteilen (Dong, 2006), könnten Th17-Zellen als Inflammationsregulatoren agieren (Langrish *et al.*, 2005).

#### 1.1.4 Eigenschaften bewaffneter Effektorzellen

Die Effektorfunktionen von T-Zellen werden durch ein breites Spektrum an Effektormolekülen vermittelt. Dabei kann zwischen löslichen Zytotoxinen bzw. Zytokinen und membranverankerten Liganden unterschieden werden. Die löslichen Effektormoleküle demonstrieren kurze Halbwertszeiten und sind nur auf kurze Distanz wirksam. Sie haben pleiotrope Effekte auf Proliferation, Differenzierung und funktionelle Aktivierung von Immun- und hämatopoietischen Zellen (Moore, 1991).

zytotoxische CD8 T-Zellen können nach Aktivierung Perforin, Granzyme, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  freisetzen und Fas Ligand exprimieren. Th1-Zellen produzieren nach antigener Stimulation IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und GM-CSF und regulieren die Fas und CD40 Liganden hoch. Aktivierte Th2-Zellen sezernieren IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 und GM-CSF und können ebenso den CD40 Liganden auf der Zelloberfläche exprimieren. Im Folgenden werden die Funktionen der wichtigsten Zytotoxine und Zytokine besprochen.

##### 1.1.4.1 Proinflammatorische Zytokine

###### GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

GM-CSF wurde ursprünglich als ein Wachstumsfaktor, der die *in vitro* Kolonienformation von Granulozyten- und Makrophagenvorläuferzellen unterstütze. Es fördert auch die *in vivo* Differenzierung von dendritischen Zellen aus Knochenmarkvorläufern. *In vitro* können Dendriten aus CD34<sup>+</sup> Vorläufern des Knochenmarks bzw. aus CD14<sup>+</sup> Monozyten des Blutes in GM-CSF und IL-4 substituiertem Medium entstehen (Sallusto *and* Lanzavecchia, 1994). GM-CSF wird von verschiedenen Zellen produziert, unter anderem aktivierten T-Zellen, B-Zellen, Endothelzellen und Fibroblasten, als Antwort auf andere Zytokine oder Immun- bzw. inflammatorische Stimuli (Hamilton *and* Anderson, 2004). GM-CSF ist eines der wenigen Zytokine, die ihre Wirkung auch auf längere Distanzen ausüben können.

### IFN- $\alpha$ (Interferon- $\alpha$ )

Die verschiedenen Subtypen des IFN- $\alpha$  und das IFN- $\beta$  Protein gehören zur Typ I Interferonfamilie und machen, zusammen mit dem verwandten jedoch unterschiedlichen IFN- $\gamma$  der Typ II Familie, die wichtigste Zytokinklasse aus (Theofilopoulos *et al.*, 2005). IFN- $\alpha$  hat antivirale und immunmodulatorische Wirkung auf Zielzellen. Es kann die IFN- $\gamma$  Produktion von aktivierten T-Zellen induzieren und das Th1 Profil aufrechterhalten (Montoya *et al.*, 2002; Brinkmann *et al.*, 1993). IFN- $\alpha$  ist ein negativer Regulator der IL-12 Expression (Biron, 2001), fördert die IL-15 Sekretion von dendritischen Zellen und beeinflusst somit auch die Homöostase von Gedächtnis T-Zellen (Zhang *et al.*, 1998). IFN- $\alpha$  kann nahezu von allen Zellen nach viraler und bakterieller Infektion produziert werden. Die Hauptproduktionsstätte von IFN- $\alpha$  sind die plasmazytoiden dendritischen Zellen (Coccia *et al.*, 2004).

### IFN- $\gamma$ (Interferon- $\gamma$ )

IFN- $\gamma$  wird von aktivierten Th1-Zellen, zytotoxischen CD8 T-Zellen und NK-Zellen gebildet und weist ein umfangreiches biologisches Wirkungsspektrum auf (Boehm *et al.*, 1997). Der IFN- $\gamma$  Rezeptor wird auf beinahe allen Körperzellen exprimiert (Farrar *and* Schreiber, 1993). IFN- $\gamma$  hat antivirale und antiparasitäre Eigenschaften (Guidotti *and* Chisari, 2000) und kann sich inhibitorisch auf die Proliferation von Endothelzellen, hämatopoietischen Vorläuferzellen und Tumorzellen wirken (Fransen *et al.*, 1986). Es stimuliert die Aktivierung von Makrophagen und Fibroblasten und erhöht deren Aktivität (Murray *et al.*, 1985); die Zytokinproduktion von Th2-Zellen wird inhibiert (Romagnani, 1999). IFN- $\gamma$  induziert Zelloberflächenmoleküle und -rezeptoren, wie zum Beispiel IL-2 Rezeptor und MHC Moleküle auf T-Zellen, Fibroblasten und Tumorzellen (Mire-Sluis *and* Thorpe, 1998; Basham *et al.*, 1982). IFN- $\gamma$  ist inhibierend auf die tumorinduzierte Angiogenese (Qin *and* Blankenstein, 2000).

### IL-2 (Interleukin-2)

Naive T-Zellen können mehrere Jahre lang überleben ohne sich zu teilen. Nach Aktivierung mit Antigenen oder Mitogenen müssen die T-Zellen den Zellzyklus wiedereintreten, sich teilen und zu bewaffneten Effektorzellen differenzieren (Smith, 1988). Proliferation und Differenzierung werden von IL-2 gesteuert, das von der aktivierten T-Zelle autokrin produziert wird (Cousens *et al.*, 1995).

### IL-12 (Interleukin-12)

IL-12 ist ein 70kDa Glykoprotein Heterodimer, das aus zwei Untereinheiten besteht (p35 und p40; Kobayashi *et al.*, 1989). Es wird von allen antigenpräsentierenden Zellen freigesetzt und hat multiple Effekte auf T- und NK-Zellen (Trinchieri *et al.*, 1992). Dazu gehören die Initiation der IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  Produktion und die Induktion der Effektorfunktionen dieser Zellen (D'Andrea *et al.*, 1992). IL-12 besitzt komitogene Eigenschaften, die die Proliferation naiver und aktivierter T-Zellen beeinflussen (zusammengefasst in Langrish *et al.*, 2004). IL-12 ist

ein zentraler Regulator der Th1 Immunität, weil es sich gegenüber IL-4 und IL-10 antagonistisch wirkt (Trinchieri, 2003).

#### Perforin und Granzyme

Aktivierte CD8 T-Zellen können durch die Freisetzung von lytischen Granula mit Perforin und Granzyme die Apoptose der Zielzellen induzieren. Perforin polymerisiert, um an der Zieloberfläche transmembrane Poren bilden zu können (Kagi *et al.*, 1994). Granzyme, eine Gruppe von Serinproteasen, kann durch die Poren ins Zytoplasma gelangen und die Kaspasekaskade einleiten (Barry *et al.*, 2000).

### **1.1.4.2 Immunregulatorische Zytokine**

#### IL-4 (Interleukin-4)

IL-4 ist ein pleiotropes Zytokin mit verschiedenen immunmodulierenden Funktionen auf mehrere Zellen, wie zum Beispiel T-Zellen, Monozyten, Endothelzellen und Fibroblasten. Es wird von Th2 T-Zellen, Mastzellen und Basophilen sezerniert (Stetson *et al.*, 2004; Banchereau *et al.*, 1994). IL-4 ist ein wichtiger Regulator der B-Zell vermittelten Immunantwort, indem es ihre Aktivierung, Proliferation und die IgG4 und IgE Produktion induziert (Romagnani, 1999). IL-4 bekräftigt seine eigene Expression auf autokriner und parakriner Weise: es unterstützt die Th2 Polarisierung und rekrutiert zusätzliche T-Zellen in dieses Profil durch STAT6-vermittelte Gata3 Hochregulation, die zur negativen Modulation der Th1 Differenzierung führt (Ansel *et al.*, 2006). IL-4 inhibiert die Makrophagenaktivierung und erhöht das Mastzellwachstum.

#### IL-10 (Interleukin-10)

IL-10 wurde ursprünglich als eine Zytokin beschrieben, das von Th2-Zellen produziert wird (Fiorentino *et al.*, 1989). Dieses suppressive Molekül kann auch von Makrophagen und dendritischen Zellen (Moore *et al.*, 2001), sowie regulatorischen T-Zellen (O'Garra *et al.*, 2004) freigesetzt werden. IL-10 unterdrückt die Th1 polarisierte Zytokinproduktion (Fiorentino *et al.*, 1989). Es inhibiert die Expression von IL-12, MHC Klasse II und kostimulatorischen Molekülen, wodurch Makrophagen und dendritische Zellen nicht aktiviert werden können (Trinchieri, 2001; Fiorentino *et al.*, 1991a; Fiorentino *et al.*, 1991b). Makrophagen töten in Anwesenheit von IL-10 intrazelluläre Mikroorganismen nicht (Gazzinelli *et al.*, 1992) und es findet keine Dendritendifferenzierung aus Monozyten statt (Buelens *et al.*, 1997). Nur unter bestimmten Bedingungen können Makrophagen und dendritische Zellen IL-10 freisetzen, wie nach Ligation der Fc Rezeptoren (Gerber *and* Mosser, 2001) oder Stimulation mit bakteriellen Produkten (McGuirk *et al.*, 2002). IL-10 reguliert Th2 und allergische Reaktionen (Moore *et al.*, 2001; Grunig *et al.*, 1997).

### IL-17 (Interleukin-17)

IL-17 wird von aktivierten T-Zellen und Gedächtnis T-Zellen produziert (Aggarwal *and* Gurney, 2002). Es scheint ein Mediator zwischen dem Immun- und dem hämatopoietischen System zu sein (Shen *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 1995) und besitzt proinflammatorische, sowie regulatorische Eigenschaften (Kolls *and* Linden, 2004). IL-17 scheint nicht die Funktion von T-Zellen zu regulieren, sondern die von Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen. Eine Behandlung dieser Zellen mit IL-17 führt zur Expression von IL-6, G-CSF, verschiedenen Chemokinen und Matrixmetalloproteasen (zusammengefasst in Dong, 2006).

### TGF- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ )

TGF- $\beta$  ist ein sehr wirksames regulatorisches Zytokin mit diversen Effekten auf hämatopoietischen Zellen. Es kann von nahezu allen Zellen produziert werden. In Säugetieren kommen drei homologe TGF- $\beta$  Isoformen, nämlich  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 3, vor. Alle drei haben ähnliche Funktionen *in vitro*. TGF- $\beta$ 1 stellt die überwiegende Isoform im Menschen dar (Govinden *and* Bhoola, 2003). Die entscheidende Funktion von TGF- $\beta$  im Immunsystem ist die Toleranzerhaltung über die Regulation der Lymphozytenproliferation, -differenzierung und -überleben (Li *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2006). TGF- $\beta$  kann auch andere biologische Prozesse, wie Entwicklung, Karzinogenese, Fibrose und Wundheilung, steuern (Blobe *et al.*, 2000). Den größten Einfluss übt TGF- $\beta$  jedoch auf T-Zellen (Gorelik *and* Flavell, 2000). Die Proliferation naiver T-Zellen wird über die Supprimierung der IL-2 Transkription beeinträchtigt (Kehrl *et al.*, 1986) und TGF- $\beta$  reguliert die Effektordifferenzierung (Gorelik *and* Flavell, 2002). CD8 T-Zellen können sich nicht zu zytotoxischen T-Lymphozyten entwickeln (Thomas *and* Massague, 2005; Ranges *et al.*, 1987). Die Expression von Perforin (Smyth *et al.*, 1991) und Fas Ligand (Genestier *et al.*, 1999) wird inhibiert. Bei CD4 T-Zellen wird die Akquisition von T-Helfer Funktionen generell unterdrückt (Gorelik *and* Flavell, 2002). Die regulatorische T-Zellpopulation kann in Anwesenheit von TGF- $\beta$ 1 expandieren (Peng *et al.*, 2004). TGF- $\beta$  inhibiert die Entwicklung von Immunsymptomatik gegenüber eigenen oder nicht gesundheitsgefährdenden Antigenen ohne dabei die Immunreaktionen gegen Pathogene zu beeinträchtigen (Li *et al.*, 2006).

#### **1.1.5 Immunologisches T-Zellgedächtnis**

Das immunologische Gedächtnis ist eine zentrale Komponente des Immunsystems der Vertebraten. Es beinhaltet die Fähigkeit sich an bereits begegnete Pathogene zu „erinnern“ und somit schneller nach einer weiteren Exposition zu reagieren. Das immunologische Gedächtnis erzeugt langlebigen Schutz und verlängert die Lebensdauer.

Die Langlebigkeit von Gedächtnis T-Zellen (Combadiere *et al.*, 2004; Hammarlund *et al.*, 2003) basiert darauf, dass diese Zellen sich öfter teilen als naive (Sprent, 2003; McLean *and*

Michie, 1995). Diese proliferative Erneuerung (*turnover*) ist unabhängig von Antigen (Murali-Krishna *et al.*, 1999; Swain *et al.*, 1999) und basiert auf homöostatische Regulation. Für diese sind zwei Zytokine von essentieller Bedeutung: IL-7, das die Proliferation von Gedächtnis CD4 T-Zellen nach Lymphopenie induziert (Seddon *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2002), und IL-15, das zum Überleben und turnover von Gedächtnis CD8 T-Zellen wichtig ist (Becker *et al.*, 2002; Judge *et al.*, 2002).

Die sehr erfolgreiche Anwendung von Vakzinen beweist eindeutig, dass immunologisches Gedächtnis wirksamen Schutz nach wiederholter Begegnung mit Antigenen bietet. Es gibt zwei Möglichkeiten, wie dies erreicht wird. Das immunologische Gedächtnis könnte eine erneute Infektion verhindern (Antia *et al.*, 2005) und das Ausmaß der Infektion, das heißt das Wachstum der Pathogenpopulation und die Dauer der Infektion, könnte kontrolliert werden (Davenport *et al.*, 2004; Zinkernagel, 2002; Wodarz *et al.*, 2000). Diese Regulation hängt damit zusammen, dass Gedächtniszellen sich in vielerlei funktioneller Hinsicht von naiven Zellen unterscheiden: i) Ansprechbarkeit auf geringere Antigenkonzentrationen, ii) schnellere Proliferation nach Antigenstimulation, iii) schnellere Exhibierung ihrer Effektorfunktionen, iv) Fähigkeit, ein größeres Spektrum an Zytokinen auszuschütten und v) Expression von Adhäsionsmolekülen zum Eintritt in periphere Gewebe (Jameson, 2002; Westermann *et al.*, 2001; Goldrath and Bevan, 1999; Zinkernagel *et al.*, 1996). Gedächtnis T-Zellen sind weniger abhängig von Kostimulation durch antigenpräsentierende Zellen (Tuma and Pamer, 2002; Lanzavecchia and Sallusto, 2000; Veiga-Fernandes *et al.*, 2000), ähneln jedoch naiven T-Zellen hinsichtlich einer langsamen Entwicklung zytolytischer Funktionen (Bachmann *et al.*, 1999).

Phänotypisch lassen sich naive von Gedächtnis T-Zellen unterscheiden. Die verschiedenen Isoformen der Tyrosinphosphatase CD45 werden unterschiedlich exprimiert: die niedrigmolekulare Isoform CD45RO ist auf Gedächtnis präsent, die höher molekulare CD45RA Isoform kommt auf naiven T-Zellen vor (Michie *et al.*, 1992). Die differenzielle Expression des Chemokinrezeptors CCR7 und des *homing* Rezeptors L-Selektin (CD62-L) lassen phänotypische, funktionelle und anatomische Unterteilung der heterogenen Gedächtniszellpopulation zu (Sallusto *et al.*, 1999). Naive T-Zellen und zentrale Gedächtnis T-Zellen exprimieren beide für die Lymphknotenmigration notwendige Rezeptoren und halten sich in Lymphknoten, Blut und Milz auf (Reinhardt *et al.*, 2001). Effektorgedächtnis T-Zellen fehlt diese Expression und residieren als einzige T-Lymphozytenpopulation nicht lymphatisches Gewebe, wie Darm, Lunge und Leber (Masopust *et al.*, 2001). Die Gedächtnis T-Zellpopulationen unterscheiden sich auch in ihren Funktionen voneinander. Zentrale Gedächtnis T-Zellen können große Mengen an IL-2 nach Aktivierung produzieren, sie sind jedoch nicht in der Lage, sofortige Effektorantworten, wie IFN- $\gamma$ - oder Perforinfreisetzung, zu

generieren. Effektorgedächtnis T-Zellen demonstrieren geringe IL-2 Produktion und sofortige Effektorfunktion (Sallusto *et al.*, 1999).

## 1.2 Tumorimmunologie

Die Untersuchung der Immunogenität von Tumoren und Metastasen, die Etablierung von tumorgerichteten Immunantworten, sowie die Entwicklung von immuntherapeutischen Ansätzen zur Tumorthherapie sind die Forschungsgebiete der Tumorimmunologie. Tumorimmunologische Untersuchungen gehören allgemein zur Autoimmunforschung, da Tumor-Immunantworten gegen Selbstantigene gerichtet sind.

Entartete Tumorzellen weisen eine Vielzahl von Proteinen auf, die in ihrer Struktur stark verändert oder überexprimiert sind und in Form von Peptiden auf MHC Molekülen präsentiert werden (Boon *et al.*, 1997). Solche tumorassoziierte Antigene entstehen aus gewebe-spezifischen Differenzierungsantigenen (Tyrosinase), Krebs/Testis Antigenen (MAGE-3), intronischen Sequenzen, alternativen *open reading frames*, Punktmutationen (Caspase-8), posttranskriptionalen Modifikationen (MUC-1), aberrierender Prozessierung (Her-2/neu; EGFR) oder Überexpression (Heparanase; p53) (Rosenberg, 2001). Ein einzelnes Tumorantigen enthält mehrere Epitope, die auf verschiedenen MHC Moleküle präsentiert werden können. Die meisten der bekannten immundominanten Epitopen sind auf MHC Klasse I Moleküle beschränkt.

Anders als eine Infektionskrankheit, entwickelt eine Tumorerkrankung mehrere aktive Tarn- und Fluchtmechanismen (*tumor escape* Mechanismen), die eine Immunantwort limitieren können (Khong *and* Restifo, 2002; Rosenberg, 2001; Marincola *et al.*, 2000). Bei der Mehrheit der an der Oberfläche präsentierten Tumorantigene handelt es sich um körpereigene Selbstantigene, die der zentralen Toleranz unterliegen. Tumorzellen können in T-Zellen Toleranz induzieren: durch geringe Expression von kostimulatorischen Molekülen auf Tumorzellen, aktive Herunterregulation der T-Zellrezeptor vermittelten Signaltransduktion oder selektiven Expressionsverlust der MHC Moleküle. Eine allgemeine Immunsuppression, über die TGF- $\beta$  Produktion der Tumorzellen, oder die direkte Auslösung der Apoptose von T-Lymphozyten durch Malignome sind möglich.

Regulatorische T-Zellen spielen bei der Tumorimmunität eine wichtige Rolle (Shevach, 2004; Sakaguchi, 2000). Diese bereits in 1.1.1 als Mediatoren der peripheren Toleranz vorgestellte Zellen kommen zahlreich in Tumorgewebe vor (Ormandy *et al.*, 2005; Liyanage *et al.*, 2002; Woo *et al.*, 2001) und ihre Präsenz korreliert mit einer schlechteren Prognose (Curiel *et al.*, 2004). Treg können die Immunfunktion von selbstantigenspezifischen, tumorgerichteten T-Zellen supprimieren und die Antitumor Immunität *in situ* blockieren (Sakaguchi, 2005; Dudley *and* Rosenberg, 2003).

Trotz *tumor escape* Mechanismen und der Tatsache, dass es sich bei den Tumorantigenen um Selbstantigene handelt, konnte spontane Immunreaktivität gegen verschiedene Krebsarten in unserer Gruppe beobachtet werden (Muller-Berghaus *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2005; Schmitz-Winnenthal *et al.*, 2005; Feuerer *et al.*, 2001). Die Antitumor Immunantworten konnten in Blut- und Knochenmarklymphozyten von Patienten mit soliden Malignomen oder hämatologischen Tumoren detektiert werden. Die Generierung tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellantworten konnte auch von anderen Forschungsgruppen nachgewiesen werden (Hansson *et al.*, 2003; Dhodapkar *et al.*, 2002; Peiper *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2001), allerdings wurden nur CD8 T-Zellpopulationen untersucht. Es ist bisher weitgehend unklar, ob auch CD4 T-Zellen an Tumor-Immunreaktionen beteiligt sind. Verschiedene Mausmodelle weisen darauf hin, dass die Helfer T-Zellen für die Induktion protektiver Tumor-Immunantworten erforderlich sind (Wang, 2003; Yu *et al.*, 2003; Schirmacher *et al.*, 1993): sie können wesentlich zu einer effizienten Aktivierung von zytotoxischen Immunantworten beitragen, indem sie über Interaktionen von CD40L mit CD40 die kostimulatorische Kapazität der beteiligten antigenpräsentierenden Zellen erhöhen (Cella *et al.*, 1996; Kiener *et al.*, 1995; Peguet-Navarro *et al.*, 1995) oder indem sie das Zytokinmilieu verändern (Yu and Fu, 2006).

Der Nachweis von tumorspezifischen T-Zellen ermöglicht nun den Entwurf von Immuntherapieansätzen. Bei der Etablierung einer T-Zell basierten Immuntherapie sollten sämtliche tumorreaktive T-Zellpopulationen involviert sein. Die Lymphozyten können *ex vivo* stimuliert, expandiert oder gar modifiziert werden und den Patienten adoptiv transferiert werden (Dudley *et al.*, 2002; Yee *et al.*, 2002). Andere immuntherapeutische Vakzinierungen basieren auf mit NDV (*Newcastle disease virus*) infizierten Tumorzellen, wodurch ihre Immunogenität verstärkt wird (Karcher *et al.*, 2004). In manchen Ansätzen werden veränderte Tumorzellen appliziert, die Zytokine ausschütten oder kostimulatorische Moleküle exprimieren (Boon *et al.*, 1997). Tumorzellen können mit antigenpräsentierenden Zellen fusionieren (Gong *et al.*, 2000) oder es werden Zell- oder Zellmembranlysate und *heat shock* Proteine verwendet (Rosenberg, 2001). Bei einigen Immuntherapien wird mit gereinigten Tumorantigenen, synthetischen Peptiden (Rosenberg *et al.*, 1999; Parkhurst *et al.*, 1996), Plasmid DNA (Restifo *et al.*, 2000), rekombinanten Viren (Adenovirus; Rosenberg *et al.*, 1998) oder Bakterien (*Bacille Calmette-Guérin* und *Listeria monocytogenes*) (Coley, 1991) immunisiert. Heutzutage wird auch die systemische Gabe unspezifisch wirkender Zytokine, wie IFN- $\alpha$  (Kirkwood and Tarhini, 2003), oder spezifischer monoklonaler Antikörper, wie Trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>) gegen den Her-2/neu Rezeptor (Hortobagyi and Perez, 2001), bei der Tumorbehandlung einbezogen.

Klinisch relevante Ergebnisse lieferten bisher Immuntherapien mit peptidbeladenen dendritischen Zellen, die von zytotoxischen Lymphozyten bei Patienten mit malignem

Melanom erkannt werden (Nestle *et al.*, 1998), der adoptive Transfer von tumorspezifischen Blut- oder tumorinfiltrierender Lymphozyten beim malignen Melanom (Dudley *et al.*, 2002; Yee *et al.*, 2002), Vakzinierungen mit NDV-modifizierten Zellen für Patienten mit Kopf-Hals- oder Gehirntumoren (Karcher *et al.*, 2004; Steiner *et al.*, 2004) und die Antikörpertherapie.

### 1.3 Kopf-Hals-Tumore

Unter dem Begriff Kopf-Hals-Tumore fasst man eine Vielzahl bösartiger Tumore im Bereich des Mund-Nasen-Rachenbereiches, sowie des Halses zusammen. Diese Tumorart steht an sechster Stelle der häufigsten Tumorerkrankungen. Kopf-Hals-Tumore machen in Europa und den USA ca. fünf Prozent aller Krebserkrankungen bei den Männern und ca. ein bis zwei Prozent bei den Frauen aus; in China und Indien sind es 50%. Es erkranken vorwiegend ältere Personen ab ca. 60 Jahre. In den letzten Jahrzehnten treten Kopf-Hals-Tumore jedoch auch zunehmend bei Jüngeren auf.

Bei den bösartigen Neoplasmen handelt es sich in der Mehrzahl um Plattenepithelkarzinome unterschiedlicher Differenzierung. Anatomisch werden Kopf-Hals-Tumore eingeteilt in (Roche Lexikon der Medizin, 1999): i) Tumoren der Lippen und der Mundhöhle, ii) Nasopharynxkarzinomen, iii) Oropharynxkarzinomen, überwiegend Tonsillen- und Zungenkarzinomen, iv) Hypopharynxkarzinomen; v) Larynxkarzinomen Tumoren der Nasennebenhöhlen und der inneren Nase, vii) Speicheldrüsentumoren, viii) Ohrtumoren, ix) CUP (*cancer unknown primary*). Die einzelnen Formen der Kopf-Hals-Tumoren unterscheiden sich hinsichtlich der Häufigkeit ihres Auftretens zum Teil erheblich. Kopf-Hals-Tumore metastasieren bevorzugt über die Lymphwege in die Halslymphknoten. Fernmetastasen sind selten.

Die Ursachen für die Entstehung der Kopf-Hals-Tumore sind im Einzelnen noch nicht geklärt. Bestimmten Umweltfaktoren spielen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung dieser Krebsarten. Dazu gehört in erster Linie der Konsum von Tabak. Je nach Art und Weise des Tabakkonsums werden verschiedene Tumore begünstigt. Der schädigende Einfluss des Tabaks wird durch übermäßigen Alkoholkonsum noch erheblich verstärkt. Eine mangelhafte Mundhygiene unterstützt die Krebsentstehung. Weitere ätiologische und Risikofaktoren sind: genetisch bedingter heller Hauttyp, UV-Exposition und andere aktinische Belastung zum Beispiel durch Röntgen- und Gammastrahlen, chronisch degenerative und entzündliche Hautveränderungen, chemische Karzinogene (unter anderem Steinkohlenteer, Teerdestillate aus Tabak, Ruß), Immunsuppression bzw. Immunschwäche (zum Beispiel bei AIDS) und humane Papillomviren.

Für die Behandlung der Kopf-Hals-Tumore stehen die Operation, die Strahlen- und/oder die Chemotherapie zur Verfügung. Therapieerfolge können aber in den wenigsten Fällen

nachgewiesen werden, da diese Malignome als sehr aggressiv eingestuft werden. So liegt die mittlere 5-Jahres-Überlebenszeit von Oropharynxkarzinomen je nach Stadium lediglich zwischen 15-60%. Aus diesem Grund wurde in den letzten Jahren intensiv an der Entwicklung von Gen- und Immuntherapien gearbeitet (aus DeVita, 2005).

## 1.4 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der funktionalen Beschreibung tumorspezifischer Gedächtnis T-Zellen und der phänotypischen Charakterisierung tumorinfiltrierender Lymphozyten bei Kopf-Hals-Tumorpatienten, sowie der Bestimmung des Zytokinmilieus in solchen Malignomen. Die analysierten Daten sollten mit klinischen Parametern korreliert werden. Die Untersuchungen umfassten folgende Punkte:

- I. Vorerst sollte das Vorkommen tumorreaktiver Gedächtnis T-Zellen bei primär operierten Kopf-Hals-Tumorpatienten untersucht werden. Um die Lokalisation der Immunantwort zu detektieren, wurden Zellen des peripheren Blutes und des tumordrainierenden, nicht metastasierten Lymphknotens verwendet. Dabei sollten sowohl CD4 als auch CD8 T-Zellpopulationen, sowie Th1 und Th2 polarisierte Immunreaktivitäten betrachtet werden.
- II. Als Nächstes sollte das systemische und lokale Zytokinmilieu immunstimulierender und -supprimierender Zytokine in Blutplasma und Tumorgewebe von Kopf-Hals-Tumorpatienten erfasst werden und mit dem Vorkommen tumorreaktiver Gedächtnis T-Zellen korreliert werden.
- III. Schließlich sollte das Vorkommen tumorinfiltrierender Lymphozyten mit Hilfe der Erkenntnisse aus den Punkten i) und ii) korreliert werden.

Diese Arbeit wurde durch die Bereitstellung von klinischem Material primär operierter Kopf-Hals-Tumorpatienten durch die Kopfklinik und das molekularbiologische Labor der Universität Heidelberg ermöglicht.

## 2. Material

### 2.1 Geräte

Brutschrank	Nuaire, Plymouth, USA
Dispergiergerät Ultra-Turrax®	IKA-Werke, Staufen, D
ELISA Meßgerät	Labsystems, Helsinki, FI
ELISpot Mikroskop Axioplan 2 imaging	Zeiss, Oberkochen, D
Eppendorff Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, D
FACScan	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Gamma-Counter	Wallac, Turku, FI
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Ochsenhausen, D
Gefrierschrank -70°C Bio Freeze®	Forma Scientific, USA
Glasgeräte	Schott, Mainz, D
Glaspipetten	Hirschmann, Eberstadt, D
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen, D
Laborzentrifuge Minifuge	Heraeus, Hanau, D
Magnetheizrührer	Heidolph, Heidelberg, D
Mikroskop Diavert	Leitz, Wetzlar, D
Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, D
Milli-Q-Wasserreinigungssystem	Millipore, Eschborn, D
MPC-L ( <i>magnet particle concentrator-large</i> ; für 6x 15ml Röhrchen)	Dynal, Hamburg, D
Multikanalpipette (8 Kanäle)	Rainin, Leiden, NL
Neubauer Zählkammer (0,100 mm Tiefe)	Brand, Wertheim, D
OctoMACS® Separationseinheit	Miltenyi Biotec, Hamburg, D
pH Meßgerät	WTW, Weilheim i. OB, D
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss, Göttingen, D
Pipetten 2-1000µl automatisch	Gilson, Bad Camberg, D
Pipettierhilfe accu-jet	Brand, Wertheim, D
Schüttler HS 501 digital	IKA Labortechnik, Staufen, D
Spektrophotometer Titertek Multiscan Plus MK II	Laborsystems, Helsinki, FI
Sterilwerkbank SterilGARD Hood	Baker, Sanford, Maine, USA
Vortex Reax 2000	Heidolph, Schwabach, D
Waage	Sartorius, Göttingen, D

Wasserbad

Julabo, Seelbach, D

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Combitips	Eppendorf, Hamburg, D
Counter Röhrchen	Greiner, Frickenhausen, D
Deckgläser	Langenbrick, Emmendingen, D
Einfrierröhrchen	Corning B.V., Schiphol-Rijk, NL
Einmalkanülen 20G, 25G, 27G	BD Biosciences, Heidelberg, D
Einmalkanülen 1,20x100 m/m	TSK-SUPRA, Geislingen, D
Einmalpipetten	Renner, Dannstadt, D
Einmalskalpelle	PfM Ag, Köln, D
Einmalspritzen 1ml	Henke Sass Wolf, Tutlingen, D
Einmalspritzen 10-50ml	BD Discardit II, Heidelberg, D
ELISpot Klebefolien ( <i>tape multiscreen harvester plate</i> )	Millipore, Eschborn, D
Eppendorf-Röhrchen 0,5; 1,5 und 2ml	Eppendorf, Köln, D
FACS Röhrchen	Greiner, Frickenhausen, D
Mikroskopgläser	Langenbrick, Emmendingen, D
Parafilm	American National Can, USA
Pipetten 2, 10, 200, 1000µl	Gilson, Bad Camberg, D
Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg, D
Röhrchen mit Filterscheibe Leucosep® 50ml	Greiner, Frickenhausen, D
Rundboden Röhrchen 5ml	Greiner, Frickenhausen, D
Separationssäulen MS <sup>+</sup>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Sterilfilter 0,22µm	Millipore, Molsheim, F
Zellkulturflaschen 25, 75 und 150cm <sup>3</sup>	TPP, Trasadingen, CH
Zellkulturschalen 6x15mm und 100x20mm	TPP, Trasadingen, CH
Zellkulturschalen 145x20mm	Greiner, Frickenhausen, D
Zellschaber	TPP, Trasadingen, CH
Zellsieb 40µm	Falcon BD, Heidelberg, D
Zentrifugenröhrchen 15 und 50ml	Biochrom, Berlin, D
96-Loch Rundbodenplatten (zellkulturbehandelt)	Biochrom, Berlin, D
96-Loch-Platte für ELISpot (0,45µm Zellulose-Ester Membran)	Millipore, Molsheim, D

## 2.3 Chemikalien

Aceton	Riedl-de Haën, Seelze, D
AEC-Chromogen	Merck, Darmstadt, D
Antikörperverdünnungspuffer	Dako, Hamburg, D
AP Konjugat-Substrat-Kit	Bio-Rad, München, D
BCIP/NBT Substrat	Dako, Hamburg, D
Biocoll Trennlösung	Biochrom, Berlin, D
Bio-Rad Proteinassay Lösung	Bio-Rad, München, D
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt, D
EDTA	Biochrom, Berlin, D
Endobulin (rekombinantes humanes IgG)	Baxter, Unterschleißheim, D
Essigsäure, 100%	Merck, Darmstadt, D
Essigsäureethylester	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Ethanol, p.a.	Riedl-de Haën, Seelze, D
Formaldehyd, 37 %	Merck, Darmstadt, D
Harnstoff	Fluka, Buchs, CH
Heparin-Natrium	B.Braun, Melsungen, D
Isopropanol	Riedl-de Haën, Seelze, D
Kaiser's Glycerolgelatine	Merck, Darmstadt, D
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat, $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Merck, Darmstadt, D
n-Hexan	Merck, Darmstadt, D
Natriumazid	Merck, Darmstadt, D
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt, D
Natrimchromat, $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$	Perkin-Elmer, Jügesheim, D
Natriumchloridpulver	J.T. Baker, Deventer, NL
Natriumdihydrogenphosphat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, D
Natronlauge, 10 N	Riedl-de Haën, Seelze, D
MEM-nichtessentielle Aminosäurelösung (ne-AS)	Sigma, Deisenhofen, D
Paraffinwachs	Vogel, Gießen, D
PBS-Pulver	Invitrogen, Karlsruhe, D
Peroxidase	Dako, Hamburg, D
Rinderserumalbumin	Sigma, Deisenhofen, D
Salzsäure 1N	Merck, Darmstadt, D

Schwefelsäure 95-97%	Merck, Darmstadt, D
TMB-Microwell Peroxidase Substrat System	KPL, Maryland, USA
Trypanblaupulver	Serva, Heidelberg, D
Trypsin-EDTA	Biochrom, Berlin, D
Tween 20	Gerbu Biotechnik, Gaiberg, D
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt, D

## 2.4 Medien und Mediensupplemente

DMEM/F12-Pulver	Sigma Deisenhofen, D
DMEM <i>high glucose</i> (Fertiglösung)	PAA, Pasching, A
Erythrocin	Abott, Wiesbaden, D
Fötales Kälberserum	Biochrom, Berlin, D
Gentamycin	Biochrom, Berlin, D
Glutamin	Biochrom, Berlin, D
HEPES	Biochrom, Berlin, D
Humanes AB Serum	Sigma, Deisenhofen, D
Penicillin/Streptomycin	Pan™ Biotech, Aidenbach, D
RPMI (Fertiglösung)	PAA, Pasching, A
RPMI 1640-Pulver	Invitrogen, Karlsruhe, D
Vancomycin	Abott, Wiesbaden, D
X-VIVO 20, Serum-frei	BioWhittaker, Vervier, B
Zienam	MSD Sharp & Dohme, Haar, D

## 2.5 Zytokine

Rekombinantes GM-CSF	ESSEX PHARMA, München, D
Rekombinantes humanes IL-2	PromoCell, Heidelberg, D
Rekombinantes humanes IL-4	PromoCell, Heidelberg, D

## 2.6 Dynabeads®

Dynabeads® M-450 CD3	Dynal, Hamburg, D
Dynabeads® M-450 CD19	Dynal, Hamburg, D
Dynabeads® Pan Mouse IgG	Dynal, Hamburg, D

*T-cell negative isolation kit*

Dynal. Hamburg, D

## 2.7 MACS<sup>®</sup> MicroBeads

CD4 MicroBeads

Miltenyi Biotec,  
Bergisch Gladbach, D

CD8 MicroBeads

Miltenyi Biotec,  
Bergisch Gladbach, D

## 2.8 ELISpot Kits

Maus-anti-Human-IFN- $\gamma$

Mabtech, Hamburg, D

Maus-anti-Human-IFN- $\gamma$  -Biotin

Mabtech, Hamburg, D

Maus-anti-Human-Perforin

Mabtech, Hamburg, D

Maus-anti-Human-Perforin -Biotin

Mabtech, Hamburg, D

Maus-anti-Human-IL-4

Mabtech, Hamburg, D

Maus-anti-Human-IL-4-Biotin

Mabtech, Hamburg, D

Maus-anti-Human-IL-10

Mabtech, Hamburg, D

Maus-anti-Human-IL-10-Biotin

Mabtech, Hamburg, D

Streptavidin-AP

Mabtech, Hamburg, D

AP-Farbenentwicklungspuffer

Bio-Rad, München, D

AP-Farbreagenz A

Bio-Rad, München, D

AP-Farbreagenz B

Bio-Rad, München, D

## 2.9 ELISA Kits

Human IFN- $\alpha$  ELISA

PBL, Piscataway, USA

Quantikine<sup>®</sup> Human IL-10 HS Immunoassay

R&D Systems, Wiesbaden, D

Quantikine<sup>®</sup> Human IL-12 HS Immunoassay

R&D Systems, Wiesbaden, D

Quantikine<sup>®</sup> Human IL-17 Immunoassay

R&D Systems, Wiesbaden, D

Quantikine<sup>®</sup> Human TGF- $\beta$ 1 Immunoassay

R&D Systems, Wiesbaden, D

## 2.10 Primäre Tumorzelllinien

Alle primären Kopf-Hals-Tumorzelllinien wurden im molekularbiologischen Labor der Kopfklinik Heidelberg aus Tumorgebilden angesetzt und etabliert.

## 2.11 Etablierte Tumorzelllinien

K562	Myeloide Leukämie, NK-sensitiv (HLA-A2/-)
MCF-7	Mammakarzinomlinie (HLA-A2/-, B18/44, Cw0501/1)
U937	Promonozytäre Leukämie (HLA-A3/31, B18/51, Cw0501/1)

## 2.12 Antikörper

Name	Spezies	Isotyp	Klon	Referenz oder Firma
anti-CD3	Maus	IgG1	PC3/188A	Dako, Hamburg, D
anti-CD4	Maus	IgG1	RPA-74	Invitrogen, Karlsruhe, D
anti-CD8	Maus	IgG1	DK25	Dako, Hamburg, D
anti-CD45RA	Maus	IgG1	4KB5	Dako, Hamburg, D
anti-HLA-A2 (Zellkulturüberstand)	Maus	IgG2b	BB7.2	Dr. Moldenhauer, DKFZ, Heidelberg, D
anti-CD56	Maus	IgG1	C218	Beckman Coulter, Krefeld, D
Ziege-anti-Maus-IgG-FITC				Dianova, Hamburg, D
Ziege-anti-Maus-Peroxidase				Dako, Hamburg, D

## 2.13 Proteine

Gesunde Spenderproteine	Biocat, Heidelberg, D
<i>Staphylococcus</i> Enterotoxin B	Sigma, Deisenhofen, D

## 2.14 Peptide

Name	Aminosäuresequenz	Position	Referenz
EGFR	KLFGTSGQKT	479-488	Abt. Peptidsynthese, DKFZ, Heidelberg, D
EGFR	YLNTVQPTCV	1138-1147	Abt. Peptidsynthese, DKFZ, Heidelberg, D
Heparanase	LLLGPLGPL	16-24	Abt. Peptidsynthese, DKFZ, Heidelberg, D
Heparanase	DLIFGLNAL	183-191	Abt. Peptidsynthese, DKFZ, Heidelberg, D
Her-2/neu	KIFGSLAFL	369-377	Abt. Peptidsynthese, DKFZ, Heidelberg, D
HIV (gag)	SLYNTVATL	77-85	Abt. Peptidsynthese, DKFZ, Heidelberg, D
MAGE-3	FLWGPRALV	271-279	Abt. Peptidsynthese, DKFZ, Heidelberg, D
MUC-1	STAPPAHGV	9-17	Abt. Peptidsynthese, DKFZ, Heidelberg, D
MUC-1	LLLLTVLTV	12-20	Abt. Peptidsynthese, DKFZ, Heidelberg, D
p53	STPPPGTRV	149-157	Abt. Peptidsynthese, DKFZ, Heidelberg, D
p53	LLGRNSFEV	264-272	Abt. Peptidsynthese, DKFZ, Heidelberg, D
RNA Helikase	YLLPAIVHI	168-176	Abt. Peptidsynthese, DKFZ, Heidelberg, D

## 2.15 Zusätzliche Software

*analySIS* Software (Immunhistochemie Software)

Olympus, Hamburg, D

*Flow Jo* (FACScan Software)

Tree Star Inc., San Carlo, USA

*Graph Pad Prism*

GraphPad Software, San Diego, USA

KS ELISpot

Zeiss, Göttingen, D

### 3. Methoden

#### 3.1 Lösungen und Puffer

##### 1xPBS

NaCl	8g
KCl	0,2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	2,85g

in 1l ddH<sub>2</sub>O gelöst, pH 7,2, Lagerung bei 4°C

##### EDTA

20mM EDTA + 1xPBS, Lagerung bei 4°C

##### Trypsin-EDTA

10xTrypsin-EDTA + 1xPBS, Lagerung bei 4°C

##### Trypanblau Färbelösung

Trypanblau	1,28g
NaCl	8,5g

in 1l ddH<sub>2</sub>O gelöst, sterilfiltriert, mit Natriumazid (NaN<sub>3</sub>-Endkonzentration 1%) versetzt; Lagerung bei 4°C

##### ELISpot Beschichtungspuffer

Bikarbonat	2,93g
Karbonat	1,59g

In 1l ddH<sub>2</sub>O gelöst, sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C

##### ELISpot Waschpuffer

1xPBS	500ml
Tween 20	0,25% (v/v)

ELISpot Substratlösung

ddH <sub>2</sub> O	10ml
25x Substratpuffer	400µl
Substratreagenz A	100µl
Substratreagenz B	100µl

FACS Puffer

1xPBS	50ml
Fötale Kälberserum	1% (v/v)

**3.2 Medien und Mediensupplemente**RPMI Medium

RPMI 1640	10ml
HEPES	10mM
Penicillin	50µg/ml
Streptomycin	50µg/ml

10%, 6% und 3% AB RPMI Medium

RPMI Medium	10ml
Humanes AB Serum	1000, 600 oder 300µl

X-VIVO 20 Medium

X-VIVO 20	10ml
HEPES	10mM
Penicillin	50µg/ml
Streptomycin	50µg/ml

DMEM Medium

DMEM <i>high glucose</i>	10ml
HEPES	10mM
Penicillin	50µg/ml
Streptomycin	50µg/ml

10% FKS DMEM Medium

DMEM Medium	10ml
Fötale Kälberserum	1ml

Das fötale Kälberserum wurde für 60 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert.

#### Dendritenmedium

X-VIVO 20	10ml
GM-CSF	560 Einheiten/ml
IL-4	1000 Einheiten/ml

#### T-Zellmedium

10% AB RPMI Medium	10ml
IL-2	100 Einheiten/ml
IL-4	60 Einheiten/ml

#### Einfriermedium

X-VIVO 20 Medium	1ml
Humanes AB Serum	8ml
DMSO	10% (v/v)

### **3.3 Zellbiologische Methoden**

#### **3.3.1 Zellkulturbedingungen**

Alle Kultivierungen und Inkubationen von Zelllinien wurden bei 37°C in einem Begasungsbrutschrank mit 5% CO<sub>2</sub> und 98% Luftfeuchtigkeit durchgeführt.

Gearbeitet wurde stets unter einer Sterilwerkbank mit Lüftung. Die Zentrifugation von Zellen erfolgte, falls nicht anders aufgeführt, für fünf Minuten bei 300g.

#### **3.3.2 Kultivierung von humanen Primärzellen**

Dendritische Zellen und T-Zellen sind Suspensionszellen. Beide wurden in Petrischalen kultiviert und dreimal in der Woche mit frischem Dendriten- und T-Zellmedium versorgt. Die Hälfte des Mediums wurde abgenommen, zentrifugiert und enthaltene Zellen in neuem Medium resuspendiert. Diese wurden dann zur Kultur zurückgegeben.

### **3.3.3 Kultivierung von humanen Tumorzellen**

Die primären Tumorzelllinien aus Kopf-Hals-Tumorgewebe, sowie MCF-7 wachsen adhären in multilamellaren Schichten und wurden in Zellkulturflaschen kultiviert. Zum Ablösen der Zellen wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, 15 Minuten mit EDTA versetzt und drei Minuten mit Trypsin/EDTA inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FKS abgespült, zentrifugiert und mit einer Verdünnung 1:2 passagiert.

Die in Suspension wachsenden Tumorzelllinien K562 und U937 wurden in Zellkulturflaschen und jede Woche, je nach Zelldichte, passagiert. Dabei wurden ca. 1/3 der Zellsuspension der Flasche entnommen und durch frisches Medium ersetzt. Die entnommene Zellsuspension wurde verworfen.

### **3.3.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zum Einfrieren wurden die Zellen mittels Zentrifugation sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 900µl Einfriermedium aufgenommen und in Einfrier Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 100µl DMSO wurden die Röhrchen bei -70°C eingefroren. Nach 24 Stunden bei -200°C wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt und aufbewahrt.

Zum Auftauen der Zellen wurde auf 37°C erwärmtes Medium mit einer Pasteurpipette zur Zellsuspension zugegeben und resuspendiert. Nach einem Waschvorgang wurden die Zellen in Medium aufgenommen und in Kulturflaschen oder Petrischalen ausgesät.

### **3.3.5 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität**

Die genaue Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer Zählkammer im Lichtmikroskop bestimmt. Dabei entspricht die Zellzahl, die in 16 Zählquadranten gezählt wird, der Zellkonzentration pro 0,1µl.

Die Differenzierung zwischen vitalen und toten Zellen erfolgte mit Hilfe des Trypanblau Farbstoffs, der in toten Zellen eindringt und diese blau anfärbt. Dazu wurde die Zellsuspension vor dem Auszählen 1:10 in Trypanblau Färbelösung verdünnt.

## **3.4 Proteinbiochemische Methoden**

### **3.4.1 Herstellung von Gewebelysaten**

Solide Primärtumore und metastasierte Lymphknoten wurden direkt nach der Entnahme während der Operation mit PBS gewaschen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zur Herstellung von Tumorlysat wurden die Gewebe aufgetaut, gegebenenfalls anhaftendes Fettgewebe entfernt und die Gewebe mittels Einmalskalpell zerkleinert. Anschließend wurden die Gewebestücke in 5ml Röhrchen mit 500 $\mu\text{l}$  PBS überführt und mit Hilfe eines Dispergiergerätes homogenisiert. Um eine Kontamination zu vermeiden, wurde das Dispergiermesser vor und nach jeder Benutzung zweimal mit 0,2 N Natronlauge und anschließend sechsmal mit ddH<sub>2</sub>O gespült. Die Gewebesuspension wurde in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und für 30 Minuten bei 1000g und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, steril filtriert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Gewebelysat wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Vor dem Einsetzen wurde mit Hilfe der Bradford Methode (siehe 3.3.3) die Proteinkonzentration bestimmt.

### **3.4.2 Herstellung von Zelllysaten**

Zur Herstellung von Zelllysaten aus humanen primären mononuklearen Zellen wurden die Zellen sedimentiert und mit PBS gewaschen. Das Zellsediment wurde je nach Größe in 80-200 $\mu\text{l}$  PBS aufgenommen und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Durch fünfmaliges, abwechselndes Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurde eine vollständige Lyse der Zellen erreicht. Das Lysat wurde anschließend für 30 Minuten bei 1000g und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Zelllysate bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Vor dem Einsetzen wurde mit Hilfe der Bradford Methode (siehe 3.3.3) die Proteinkonzentration bestimmt.

### **3.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Die Proteinkonzentration der hergestellten Lysate wurde mit der Bradford Methode (Bradford *et al.*, 1976) bestimmt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximum des Farbstoffs *Coomassie Brilliant Blue* von 465nm zu 595nm durch nicht kovalente Bindung an Protein in saurer Lösung; die Absorption bei 595nm verhält sich dabei direkt proportional zur enthaltenen Proteinmenge. Eine Eichkurve zur Bestimmung

unbekannter Proteinkonzentrationen wurde mit Hilfe von Proteinlösungen aus Rinderserumalbumin mit bekannten Konzentrationen (0,1 - 1,2µg/µl) erstellt. Die Farblösung Bio-Rad Proteinassay Lösung wurde 1:5 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und 200µl davon mit 5µl der unbekanntenen Proben bzw. der bekannten Proteinlösungen in Duplikaten pipettiert. Nach fünf Minuten wurde die Extinktion bei 595nm gemessen. Die Eichkurve wurde mit dem Computerprogramm *Graph Pad Prism* erstellt und daraus die Konzentration der Proben berechnet.

#### **3.4.4 Lösen von Peptiden**

Die von der Peptidsyntheseabteilung des DKFZ synthetisierten Peptide lagen zunächst als Pulver vor und wurden vor ihrem Gebrauch auf 1µg/µl eingestellt. 1mg Peptid wurde steril abgewogen und schrittweise in 1ml warmes Injektionswasser gelöst. Schwerlöslichen Peptiden wurden ein bis zwei Tropfen warmes DMSO zugegeben (MUC-1 aa<sub>12</sub>-aa<sub>20</sub>, EGFR aa<sub>479</sub>-aa<sub>488</sub>, Her-2/neu aa<sub>369</sub>-aa<sub>377</sub>, HIV gag aa<sub>77</sub>-aa<sub>85</sub>). Im Falle einer Ausfällung des Peptids, wurde für ca. fünf Minuten im Wasserbad inkubiert, bevor die restliche Mediummenge pipettiert wurde. Die Peptidlösung wurde 1:5 mit PBS verdünnt und in 100µl Portionen bei -20°C gelagert.

### **3.5 Immunologische Methoden**

#### **3.5.1 Klinisches Material von Kopf-Hals-Tumorpatienten**

Klinisches Material wurde den Tumorpatienten nach schriftlicher Einwilligung in der Kopfklinik der Universität Heidelberg entnommen. Das heparinisierte periphere Blut wurden einer Ficoll-Gradientenzentrifugation unterworfen und isolierte mononukleare Zellen in Kultur genommen. Tumorbiopsien und metastasierte oder nicht metastasierte Lymphknoten wurden während der Primäroperation der Tumore gewonnen, in Medium überführt und innerhalb von zwei Stunden weiterverarbeitet. Tumor- oder Metastasengewebe wurde bei -20°C kryokonserviert. Eine Hälfte der zunächst klinisch nicht metastasierten Lymphknoten wurde zur mechanischen Lymphozytengewinnung weiterverarbeitet. Isolierte Zellen wurden in Kultur genommen. Die zweite Hälfte der Lymphknoten wurde immunhistologisch auf Metastasierung in der Pathologie der Kopfklinik der Universität Heidelberg analysiert. Funktionelle Tests wurden ausschließlich mit T-Zellen durchgeführt, die pathologisch tumorfrei waren.

### **3.5.2 Isolierung und Kultivierung humaner mononuklearer Zellen aus Blut**

Humane mononukleare Zellen aus dem peripheren Blut wurden mittels Dichtezentrifugation über einen Ficoll Stufengradienten (Dichte 1.077g/ml) isoliert. Dichtere Erythrozyten, Granulozyten und polymorphonukleare Leukozyten wandern bei der Dichtegradientenzentrifugation weiter als mononukleare Zellen, die sich in der Interphase sammeln. Die oberste Phase enthält das Blutplasma.

15ml Ficolllösung wurden in ein Leucosep<sup>®</sup> Röhrchen gegeben und drei Minuten bei 250g zentrifugiert, damit die Lösung durch den Separationsfilter sedimentiert. Anschließend wurden je 20ml Blut in 15ml X-VIVO 20 Medium verdünnt und auf die Ficolllösung geschichtet. Es folgte die Zentrifugation für 20 Minuten bei 400g ohne Bremse. Nach der Zentrifugation wurde die Interphase mittels einer sterilen Pasteurpipette abgenommen und in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Zellen wurden zweimal mit X-VIVO 20 Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für mindestens zwei Stunden bei 37°C in X-VIVO 20 kultiviert. Währenddessen adhären Monozyten an der Plastikoberfläche der Kulturflaschen, Lymphozyten verbleiben jedoch im Überstand. Nach der Inkubationszeit wurden adhären Zellen zur Generierung dendritischer Zellen für fünf bis sieben Tage in Dendritenmedium überführt. Nicht adhären Lymphozyten wurden für denselben Zeitraum separat in T-Zellmedium kultiviert.

### **3.5.3 Isolierung und Kultivierung humaner mononuklearer Zellen aus Lymphknoten**

Die nicht metastasierten Lymphknoten wurden zur Lymphozytenisolation auf eine mit RPMI Medium versehene Petrischale aufgestellt. Mit Einmalskalpellen wurde das Gewebe solange kleingeschnitten und zusammengedrückt, bis die Stücke nicht mehr fest waren und das Medium trüb wurde. Die Zellsuspension wurde über einen Einzelzellfilter in ein Zentrifugationsröhrchen gegeben und einmal mit RPMI Medium gewaschen. Die Lymphknotenzellen wurden für fünf bis sieben Tage in T-Zellmedium kultiviert.

### **3.5.4 Isolierung spezifischer Immunzellpopulationen über Zelloberflächenmoleküle**

Zur Isolierung bzw. Depletion bestimmter Zellfraktionen einer Zellkultur wurde die magnetische Separation mittels Dynabeads<sup>®</sup> oder MACS<sup>®</sup> MicroBeads eingesetzt. Dynabeads<sup>®</sup> sind superparamagnetische, monodisperse Polystyrolbeads, deren Oberfläche

mit monoklonalen Antikörpern gegen entweder bestimmte Oberflächenantigene oder Immunglobuline gekoppelt ist. MACS<sup>®</sup> MicroBeads sind superparamagnetische Beads, deren Durchmesser ca. 50nm beträgt und aus einer biologisch abbaubaren Matrix bestehen. Ihre Oberfläche ist ebenso mit Antikörpern überzogen. Aufgrund der magnetischen Eigenschaften lassen sich spezifisch an die Beads gebundene Zellen mit Hilfe eines Magnetfeldes anreichern.

#### 3.5.4.1 Anreicherung von T-Lymphozyten mittels Dynabeads<sup>®</sup>

T-Lymphozyten aus Blut und Lymphknoten wurden jeweils mit Hilfe von antikörpergekoppelten Dynabeads<sup>®</sup> des *T-cell negative isolation kit* angereichert. Der Kit enthielt einen Antikörpermix, der aus anti-CD14-, -CD16-, -CD56-, -HLA Klasse II DR/DP- und -CD235a-Antikörpern bestand. Die Dynabeads des Kits waren mit einem Fc-spezifischen humanen anti-IgG4-Antikörper konjugiert, der eine hohe Affinität zu allen murinen IgG-Subklassen besitzt. Dadurch können spezifische Antikörper-Zellkomplexe innerhalb der Zellsuspension indirekt gebunden werden.

T-Zellen wurden aus der Petrischale gewaschen, das Zellsediment wurde in X-VIVO 20 resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.  $10^7$  Zellen wurden anschließend in 200µl 6% AB RPMI Medium aufgenommen und 20µl Antikörpermix hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Währenddessen wurden 100µl Dynabeads<sup>®</sup> zweimal mit RPMI Medium gewaschen. Nach Ablauf der Inkubation wurde die Zellsuspension zum Entfernen ungebundener Antikörper einmal gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 900µl 6% AB RPMI Medium aufgenommen. Der Zellsuspension wurden die Dynabeads<sup>®</sup> hinzugegeben und auf einer Rollapparatur für 15 Minuten bei 20°C inkubiert. Anschließend wurde die Bead-Zellsuspension in 7ml 6% AB RPMI resuspendiert. Das Röhrchen wurde für zwei Minuten in den *magnetic particle concentrator* fixiert, bevor der Überstand mit den angereicherten T-Zellen in ein neues Röhrchen überführt wurde. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt, um die Beads und die daran anhaftenden Zellen vollständig zu entfernen. Durch diese Methode konnte durchschnittlich eine T-Zellanreicherung von ca. 95% erzielt werden.

#### 3.5.4.2 Anreicherung von T-Lymphozyten mittels MACS<sup>®</sup> MicroBeads

Zur weiteren CD4 und CD8 Subpopulationenisolation wurden die wie unter 3.5.4.1 beschrieben angereicherten T-Zellen einer MACS<sup>®</sup> MicroBeads Selektion unterzogen. Dazu wurden  $10^7$  T-Zellen in 80µl PBS aufgenommen und mit 20µl CD4 MicroBeads gemischt.

Inkubiert wurde für 15 Minuten bei 4°C. Nach Ablauf der Inkubation wurde einmal mit PBS gewaschen, zentrifugiert und das Zellsediment in 1ml PBS aufgenommen. Zur magnetischen Selektion wurde eine MS<sup>+</sup> MACS<sup>®</sup> Säule zunächst in den Magneten fixiert und mit 500µl PBS gewaschen. Als Nächstes wurde die Bead-Zellsuspension auf die Säule gegeben. Die Säule wurde dreimal mit jeweils 500µl PBS gespült. Die MicroBeads gebundenen Zellen wurden von der magnetischen Säule zurückgehalten. Nach Entfernung dieser vom Magnetfeld und nach Zugabe von 1ml PBS auf die Säule, konnten nun CD4 positive T-Zellen mit Hilfe eines Stopfens eluiert werden. Aus der MicroBeads ungebundenen, CD4 negativen Fraktion wurden CD8 positive T-Zellen mit Hilfe von CD8 MicroBeads, wie oben beschrieben, positiv isoliert. Diese Selektionierung ergab in beiden Fällen eine Reinheit von über 95%.

#### 3.5.4.3 Anreicherung von dendritischen Zellen mittels Dynabeads<sup>®</sup>

Humane dendritische Zellen differenzieren sich *in vitro* aus CD14<sup>+</sup> Vorläuferzellen des Blutes. Nach fünf- bis siebentägiger Inkubation in Dendritenmedium können differenzierte dendritische Zellen durch Depletion von T- und B-Lymphozyten sowie NK-Zellen mit Hilfe von anti-Human-CD3-, anti-Human-CD19- und anti-Human-CD56-gekoppelten Dynabeads<sup>®</sup> angereichert werden.

Zur Depletion von NK-Zellen wurde monoklonaler Maus-anti-Human-CD56-Antikörper an anti-Maus-IgG-Beads gekoppelt. Hierzu wurden für 10<sup>7</sup> Zellen 100µl anti-Maus-IgG-Beads zweimal mit RPMI Medium gewaschen und mit 4µg anti-CD56-Antikörper für 30 Minuten bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Antikörper-Beadsuspension zur Entfernung von nicht gebundenem Antikörper für zwei Minuten in den *magnetic particle concentrator* fixiert, die Beads zweimal mit RPMI Medium gewaschen und nachfolgend in 100µl X-VIVO 20 Medium aufgenommen.

Für die Depletion von T- und B-Zellen wurden kommerziell erwerbliche anti-Human-CD3- bzw. anti-Human-CD19-Beads eingesetzt. Pro 10<sup>7</sup> Zielzellen wurden 100µl der jeweiligen Beads in RPMI Medium gewaschen und in 200µl X-VIVO 20 resuspendiert.

Die dendritischen Zellen wurden aus der Petrischale gewaschen und zusammen mit den Beads in einem 15ml Röhrchen zugegeben (Endvolumen 1000µl). Das Röhrchen wurde für 30 Minuten bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Die sich im Überstand befindlichen dendritischen Zellen wurden anschließend, wie unter 3.5.4.1 beschrieben, mittels *magnetic particle concentrator* isoliert. Es wurde dabei eine Reinheit von ca. 95% erreicht.

### 3.5.5 Antigenbeladung von dendritischen Zellen

Angereicherte dendritische Zellen (siehe 3.5.4.3) wurden für den ELISpot Test auf  $2 \times 10^4$  pro 100  $\mu$ l mit X-VIVO 20 Medium eingestellt und in der Mikrotiterplatte mit 20  $\mu$ g Proteinlysate oder 10  $\mu$ g Tumorpeptid für drei Stunden bei 37°C inkubiert.

Für die aus autologen Tumor- und Metastasenlysaten bestehenden Testantigene, setzten sich die Kontrollantigene aus autologem PBMZ-Lysat zusammen. Im Falle einer Tumorpeptidbeladung, stellten die Eigen- und Fremdanigenpeptide der RNA Helikase und des HIV gag Proteins die Negativkontrollen dar. Als Positivkontrolle diente stets das bakterielle Superantigen *Staphylococcus* Enterotoxin B.

### 3.5.6 Durchflusszytometrie

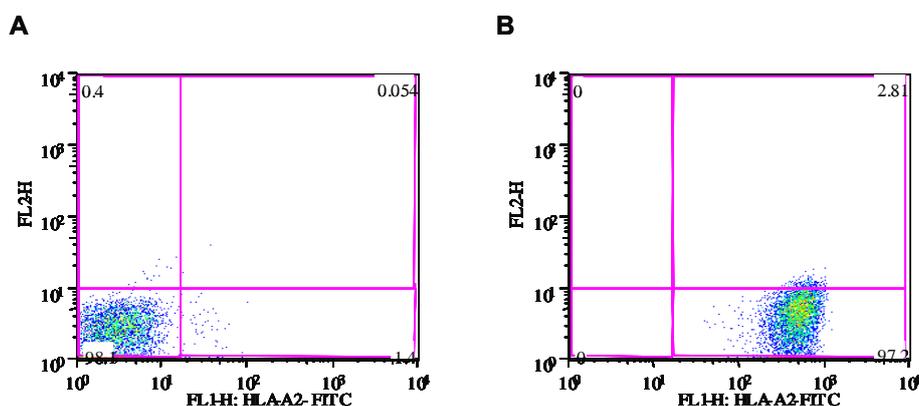
Die Durchflusszytometrie (Thiel und Radbruch *et al.*, 1999; Coons *et al.*, 1995) ist ein Verfahren zur Zählung und Charakterisierung von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Die Detektion erfolgt mittels eines Laserstrahls. Lichtbeugung und -streuung erlauben eine Charakterisierung der Größe, sowie der Binnenstruktur der Zellen und Zellorganellen. Durch Anfärbung definierter Zelloberflächenstrukturen mit speziellen Farbstoffen, gegebenenfalls unter Zuhilfenahme farbstoffmarkierter monoklonaler Antikörper, ist eine weitere Differenzierung möglich. Das FACS (*fluorescence activated cell sorter*) ist ein Durchflusszytometer. Um bestimmte Oberflächenantigene anzufärben, werden die Zellen mit dem gegen das Antigen gerichteten Antikörper inkubiert. Dieser kann direkt mit einer fluoreszierenden Substanz konjugiert eingesetzt werden oder indirekt als Hybridomüberstand oder in gereinigter Form. Im indirekten Fall muss dann aber ein fluoreszenzmarkierter Zweitantikörper zugegeben werden. Jede Zelle fließt nun durch einen Laserstrahl und es kommt zur Lichtstreuung. Diese regt die Moleküle zur Fluoreszenz an. Photomultiplier detektieren sowohl das gestreute Licht als auch die Fluoreszenz, die Aussagen über die Expression von Oberflächenantigenen erlaubt. Die Fluoreszenzemission wurde mit einem Argon-Kryptonlaser bei 488nm angeregt und die relative Grün Fluoreszenz (FITC konjugierter Antikörper) bestimmt. Es wurden 10.000 Ereignisse aufgenommen und anschließend mittels *Flow Jo* Software analysiert.

#### 3.5.6.1 Identifizierung von HLA-A2 exprimierenden Lymphozyten

Der Haupthistokompatibilitätskomplex besteht aus einer Gruppe zusammenhängender Genloci, die für viele Proteine kodieren. Diese spielen bei der Antigenpräsentation eine

wesentliche Rolle. Beim Menschen wird der Komplex auch als HLA (humanes Leukozytenantigen) bezeichnet, wobei eines von drei Hauptgenen der Klasse I das HLA-A bildet. Die HLA Gene sind polymorph, das heißt für jedes Gen existieren multiple Allele, die jeweils mit einer Nummer benannt sind. Das am häufigsten in der kaukasischen Bevölkerung Westeuropas vertretene HLA Klasse I Allel ist das HLA-A2 (ca. 50%). Da die MHC-Restriktion von T-Zellen bei der Peptidantigen-Erkennung von entscheidender Bedeutung ist, wurden die Lymphozyten der Patienten vor ihrem Einsatz im Tumorassoziertes Antigen ELISpot Test auf HLA-A2 Expression geprüft.

$2 \times 10^4$  -  $2 \times 10^6$  Zellen wurden einmal mit eiskaltem FACS Puffer gewaschen. Die Zellsedimente wurden in 100 $\mu$ l (2,5 mg/ml) rekombinanten humanen IgG aufgenommen und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Das IgG sättigt Fc-Rezeptoren und somit unspezifische Bindungsstellen für die fluoreszenzkonjugierten Antikörper ab. Die Zellen wurden anschließend einmal mit eiskaltem FACS-Puffer gewaschen und mit 100 $\mu$ l anti-Human-HLA-A2-Antikörper aus Hybridomüberständen für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen und für 15 Minuten mit 100 $\mu$ l Ziege-anti-Maus-IgG-FITC Antikörperlösung (1:100 Verdünnung mit FACS Puffer) auf Eis und im Dunkeln inkubiert. Schließlich wurden die Zellen gewaschen und in 200 $\mu$ l FACS Puffer genommen. Es folgte die Auswertung am Durchflusszytometer. Als Negativkontrolle dienten nicht gefärbte Lymphozyten, als Positivkontrolle wurden HLA-A2 positive T2-Zellen eingesetzt. Abb. 3.1 zeigt zwei repräsentative Analysen.



**Abb. 3.1: HLA-A2 Expression bei zwei Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

Als *Dot Plots* dargestellte durchflusszytometrische Analysen zweier Kopf-Hals-Tumorpatienten für HLA-A2 Oberflächenexpression. HLA-A2 wurde bei (A) nicht exprimiert (>98% ungefärbt), während (B) HLA-A2 positiv ist (>97% FITC gefärbt). PBMZ wurden indirekt mit einem Maus anti-human HLA-A2-Antikörper fluoreszenzmarkiert und mit Hilfe des FACS Gerätes untersucht. 10.000 Ereignisse wurden aufgenommen. Die Prozente der einzelnen Quadrantenpopulationen sind angegeben.

### 3.5.7 ELISpot Test (*enzyme-linked immunospot assay*)

Der ELISpot Test ist eine hochsensitive Methode zum Frequenznachweis antigenspezifischer T-Zellen innerhalb einer T-Zellpopulation. Lokal sezernierte Zytokine werden von einem immobilisierten Antikörper gebunden, über einen biotinylierten Zweitantikörper detektiert und mittels einer Streptavidin-enzymgekoppelte Farbreaktion sichtbar gemacht. Ein Farbpunkt entspricht dabei einer einzelnen zytokinproduzierenden T-Zelle.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten mit dem ELISpot Test ausschließlich Gedächtnis T-Zellantworten bei Kopf-Hals-Tumorpatienten detektiert werden. Hierzu wurden T-Zellen des Blutes und Lymphknotens in getrennten Ansätzen für nur 40 Stunden mit antigenpräsentierenden autologen dendritischen Zellen *in vitro* stimuliert. Die Antigenreaktivität der T-Zellen wurde anhand der IFN- $\gamma$ , Perforin, IL-4 und IL-10 Produktion bestimmt.

Eine Zellulose-Ester Membran-Mikrotiterplatte wurde mit 1,5 $\mu$ g bzw. 3 $\mu$ g anti-Human-IFN- $\gamma$ -, -IL-4-, -IL-10- bzw. -Perforin- Antikörper pro Loch über Nacht bei 4°C überzogen. Ungebundener Antikörper wurde durch sechsmaliges Waschen mit PBS entfernt. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch eine einstündige Inkubation der Platte mit 6% AB RPMI Medium bei 37°C blockiert. Nach Ablauf der Inkubation wurde das Medium verworfen und die Platte mit den zu testenden Zellen beladen.

Angereicherte, tumor- oder kontrollantigenbeladene dendritische Zellen (siehe 3.5.4.3 und 3.5.5) wurden auf  $2 \times 10^4$  pro 100 $\mu$ l X-VIVO 20 Medium eingestellt und mit über Nacht in zytokinfreiem 10% AB RPMI Medium kultivierten T-Zellen kokultiviert. Die T-Zellen wurden abhängig von der Experimentengruppe wie unter 3.5.4.1 oder 3.5.4.2 beschrieben isoliert und auf  $10^5$  pro 100 $\mu$ l 6% AB RPMI Medium eingestellt.

Alle T-Zellproben wurde zusätzlich mit dem *Staphylococcus* Enterotoxin B (SEB) stimuliert. Mit Hilfe dieses bakteriellen Superantigens kann die prinzipielle Aktivierbarkeit der T-Zellpopulation ermittelt werden. Alle Testgruppen wurden mindestens in Triplikaten angesetzt.

Nach der 40-stündigen Inkubationszeit wurde die Platte sechsmal mit ELISpot Waschpuffer gewaschen, verbliebene Zellen mit Wasser lysiert und die Platte erneut sechsmal gewaschen. Anschließend wurde mit 0,1 $\mu$ g des entsprechenden biotinylierten anti-Human-Zytokin Antikörpers für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde sechsmal gewaschen und mit 0,1 $\mu$ g streptavidingekoppelte alkalische Phosphatase für 90 Minuten bei 37°C versetzt. Im Anschluss dazu wurde sechsmal mit Waschpuffer und zweimal mit PBS gewaschen. Die Substratreaktion erfolgte durch Zugabe von 100 $\mu$ l Substratlösung pro Loch für zehn bis 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach Entwicklung der Farbpunkte (Abb. 3.2) wurde durch dreimaliges Waschen mit Wasser abgestoppt. Die Anzahl der

Farbpunkte wurde am Axioplan 2 Mikroskop mit Hilfe der KS ELISpot Software bestimmt. SEB spezifische Reaktivität konnte in sämtlichen Patienten beobachtet werden. Diese war jedoch so stark, dass die angewandte Software sie quantitativ nicht erfassen konnte (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.2** Induzierte IFN- $\gamma$  Farbpunkte auf der Membran einer ELISpot Mikrotiterplatte.

Im kurzzeitigen Zytokin ELISpot Test wurde eine immunologische Reaktivität angenommen, wenn die Anzahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen signifikant erhöht war als die Anzahl reaktiver Zellen in der Negativkontrolle ( $p \leq 0,05$ , Abb. 3.2). Die Frequenz tumorreaktiver Gedächtnis T-Zellen bezog sich auf die eingesetzte Gesamt T-Zellzahl und ergab sich nach Subtraktion der unspezifischen Reaktivität in der entsprechenden Negativkontrolle. Per Definition ist dieser Wert für reaktive Patienten kleiner Null, für nicht reaktive kleiner/gleich Null.

### 3.5.8 ELISA Test (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

Der ELISA Test lässt die Konzentration löslicher Moleküle in Zellkulturüberständen, Plasma- und Serumproben sowie in Lysaten quantifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die Mengen an IFN- $\alpha$ , IL-10, IL-12 (p70), IL-17 und TGF- $\beta$ 1 in Tumorzelllysaten, Plasmaproben und Tumorzellkulturüberständen analysiert.

Das Prinzip des ELISA Tests beruht darauf, dass die zu untersuchenden Proben in einer Mikrotiterplatte inkubiert werden, die mit monoklonalem zytokinspezifischem Antikörper beschichtet ist. Erstantikörpergebundenes Zytokin wird durch einen enzymkonjugierten, zytokinspezifischen, polyklonalen Zweitantikörper detektiert. Das gekoppelte Enzym katalysiert in einer nachfolgenden Substratreaktion die Bildung eines farbigen Produkts. Die Farbentwicklung ist direkt proportional zur Menge an gebundenem Zytokin. Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe bekannter Zytokinkonzentrationen kann eine Eichkurve erstellt werden und somit die Menge an vorhandenem Zytokin quantitativ ermittelt werden. Die Ansätze wurden in Duplikaten getestet.

Abweichungen zum beschriebenen Testprinzip gab es für die IL-10, IL-12 (p70) und TGF- $\beta$ 1 ELISA Tests. Im Falle der hochsensitiven Quantifizierung von IL-10 und IL-12 (p70) wurde eine Verstärkung des Signals durch einen zusätzlichen Schritt erzielt. Das an den zytokin-

spezifischen Antikörper konjugierte Enzym alkalische Phosphatase dephosphoryliert Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) zu Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH), welches als spezifischer Kofaktor zur Aktivierung eines Reduktions-Oxidations-Kreislaufs dient. In diesem Kreislauf katalysiert das Enzym Diaphorase die Reduktion eines Tetrazoliums Salzes zu einem intensiv gefärbten Formazanfarbstoff unter gleichzeitiger Oxidation von NADH zu  $\text{NAD}^+$ . Letzteres dient wiederum als Kofaktor in einer nachfolgenden Alkoholdehydrogenase katalysierten Reaktion, bei der NADH durch Oxidation von Ethanol regeneriert wird. Die Reduktionsrate des Tetrazoliums Salzes und somit die Menge des farbigen Reaktionsprodukts ist direkt proportional zur Menge an immobilisiertem Zytokin. Für den TGF- $\beta$ 1 Nachweis musste latentes TGF- $\beta$ 1 zunächst durch Ansäuerung und nachfolgender Neutralisierung zu immunreaktivem, detektierbarem TGF- $\beta$ 1 aktiviert werden.

#### **3.5.8.1 IFN- $\alpha$ ELISA Test**

Pro Loch der beschichteten IFN- $\alpha$  Mikrotiterplatte wurden 100 $\mu$ l Standard bzw. Probe für eine Stunde bei Raumtemperatur pipetiert. Die Platte wurde einmal gewaschen und mit 100 $\mu$ l Antikörperlösung pro Loch für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dreimal gewaschen und mit 100 $\mu$ l Konjugatlösung pro Loch wurde erneut für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaligem Waschen wurden 100 $\mu$ l Substratlösung in jedes Loch gegeben und die Platte wurde für 15 Minuten im Dunkeln aufbewahrt. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 100 $\mu$ l Stopplösung pro Loch abgestoppt. Die Absorption wurde bei 450nm im Photometer gemessen.

#### **3.5.8.2 IL-10 und IL-12 (p70) ELISA Test**

Für IL-10 bzw. IL-12 (p70) ELISA Tests wurden pro Loch der beschichteten Mikrotiterplatte 50 $\mu$ l Test Verdünnungslösung vorgelegt und mit 200 $\mu$ l Standard bzw. Probe pro Loch vermischt. Es wurde bei Raumtemperatur für zwei Stunden auf dem Schüttler (IL-10) bzw. für drei Stunden (IL-12 (p70)) inkubiert. Anschließend wurde sechsmal gewaschen und mit 200 $\mu$ l Konjugatlösung pro Loch für zwei Stunden bei Raumtemperatur (für IL-10 auf dem Schüttler) inkubiert. Die Platte wurde sechsmal gewaschen und mit 50 $\mu$ l Substratlösung pro Loch für eine Stunde inkubiert. Nachfolgend wurden 50 $\mu$ l Verstärkerlösung pro Loch zugegeben und für weitere 60 (IL-10) bzw. 30 Minuten (IL-12 (p70)) inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 $\mu$ l Stopplösung pro Loch beendet und die Absorption bei 490nm im Photometer gemessen.

### 3.5.8.3 IL-17 ELISA Test

Pro Loch der beschichteten IL-17 Mikrotiterplatte wurden 100µl Test Verdünnungslösung vorgelegt und mit 100µl Standard bzw. Probe für drei Stunden bei Raumtemperatur vermischt. Anschließend wurde dreimal gewaschen und mit 200µl Konjugatlösung pro Loch wurde erneut für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden 200µl Substratlösung in jedes Loch gegeben und die Platte wurde für 30 Minuten im Dunkeln aufbewahrt. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 50µl Stopplösung pro Loch abgestoppt. Die Absorption wurde bei 450nm im Photometer gemessen.

### 3.5.8.4 TGF-β1 ELISA Test

Plasmaproben wurden vor der TGF-β1 Aktivierung bei 1000g für zehn Minuten bei 4°C zentrifugiert, um vorhandene Blutplättchen zu entfernen. Zur Aktivierung von latentem zu immunreaktivem TGF-β1 wurden 100µl Lysat oder Zellkulturüberstand bzw. 40µl Plasma mit 20µl 1N Salzsäure vermischt, für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 20µl einer 1,2N NaOH/0,5M HEPES-Lösung neutralisiert. Anschließend wurden die Proben mit Kalibrator Verdünnungslösung verdünnt (Verdünnungsfaktor von Lysat- und Überstandproben: 1,4; von Plasmaproben: zwölf).

Pro Loch der beschichteten Mikrotiterplatte wurden 50µl Test Verdünnungslösung mit 50µl Standard bzw. aktivierte Probe vermischt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde nachfolgend dreimal gewaschen und 100µl Konjugatlösung wurden pro Loch pipetiert. Nach einer Inkubationsdauer von zwei Stunden wurde erneut dreimal gewaschen und mit 100µl Substratlösung pro Loch für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Substratreaktion wurde mit 50µl Stopplösung pro Loch abgestoppt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 450nm im Photometer gemessen.

### 3.5.9 Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten

Mit Hilfe der Immunhistochemie können ganze Zellen, Zellkompartimente oder Proteine mit Hilfe von Antikörpern auf Gewebegefrierschnitten spezifisch mit Erstantikörpern gefärbt werden. Ein an einem Zweitantikörper gekoppeltes, biotinyliertes Enzym konvertiert zur Detektion ein farbloses Substrat *in situ* in ein farbiges Reaktionsprodukt. Am Lichtmikroskop können später, an der Position des farbigen Reaktionsproduktes, Schlüsse über das Vorhandensein des Proteins oder der Zellen gezogen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Tumorgewebeschnitte Kopf-Hals-Tumorpatienten auf die Präsenz von CD3, CD4, CD8 und CD45RA positiven Zellen untersucht (Abb. 3.3).

Aus schockeingefrorenen Gewebestückchen wurden am Kryostat 5µm dicke Gefrierschnitte angefertigt und auf Objektträger übertragen. Am Färbetag wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit Aceton/0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 10 Minuten fixiert. Danach wurden 100µl verdünnte Erstantikörperlösung (1:100 in Antikörper-Verdünnungspuffer) auf die Schnitte pipettiert und eine Stunde lang in der Feuchtekammer bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde dreimal für fünf Minuten mit PBS/0,01% Tween 20 auf dem Schüttler gewaschen. Ein bis zwei Tropfen Meerrettichperoxidase (enzymkonjugierter Zweitantikörper) wurden pro Objektträger pipettiert und in der Feuchtekammer für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Inkubation wurde die Substratlösung angesetzt: in 150ml Wasser wurden 15 Tropfen AEC-Chromogen und 15 Tropfen Puffer vermischt, bevor 22,5µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dazuaddiert wurden. Die Objektträger wurden wie oben beschrieben gewaschen und für 20-40 Minuten auf dem Schüttler in der Substratlösung getaucht. Nach einmaligem Waschen folgte das Gegenfärben der Schnitte für 15-30 Sekunden in einem Behälter mit Hämalaun. Anschließend wurden die Schnitte unter fließendem Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Die Objektträger wurden mit flüssiger Glyzeringelatine überschichtet und mit einem Deckgläschen versiegelt. Zur Kontrolle wurden ungefärbte bzw. nur mit Zweitantikörper gefärbte Objektträger verwendet. Pro Tumorgewebe wurden vier Schnitte gefärbt. Zum Schluss wurden die Objektträger unter dem Lichtmikroskop analysiert. Sechs Tumorareale (145mm<sup>2</sup>) mit der höchsten Anzahl angefarbter Lymphozyten (*hot spots*) wurden automatisiert mit der *analySIS* Software ausgezählt. Der Vorschlag der automatisierten Analyse wurde stets überprüft und nach Bedarf neu evaluiert.

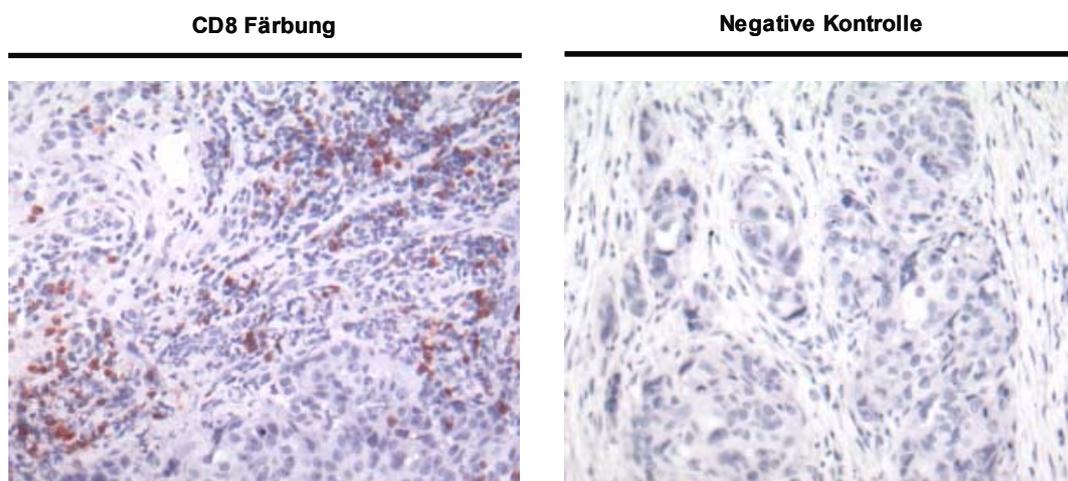


Abb. 3.3 Immunhistochemie von Tumorgeweben der Kopf-Hals-Tumorgewebe.

Gezeigt ist die histologische Analyse der CD8 Infiltration eines repräsentativen Kopf-Hals-Tumorpatienten und eine negative Kontrolle nur mit Zweitantikörper behandelt. Es sind 5µm dicke Gefrierschnitte vom Tumorgewebe dargestellt, mit Hämalaun (blau) gegengefärbt wurden. CD8 gefärbte Zellen (rot) sind nachweisbar. 200-fache Vergrößerung.

### 3.5.10 <sup>51</sup>Chrom-Freisetzungstest

Der <sup>51</sup>Chrom-Freisetzungstest stellt eine sensitive und spezifische Methode zur Analyse der zytotoxischen Aktivität aktivierter CD8 T-Zellen dar. Dabei wird die Bestimmung abgetöteter <sup>51</sup>Chrommarkierter Zielzellen als Nachweis für die Generierung aktivierter zytotoxischer Effektor T-Zellen benutzt. Vitale Zielzellen werden mit radioaktivem Natriumchromat ( $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ ) durch Einbau in Zellproteine markiert und setzen im Falle einer spezifischen Lyse im Zellinnern gebundenes radioaktive Chrom in den Überstand frei.

Es wurde die zellvermittelte zytotoxische Aktivität von stimulierten T-Zellen aus peripherem Blut bei Kopf-Hals-Tumorpatienten untersucht. Als Zielzellen wurden autologe Tumorzellen, sowie die heterologen Tumorzelllinien MCF-7, U937 und K562 eingesetzt.

#### Generierung zytotoxischer T-Zellen

Angereicherte Blut T-Zellen (siehe 3.5.4.1) wurden drei Tage lang mit autologen Tumorzellen, die zuvor mit 100Gy bestrahlt wurden, im Verhältnis 1:10 in zytokinfreiem 10% AB RPMI Medium bei 37°C stimuliert.

#### Radioaktive Markierung der Zielzellen

Die Zielzellen waren vor dem Markieren in der exponentiellen, um das <sup>51</sup>Chrom optimal aufzunehmen.  $5 \times 10^6$  Tumorzellen wurden in 200µl FKS aufgenommen und mit 200µCi Natriumchromat-Lösung für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die chromierten Zellen viermal mit X-VIVO 20 Medium gewaschen und auf eine Zellzahl von  $3 \times 10^4$ /ml eingestellt.

#### Koinkubation von Effektor- und Zielzellen

Die generierten Effektorzellen wurden mit X-VIVO 20 Medium gewaschen und auf eine Zellzahl von  $1,5 \times 10^6$ /ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden je 200µl pro Loch auf eine 96-Loch-Rundbodenplatte gegeben und mit X-VIVO 20 Medium eine serielle 1:2 Verdünnung ausgeführt. Durch Zugabe von je 100µl Zielzellen und damit einer konstanten Zahl von  $3 \times 10^3$  Zielzellen pro Loch ergaben sich folgende Effektor zu Zielzellen Verhältnisse: 50:1, 25:1, 12,5:1 und 6,25:1. Zielzellen alleine dienten als Maß für die spontan freigesetzte Menge an <sup>51</sup>Chrom, der als Hintergrund definiert ist. Das Endvolumen pro Loch betrug immer 200µl. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Platte wurde für vier Stunden bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde die Platte zentrifugiert und aus jedem Ansatz 100µl Kulturüberstand in ein Gamma-Zählerröhrchen überführt. Zur Bestimmung der maximalen Chromfreisetzung dienten je 50µl der Zielzellensuspension mit  $3 \times 10^3$  Zielzellen in Triplikaten. Alle Röhrchen wurden mit flüssigem Paraffinwachs verschlossen und die enthaltene Radioaktivität in einem Gamma-Zähler gemessen.

Die spezifische Lyse wurde wie folgt berechnet:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{Messwert der Probe} - \text{Spontanfreisetzung}}{\text{Maximalfreisetzung} - \text{Spontanfreisetzung}} \times 100$$

Immunologische Reaktivität wurde angenommen, wenn die spezifische Lyse in den Gruppen mit autologen Tumorzellen signifikant höher lag ( $p \leq 0,05$ ) als in jenen, die mit heterologen Linien im vierstündigen  $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest stimuliert wurden.

## 4. Ergebnisse

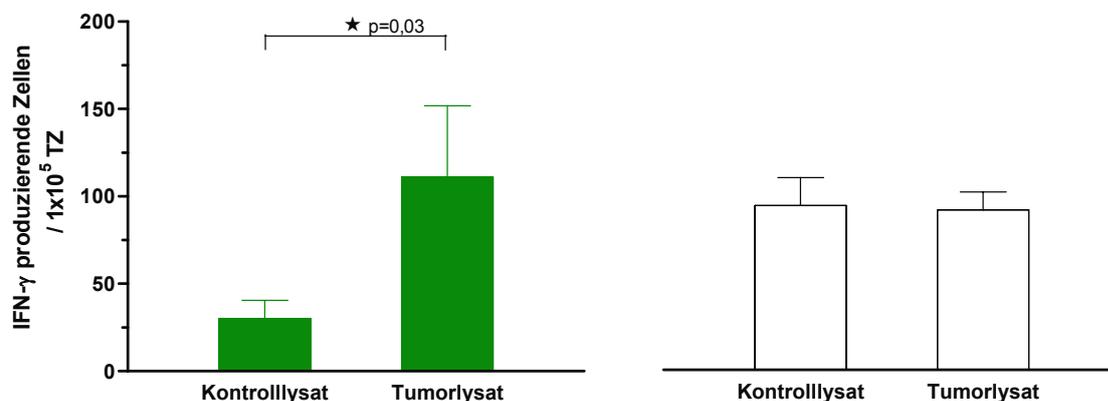
### 4.1 Tumorreaktive Gedächtnis T-Zellen bei primär operierten Kopf-Hals-Tumorpatienten

In der Vergangenheit konnte von unserer Gruppe bei Patienten mit Mamma- (Feurerer *et al.*, 2001) und Pankreaskarzinom (Schmitz-Winnenthal *et al.*, 2005), sowie malignem Melanom (Muller-Berghaus *et al.*, 2006) und multiplm Myelom (Choi *et al.*, 2005), die Existenz tumorantigen-spezifischer Gedächtnis T-Zellen in lymphatischen Geweben nachgewiesen werden. Im Mammakarzinom waren diese nach spezifischer Restimulation mit Hilfe autologer, dendritischer Zellen zur Abstoßung xenotransplantiertes, autologes Tumorstücke in NOD/SCID Mäusen in der Lage (Feurerer *et al.*, 2001). Hierbei konnte die Infiltration der Tumorstücke durch transferierte CD4 und CD8 T-Zellen, sowie applizierte dendritische Zellen aufgezeigt werden. Interaktionen zwischen allen drei Zelltypen waren im Tumorgewebe nachweisbar und für den therapeutischen Erfolg notwendig (Bai *et al.*, 2003). In diesem Zusammenhang sollte zuerst geklärt werden, ob tumorspezifische T-Zellen auch bei Kopf-Hals-Tumorpatienten spontan generiert werden können. Dafür wurde das tumorreaktive Potential von Gedächtnis T-Zellen im peripheren Blut und tumordrainierenden, nicht metastasierten Lymphknoten von 69 primär operierten Kopf-Hals-Tumorpatienten untersucht. Die klinische Relevanz solcher Gedächtnis T-Zellen sollte bestimmt werden. Präsenz und Frequenz tumorspezifischer Immunantworten wurden anhand der Anzahl IFN- $\gamma$  produzierender T-Zellen nach 40-stündiger Stimulation mit autologen dendritischen Zellen im hochsensitiven, kurzzeitigen ELISpot Test nachgewiesen. Zu diesem Zweck wurden die dendritischen Zellen zuvor mit autologem Tumor- bzw. Metastasen- oder Kontrolllysat für vier Stunden inkubiert. Letzteres wurde aus autologen mononuklearen Zellen des peripheren Blutes hergestellt. Autologes Tumor- bzw. Metastasenlysat diente als Quelle patientenspezifischer Neoantigene. Voruntersuchungen an primären Tumoren, sowie Tumorzelllinien hatten die Expression bekannter TAA, unter anderem der EGFR- und MAGE-Familie, sowie NY-ESO-1 und SART-1, bestätigt (Diplomarbeit Y. Ziouta). Die Verwendung von Gewebe- bzw. Zelllysaten erlaubt die Detektion polyklonaler CD4 und CD8 T-Zellimmunantworten.

Im kurzzeitigen IFN- $\gamma$  ELISpot Test wurde eine immunologische Reaktivität angenommen (Abb. 4.1), wenn die Anzahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen signifikant höher war als die Anzahl reaktiver Zellen in der Negativkontrolle ( $p \leq 0,05$ ). Die Frequenz tumorreaktiver Gedächtnis T-

Zellen bezog sich auf die eingesetzte Gesamt T-Zellzahl und ergab sich nach Subtraktion der unspezifischen Reaktivität in der entsprechenden Negativkontrolle.

Arbeiten unserer Gruppe an gesunden Spendern hatten gezeigt, dass in einer 40-stündigen Stimulation ausschließlich Gedächtnis T-Zellantworten induziert werden (Dissertation C. Choi).

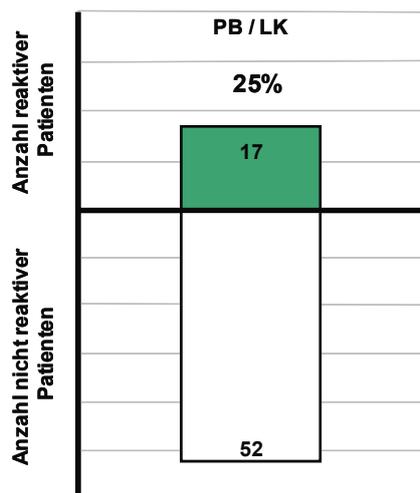


**Abb. 4.1: IFN- $\gamma$  Sekretion von Gedächtnis T-Zellen bei einem tumorreaktiven und einem nicht tumorreaktiven Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

Dargestellt ist die IFN- $\gamma$  Sekretion von Gedächtnis T-Zellen im kurzzeitigen ELISpot Test zweier repräsentativer Kopf-Hals-Tumorpatienten. Ein IFN- $\gamma$  tumorreaktiver Patient (links; grüne Balken) ist einem nicht reaktiven (rechts; weiße Balken) gegenübergestellt.  $10^5$  T-Zellen aus Blut und/oder Lymphknoten wurden für 40 Stunden mit autologen dendritischen Zellen stimuliert, die mit autologem Tumor- oder Kontrolllysate vorinkubiert worden waren. Ein Patient wurde als immunologisch reaktiv eingestuft, wenn die Anzahl der IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen signifikant höher lag als die der entsprechenden Negativkontrolle (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ). Ein Patient wurde als immunologisch nicht reaktiv eingestuft, wenn die Anzahl der IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen im selben Bereich lag als die der entsprechenden Negativkontrolle. \* zeigt signifikant mehr IFN- $\gamma$  produzierende T-Zellen im Tumorlysate als im Kontrolllysate (Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.1.1 Nachweis tumorreaktiver Gedächtnis T-Zellen bei Kopf-Hals-Tumorpatienten

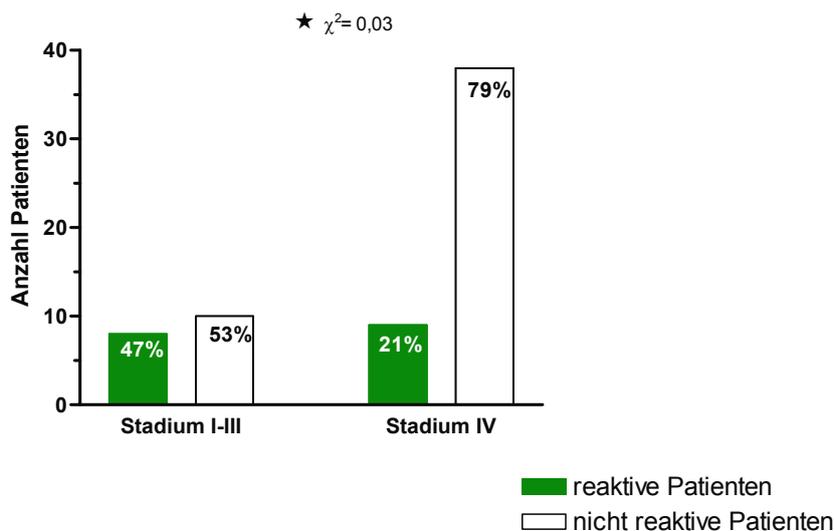
Die Tumorreaktivität spezifischer T-Zellen wurde für peripheres Blut und tumordrainierenden, nicht metastasierten Lymphknoten in insgesamt 69 Kopf-Hals-Tumorpatienten mittels kurzzeitigem IFN- $\gamma$  ELISpot Test untersucht. Insgesamt waren 17 Patienten (25%) in mindestens einem der untersuchten Kompartimente tumorimmunologisch reaktiv (Abb. 4.2). Die Charakteristika der einzelnen Patienten sind dem Anhang zu entnehmen (siehe 7.1). Die Frequenz tumorreaktiver Gedächtnis T-Zellen lag bei 578 ( $\pm$  461) pro  $10^6$  Gesamt T-Zellen. Folglich wurde das Malignom in einem Viertel aller Kopf-Hals-Tumorpatienten vom T-zellvermittelten Immunsystem spontan erkannt.



**Abb. 4.2: Tumorspezifische Gedächtnis T-Zellreaktivität bei Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

Dargestellt ist eine Zusammenfassung mittels kurzzeitigem IFN- $\gamma$  ELISpot Test untersuchter Patienten (n=69). Die Anzahl reaktiver Patienten (grüner Balken; n=17) ist der Anzahl nicht reaktiver (weißer Balken; n=52) gegenübergestellt.  $10^5$  T-Zellen aus Blut (PB) und/oder Lymphknoten (LK) wurden für 40 Stunden mit autologen dendritischen Zellen stimuliert, die mit autologem Tumor- oder Kontrolllysat vorinkubiert worden waren. Ein Patient wurde als immunologisch reaktiv eingestuft, wenn die Anzahl der IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen signifikant höher lag als die der entsprechenden Negativkontrolle (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ). Die Zahlen geben die Anzahl getesteter reaktiver bzw. nicht reaktiver Patienten an, während sich die Prozentangabe auf die Gesamtimmunreaktivität innerhalb der Gruppe bezieht.

Für die Mehrheit der analysierten Patienten lagen histopathologische Charakteristika und Angaben zum Krankheitsverlauf vor (siehe 7.1). Die Stadieneinteilung erfolgte nach den aktuellen Vorgaben der International Union Against Cancer (2002). Zur Erfassung der klinischen Relevanz von An- bzw. Abwesenheit einer Tumor-Immunreaktivität wurden die Patientendaten mit den entsprechenden IFN- $\gamma$  ELISpot Analysen korreliert. Im Hinblick auf Größe bzw. lokale Ausdehnung des Primärtumors, Lymphknotenbefall und Fernmetastasierung hat sich ergeben, dass sich tumorreaktive Patienten sowohl in frühen Stadien (I-III; n=8) als auch ca. die Hälfte im weiter fortgeschrittenen Spätstadium (IV; n=9) der Tumorerkrankung finden ließen. Dagegen gehörte der Hauptteil (ca. 80%) nicht reaktiver Patienten signifikant ( $p \leq 0,05$ ) dem Stadium IV (38/48; Abb. 4.3) an. Somit scheinen Kopf-Hals-Tumore im Spätstadium die Manifestation von Immunantworten besonders zu blockieren.

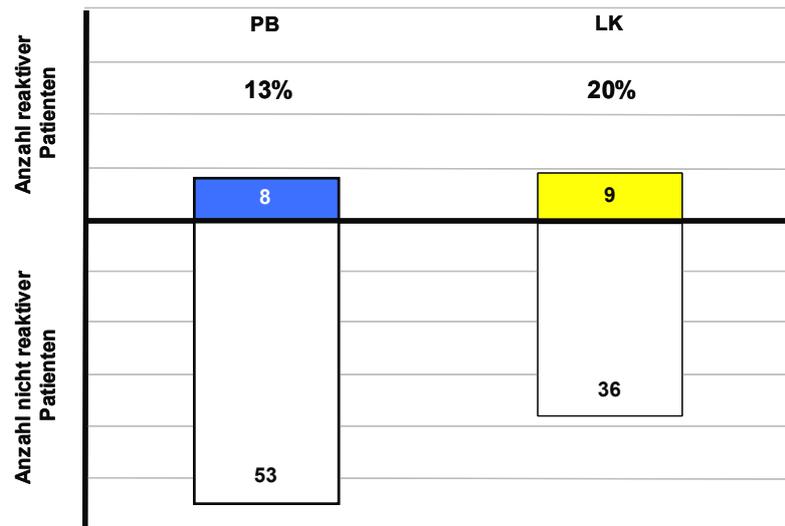


**Abb. 4.3: Tumorspezifische Gedächtnis T-Zellreaktivität bei Kopf-Hals-Tumorpatienten in Abhängigkeit des Tumorstadiums.**

Dargestellt ist die Verteilung mittels kurzzeitigem IFN- $\gamma$  ELISpot Test untersuchter Patienten (n=65) in verschiedenen Tumorstadien (Stadium I-III links, IV rechts). Die Anzahl reaktiver Patienten (grüner Balken; n=8 bzw. 9) ist der Anzahl nicht reaktiver (weißer Balken; n=10 bzw. 38) gegenübergestellt. \* zeigt einen signifikanten Unterschied in der Tumorreaktivität bei Stadium I-III im Vergleich zu Stadium IV Patienten (Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest  $p \leq 0,05$ ). Die Prozente beziehen sich auf die Anzahl getesteter reaktiver bzw. nicht reaktiver Patienten innerhalb der Stadien I-III und IV.

#### 4.1.2 Lokalisation tumorreaktiver Gedächtnis T-Zellen bei Kopf-Hals-Tumorpatienten

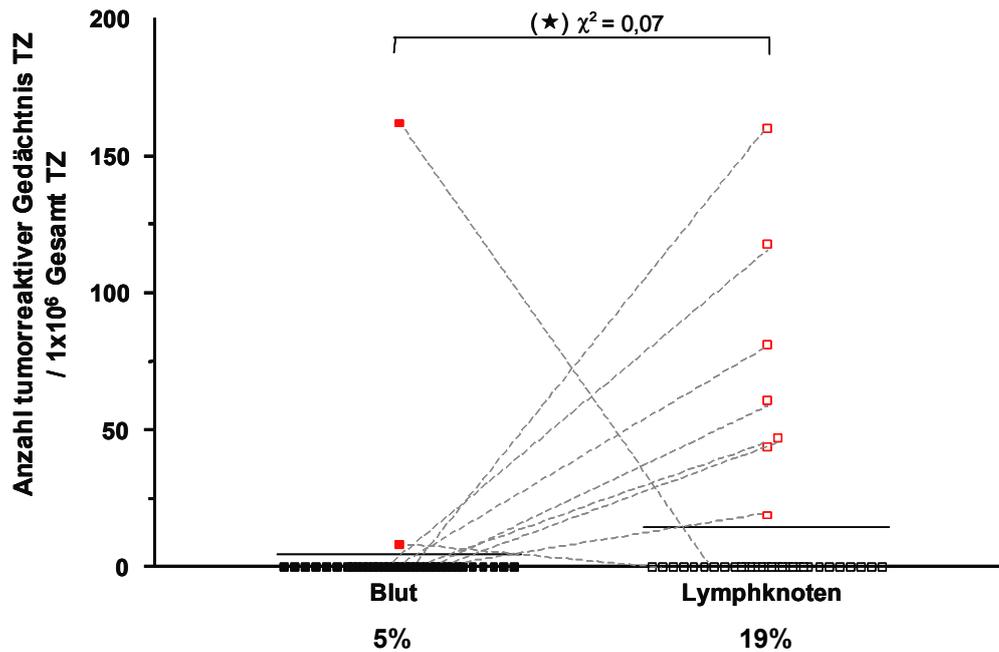
Als Nächstes sollte das Vorkommen tumorreaktiver Gedächtnis T-Zellen in den verschiedenen Zellkompartimenten genauer betrachtet werden. Nach Berücksichtigung der immunologischen Reaktivität, wie in Abschnitt 4.1 beschrieben, ergab sich ein statistisch gesichertes Bild der Lokalisation des Anti-Tumorgedächtnisses. Aus 61 bzw. 45 untersuchten Blut- und Lymphknotenproben entsprechend ließ sich eine höhere spontane Tumorreaktivität des sekundären lymphatischen Organs auszeichnen, nämlich 20% gegenüber 13% (Abb. 4.4).

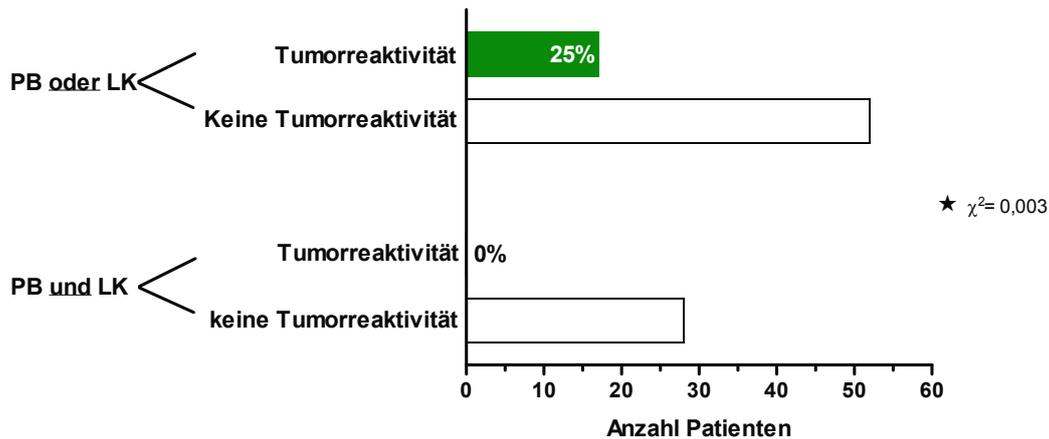


**Abb. 4.4: Tumorspezifische Gedächtnis T-Zellreaktivität in Blut und Lymphknoten bei Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

Dargestellt ist eine Zusammenfassung mittels kurzzeitigem IFN- $\gamma$  ELISpot Test untersuchter Patienten für Blut (links, n=61) und Lymphknoten (rechts, n=45). Die Anzahl reaktiver Patienten in Blut (blauer Balken; n=8) und Lymphknoten (gelber Balken; n=9) ist der Anzahl nicht reaktiver Patienten (weiße Balken; n=53 bzw. 36) gegenübergestellt.  $10^5$  T-Zellen aus Blut (PB) und/oder Lymphknoten (LK) wurden für 40 Stunden mit autologen dendritischen Zellen stimuliert, die mit autologem Tumor- oder Kontrolllysat vorinkubiert worden waren. Ein Patient wurde als immunologisch reaktiv eingestuft, wenn die Anzahl der IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen signifikant höher lag als die der entsprechenden Negativkontrolle (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ). Die Zahlen geben die Anzahl getesteter reaktiver bzw. nicht reaktiver Patienten an, während sich die Prozentangaben auf die Gesamtimmunreaktivität innerhalb der jeweiligen Gruppen beziehen.

Innerhalb der 69 im kurzzeitigen IFN- $\gamma$  ELISpot Test analysierten Patienten, die für peripheres Blut und/oder tumordrainierenden, nicht metastasierten Lymphknoten nach Tumorreaktivität untersucht wurden, gab es 37 Patienten, für die beide Zellkompartimente gleichzeitig geprüft werden konnten. Für diese Patientenkohorte war eine direkte Gegenüberstellung des peripheren und des lymphatischen Gewebes zur Lokalisation von tumorgerichteter Gedächtnis T-Zellantwort möglich. Die Bewertung dieser 37 Patienten ergab, dass sich tumorspezifische Gedächtnis T-Zellenantworten primär im Lymphknoten zu finden sind (Abb. 4.5). Dabei existierte ein auffällig höherer Anteil von Tumorreaktivität in Lymphknotenzellen (19%; 7/37) als in Blutlymphozyten (5%; 2/37;  $p=0,07$ ).

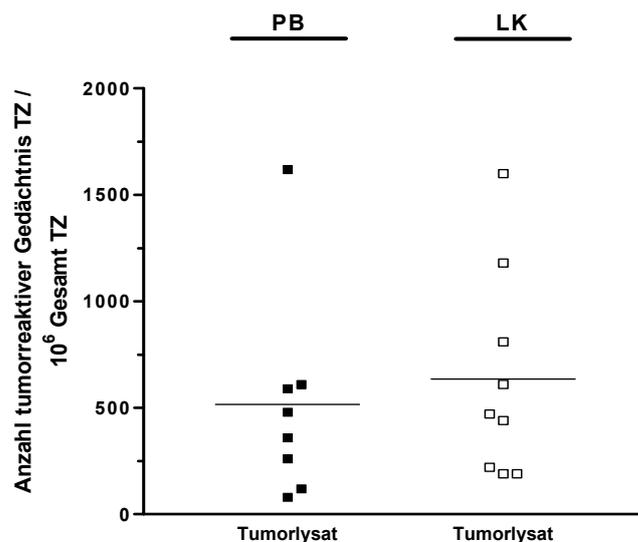




**Abb. 4.6: Tumorspezifische Gedächtnis T-Zellreaktivität in Blut oder Lymphknoten bei Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

Dargestellt ist eine Zusammenfassung mittels kurzzeitigem IFN- $\gamma$  ELISpot Test untersuchter Patienten für Blut und/oder Lymphknoten. Die Anzahl reaktiver bzw. nicht reaktiver Patienten in Blut (PB) oder Lymphknoten (LK; oben; n=69) ist der Anzahl solcher Patienten gleichzeitig in Blut und Lymphknoten untersucht gegenübergestellt (unten; n=37).  $10^5$  T-Zellen aus Blut und Lymphknoten wurden für 40 Stunden mit autologen dendritischen Zellen stimuliert, die mit autologem Tumor- oder Kontrolllysat vorinkubiert worden waren. Ein Patient wurde als immunologisch reaktiv eingestuft, wenn die Anzahl der IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen signifikant höher lag als die der entsprechenden Negativkontrolle (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ). \* zeigt, dass signifikant keine gemischte Tumorreaktivität in Blut und Lymphknoten gleichzeitig vorkommt (Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest  $p \leq 0,05$ ). Die Prozentangaben beziehen sich auf die Gesamtimmunreaktivität innerhalb der jeweiligen Gruppen.

Die Frequenzen tumorspezifischer Zellen der 69 Kopf-Hals-Tumorpatienten lagen im Durchschnitt für das periphere Blut bei 515, für den tumordrainierenden, nicht metastasierten Lymphknoten bei 634 pro  $10^6$  Gesamt T-Zellen. Auch hier war ein tendenzieller Unterschied zwischen beiden Kompartimenten zu erkennen. Dessen ungeachtet war in beiden Fällen die Variationsbreite sehr groß (Abb. 4.7).



**Abb. 4.7: Frequenzen tumorreaktiver Gedächtnis T-Zellen in Blut und Lymphknoten bei Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

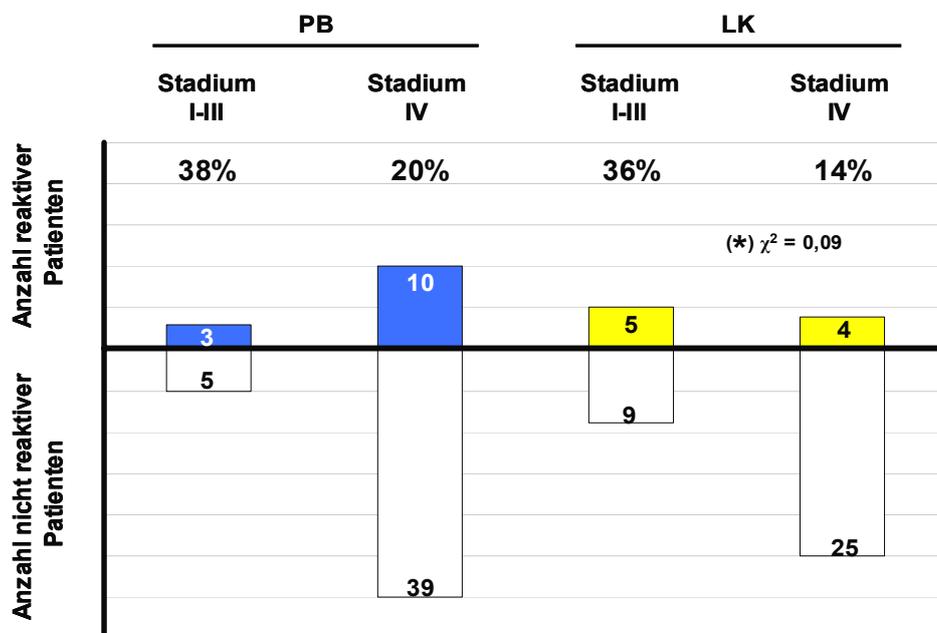
Dargestellt ist die Anzahl IFN- $\gamma$  produzierender Gedächtnis T-Zellen des Blutes (PB; links; geschlossene Quadrate) und Lymphknotens (LK; rechts; offene Quadrate) pro  $10^6$  Gesamt T-Zellen nach Detektion im kurzzeitigen IFN- $\gamma$  ELISpot Test.  $10^5$  T-Zellen aus Blut und/oder Lymphknoten wurden für 40 Stunden mit autologen dendritischen Zellen stimuliert, die mit autologem Tumor- oder Kontrolllysate vorinkubiert worden waren. Ein Patient wurde als immunologisch reaktiv eingestuft, wenn die Anzahl der IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen signifikant höher lag als die der entsprechenden Negativkontrolle (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ). Die Frequenz tumorreaktiver T-Zellen für die eingesetzte Gesamt T-Zellzahl ergab sich nach Subtraktion der unspezifischen Reaktivität in der entsprechenden Negativkontrolle. Die waagerechten Linien stellen den jeweiligen Mittelwert der untersuchten Gruppe dar.

Unterschiede im Anti-Tumorgedächtnis von peripherem Blut und tumordrainierendem, nicht metastasiertem Lymphknoten konnten auch im Hinblick auf die klinischen Patientendaten festgestellt werden. Die Korrelationen dieser mit den IFN- $\gamma$  ELISpot Analysen ergaben aufschlussreiche Informationen über Tumorstadium und TNM- Klassifizierung, die unterschiedlich für Immunreaktivität in Blut und Lymphknoten war.

Im Falle der Stadieneinteilung konnte für reaktive Patienten beobachtet werden, dass die Mehrheit (ca. 80%) solcher mit Immunitäntworten im Blut ein Spätstadium (IV; 10/13) aufwies. Dagegen waren Patienten mit Tumorreaktivität im Lymphknoten sowohl in frühen (I-III, n=5) als auch in späten (IV; n=4) Stadien unterteilt (Abb. 4.8). Für nicht reaktive Patienten war kein Unterschied festzustellen. Zwischen dem peripheren und lymphatischen Organ Tumorimmunität bestand gegenläufige Immunität. Dieser Befund spricht für eine frühe Tumor-Immunauslösung im lymphatischen Organ. Bereits zu Beginn einer

Tumorerkrankung findet dort eine Induktion primärer, tumorspezifischer T-Zellantworten durch eingewanderte, tumorantigenbeladene dendritische Zellen.

In dieser Korrelationsanalyse konnte nur im Lymphknoten eine auffällig erhöhte ( $p=0,09$ ) Verteilung tumorreaktiver Patienten in frühen (5/14, 36%) und späten Stadien (4/29, 14%) im Vergleich zu nicht reaktiven (9/14, 64% bzw. 25/29, 86%) beobachtet werden (Abb. 4.8).

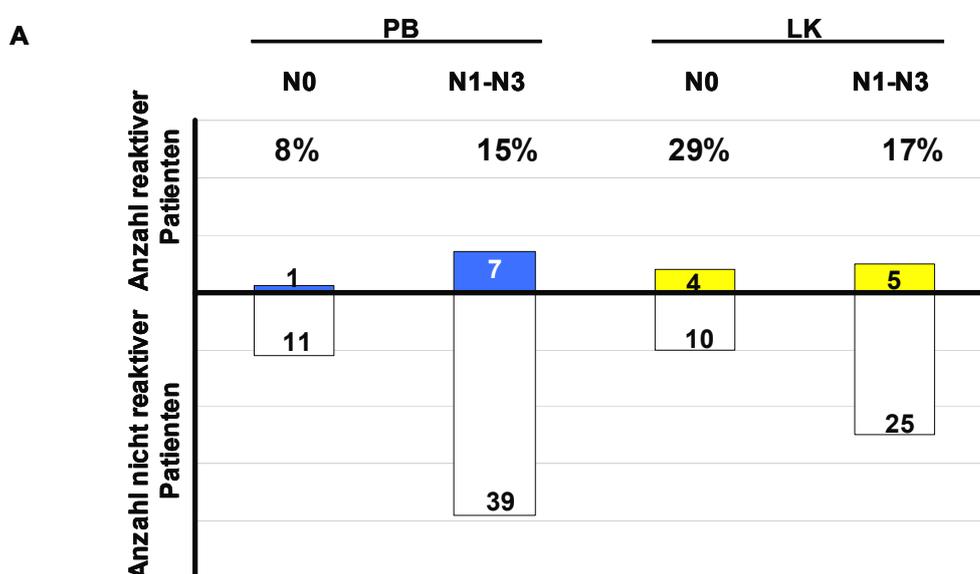


**Abb. 4.8: Verteilung des Anti-Tumorgedächtnisses in Blut und Lymphknoten innerhalb des Tumorstadiums bei Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

Dargestellt ist die Verteilung mittels kurzzeitigem IFN- $\gamma$  ELISpot Test untersuchter Patienten für Blut (PB; links;  $n=57$ ) und Lymphknoten (LK; rechts;  $n=43$ ) in verschiedenen Tumorstadien (Stadium I-III jeweils links, IV jeweils rechts). Die Anzahl reaktiver Patienten in Blut (blaue Balken;  $n=3$  bzw. 10) und Lymphknoten (gelbe Balken;  $n=5$  bzw. 4) ist der Anzahl nicht reaktiver (weiße Balken;  $n=5$ , 39, 9 bzw. 25) gegenübergestellt. Die Zahlen geben die Anzahl getesteter reaktiver bzw. nicht reaktiver Patienten an, während sich die Prozentangaben auf die Gesamtimmunreaktivität innerhalb der jeweiligen Gruppen beziehen. (\*) zeigt einen auffälligen Unterschied in der Tumorreaktivität des Lymphknotens bei Stadium I-III im Vergleich zu Stadium IV Patienten (Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest  $p=0,09$ ).

Die oben erwähnte Annahme, dass eine Immunreaktivität im Blut erst dann zustande kommen könnte, wenn sich metastasierende Tumorzellen in der Zirkulation befinden, konnte die Korrelation der IFN- $\gamma$  ELISpot Analysen mit der TNM-Klassifizierung bekräftigen. Die Involvierung von Lymphknoten (N0 kein Befall, N1-N3 zunehmender Befall von Lymphknoten) ging mit einer Erhöhung der Tumor-Immunreaktivität der Blut T-Zellen einher (8%,  $n=1$  für N0; 15%,  $n=7$  für N1-N3; Abb. 4.9). Für Immunantworten der

Lymphknotenzellen (29%, n=4 für N0; 17%, n=5 für N1-N3) konnte noch einmal Gegenläufiges beobachtet werden. Die Verteilung der 50 nicht reaktiven Patienten innerhalb des N-Status war für beide Zellkompartimente ähnlich (im Blut 92%, n=11 für N0; 85%, n=39 für N1-N3; im Lymphknoten 71%, n=10 für N0; 83%, n=25 für N1-N3). Zusammengefasst demonstrierte die Mehrheit peripher tumorreaktiver Kopf-Hals-Tumorpatienten Involvierung von Lymphknoten (7/8 N1-N3), während dies für ca. die Hälfte solcher mit lymphatischer Tumorummunität wahr war (5/9 N1-N3). Die Verteilung der Patienten innerhalb des N-Status (Abb. 4.9) war ähnlich wie jene, innerhalb der Tumorstadien (Abb. 4.8). Tatsächlich beeinflusste die N-Klassifizierung die Stadieneinteilung der gesamten Patientenkohorte signifikant (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4.9: Verteilung der N-Klassifizierung innerhalb peripher und lymphatisch untersuchter Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

Dargestellt ist die Verteilung mittels kurzzeitigem IFN- $\gamma$  ELISpot Test untersuchter Patienten für Blut (PB; links; n=58) und Lymphknoten (LK; rechts; n=44) in verschiedenen Lymphknotenstadien (N0 bzw. N1-N3). Die Anzahl reaktiver Patienten in Blut (blaue Balken; n=8) und Lymphknoten (gelbe Balken; n=9) ist der Anzahl nicht reaktiver (weiße Balken; n=11, 39, 10 bzw. 25) gegenübergestellt. Die Zahlen geben die Anzahl getesteter reaktiver bzw. nicht reaktiver Patienten an, während sich die Prozentangaben auf die Gesamtimmunreaktivität innerhalb der jeweiligen Gruppen beziehen.

Weitere Analysen der klinischen Patientendaten ergaben erwähnenswerte Korrelationen (Daten nicht gezeigt). In einer Patientenkohorte von 29 Patienten manifestierten sich Rezidive innerhalb der ersten drei Jahre der Tumorerkrankung ca. drei Mal weniger bei

Patienten mit tumorspezifischen Gedächtnis T-Zellen im Lymphknoten als bei solchen mit Tumor-Immunreaktivität der Blut T-Zellen. Dagegen demonstrierte eine deutliche Mehrheit der Patienten in Abwesenheit von Tumorreaktivität Rezidivmanifestation. Im Gegensatz dazu exhibierten im Tumorerkrankte mit Tumorreaktivität der Blut T-Zellen die längste Überlebens- und progressionsfreie Zeit, während für solche mit tumorspezifischen Lymphknoten T-Zellen die kürzeste zu verzeichnen war (gesamtes Kollektiv). Nicht tumorreaktive Patienten waren zwischen den oben genannten Gruppen vertreten. Da beide Befunde nicht signifikant sind und die Patientenkohorten unterschiedlich groß sind, lässt sich keine abschließende klinische Relevanz der Tumor-Immunreaktivität bei Kopf-Hals-Tumorpatienten erkennen.

## 4.2 Lymphozytenpopulationen tumorreaktiver Gedächtnis T-Zellen bei primär operierten Kopf-Hals-Tumorpatienten

In vorhergehenden Experimenten konnte eine Anreicherung von tumorspezifischen Gedächtnis T-Zellen in Kopf-Hals-Tumorpatienten nachgewiesen werden. Dabei wurde die gesamte T-Zellpopulation, bestehend aus CD4 und CD8 T-Zellen, untersucht. Ob eine dieser Subpopulationen verstärkt an der IFN- $\gamma$  Sekretion im kurzzeitigen ELISpot Test nach Reaktivierung mit tumorantigenpräsentierenden dendritischen Zellen beteiligt ist, wurde bisher nicht analysiert. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde nun der kurzzeitige IFN- $\gamma$  ELISpot Test nicht mehr mit Gesamt T-Zellen, sondern jeweils mit CD4 und CD8 Zellen durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden die CD4 und CD8 T-Zellen aus peripherem Blut und tumordrainierendem, nicht metastasiertem Lymphknoten von 19 Patienten tumorimmunologisch charakterisiert. Die verhältnismäßig kleinere Anzahl untersuchter Patienten war durch die Verdoppelung an nötigem Zell- und Lysatmaterial zur Versuchsdurchführung bedingt.

### 4.2.1 Verteilung von CD4 und CD8 T-Zellsubpopulationen in Blut und Lymphknoten bei Kopf-Hals-Tumorpatienten

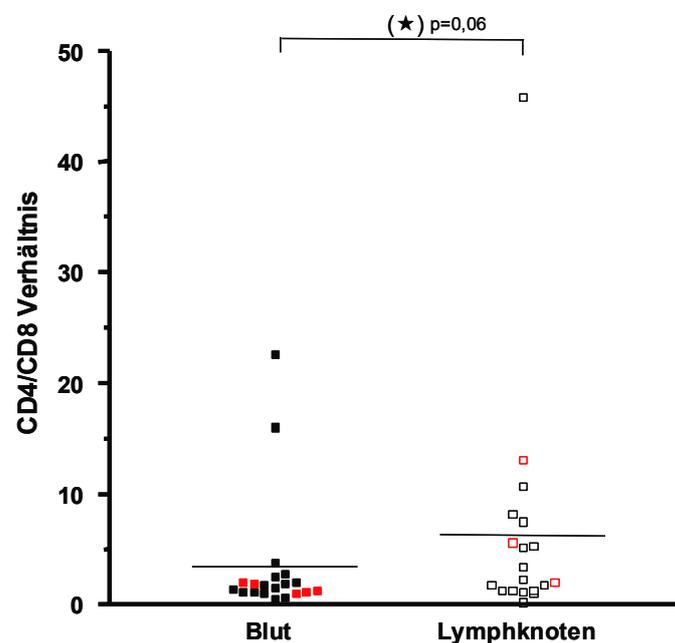
Vorraussetzung für die Anfertigung von kurzzeitigem IFN- $\gamma$  ELISpot Test mit CD4 und CD8 T-Zellen war die Isolation der Subpopulationen aus dem Gesamt T-Zellpool. Die quantitative Erfassung dieser Lymphozyten aus 19 Kopf-Hals-Tumorpatienten (Tab. 4.1) zeigte prozentual eine wesentliche Abnahme der Zellzahlen des peripheren Blutes im Vergleich zu Angaben gesunder Spender in der Literatur (Battaglia *et al.*, 2003).

	Kopf-Hals-Tumorpatienten	
	PB	LK
% CD4	17	31
% CD8	9	10
CD4/CD8 Verhältnis	3,4	6,2

**Tab. 4.1: CD4 und CD8 Subpopulationen bei Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

Dargestellt ist eine Auflistung des gemittelten prozentualen Vorkommens CD4 und CD8 T-Zellen innerhalb der T-Lymphozytenpopulation, sowie das gemittelte CD4/CD8 Verhältnis in Blut und Lymphknoten bei Kopf-Hals-Tumorpatienten (n=19). Die Verteilung der Subpopulationen wurde mittels MACS<sup>®</sup> positiver Selektion untersucht.

Sowohl in Blut als auch im Lymphknoten waren anteilig mehr CD4 als CD8 T-Zellen vorhanden ( $p \leq 0,05$ ; Tab. 4.1). Eine kompartmentenspezifische Verteilung gab es in dem Vorkommen von CD4 T-Zellen zugunsten des lymphatischen Organs ( $p \leq 0,05$ ). Dies wird im Verhältnis von CD4 zu CD8 deutlich (Abb. 4.10): es fiel im tumordrainierenden, nicht metastasierten Lymphknoten auffällig größer aus ( $p=0,06$ ). Bei Spendern war das CD4/CD8 Verhältnis für beide untersuchten Zellkompartimente um ca. 1,5 Mal kleiner (Battaglia *et al.*, 2003). Demzufolge scheint die maligne Erkrankung die Lymphozytenkomposition untersuchter Kopf-Hals-Tumorpatienten zu beeinflussen.



**Abb. 4.10: Quantitative Verteilung von CD4 und CD8 T-Zellen in Blut und Lymphknoten bei Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

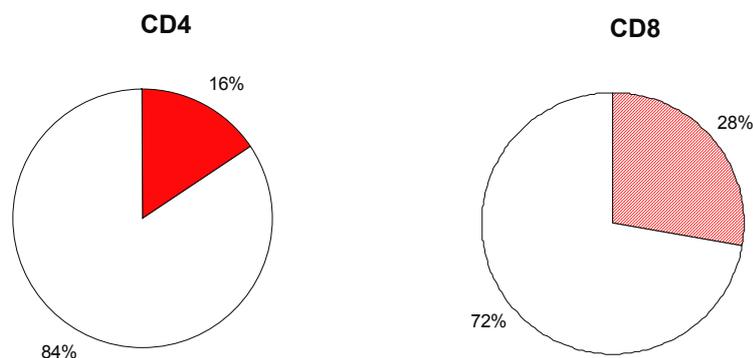
Dargestellt ist eine Zusammenfassung aller gebildeter CD4/CD8 Quotienten für isolierte Zellen des Blutes (geschlossene Quadrate;  $n=20$ ) und Lymphknotens (offene Quadrate;  $n=19$ ). Immunologisch reaktive Patienten sind mit rot markiert. Nicht alle hier gezeigten Patienten wurden im IFN- $\gamma$  ELISpot getestet. (\*) zeigt eine signifikante Erhöhung des CD4/CD8 Verhältnisses im Lymphknoten im Vergleich zum Blut (Mann-Whitney nicht parametrischer U Test; gepaarter Student'scher t-Test  $p=0,06$ ). Die waagerechten Linien stellen den jeweiligen Mittelwert der untersuchten Gruppe dar.

#### 4.2.2 Tumorreaktive CD4 und CD8 T-Zellen innerhalb der Gedächtnispopulation von Blut und Lymphknoten bei Kopf-Hals-Tumorpatienten

Die tumorspezifische Reaktivität von CD4 und CD8 Gedächtnis T-Zellen bei Kopf-Hals-Tumorpatienten wurde anhand der Anzahl IFN- $\gamma$  produzierender Blut- und Lymphknotenzellen im ELISpot Test durchgeführt. Die Beurteilung der immunologischen Reaktivität und die Berechnung der Frequenz tumorreaktiver Zellen erfolgten wie in Abschnitt 4.1 beschrieben.

Sechs von insgesamt 19 untersuchten Patienten zeigten immunologisches Ansprechen auf ihren Tumor für CD4 und/oder CD8 Zellen aus Blut und/oder Lymphknoten (32%). Somit war der Gesamtanteil tumorreaktiver Patienten in dieser Experimentengruppe leicht erhöht gegenüber dem unter 4.1.1 (25%) beschriebenen. Es bestand jedoch keine statistische Signifikanz. Dieser Befund kann dadurch erklärt werden, dass sich die Kohorten in ihrer Patientenanzahl unterscheiden, nämlich 19 gegenüber 69 Patienten. Es ist denkbar, dass sich die CD8 Reaktivität, bedingt durch die Trennung von CD4 und CD8, von Th2-polarisierten CD4 Zellen nicht beeinträchtigen lies. Dafür spricht auch die Tatsache dass erstmalig in dieser Experimentengruppe eine gemischte Tumor-Immunantwort (sowohl im Blut als auch im Lymphknoten) bei zwei Patienten zu finden war.

Hinsichtlich der Tumor-Immunreaktivität von CD4 und CD8 Zellen aus Blut und/oder Lymphknoten im kurzzeitigen IFN- $\gamma$  ELISpot Test konnten 19 bzw. 18 Patienten analysiert werden. Es hat sich rausgestellt, dass sich Tumorreaktivität in der zytotoxischen Lymphozytenpopulation (5/18; 28%) öfter finden lies als in der Helferfraktion (3/19; 16%; Abb. 4.11).

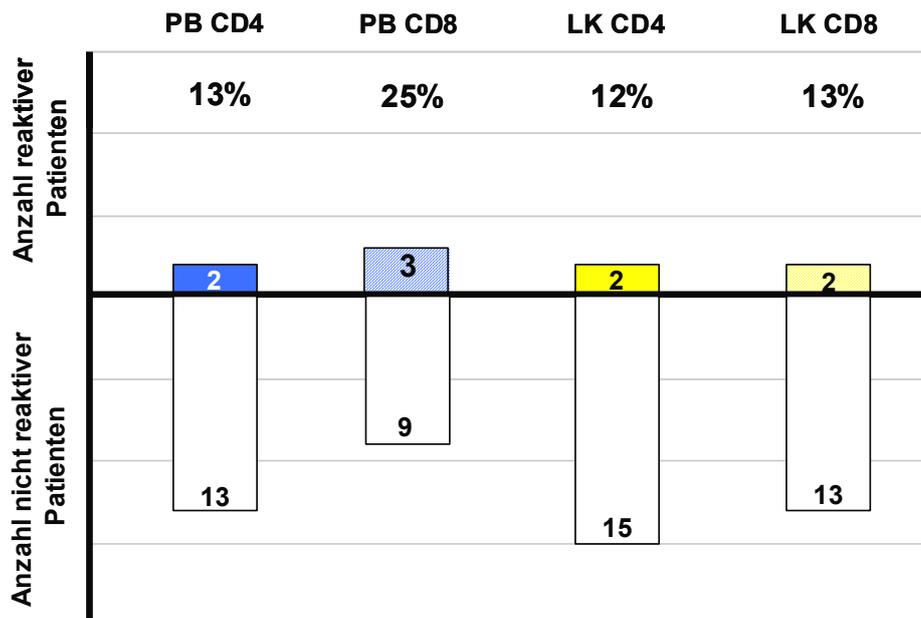


**Abb. 4.11: Tumorspezifische CD4 und CD8 Gedächtnis T-Zellreaktivität bei Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

Dargestellt ist eine Zusammenfassung mittels kurzzeitigem IFN- $\gamma$  ELISpot Test untersuchter Patienten für CD4 (links, n=19) und CD8 T-Zellen (rechts, n=18). Der Anteil reaktiver Patienten (rot) ist dem Anteil nicht reaktiver (weiß) in einem Tortendiagramm gegenübergestellt (CD4 gefüllt, n=3; CD8 gestreift, n=5). 10<sup>5</sup> CD4 und/oder CD8

T-Zellen aus Blut und/oder Lymphknoten wurden für 40 Stunden mit autologen dendritischen Zellen stimuliert, die mit autologem Tumor- oder Kontrolllysate vorinkubiert worden waren. Ein Patient wurde als immunologisch reaktiv eingestuft, wenn die Anzahl der IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen signifikant höher lag als die der entsprechenden Negativkontrolle (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ). Die Prozentangaben beziehen sich auf die Gesamtimmunreaktivität innerhalb der jeweiligen Gruppen.

Von großem Interesse war nun die Frage, ob sich das periphere Blut in seiner CD4 und/oder CD8 Tumorimmunität vom tumordrainierenden, nicht metastasierten Lymphknoten unterscheidet. Tatsächlich konnte eine Heterogenität beobachtet werden (Abb. 4.12). CD8 Gedächtnis T-Zellen des Blutes waren häufiger tumorreaktiv als CD4, nämlich 25% (3/12) gegenüber 13% (2/15) der Patienten. Dagegen waren für die Lymphknotenpopulationen die Immunantworten gleich: CD4 reaktive Patienten gab es in 12% (2/17) der Fälle, während es für CD8 13% (2/15) waren. Der oben genannte Unterschied im peripheren Blut war jedoch nicht statistisch signifikant.

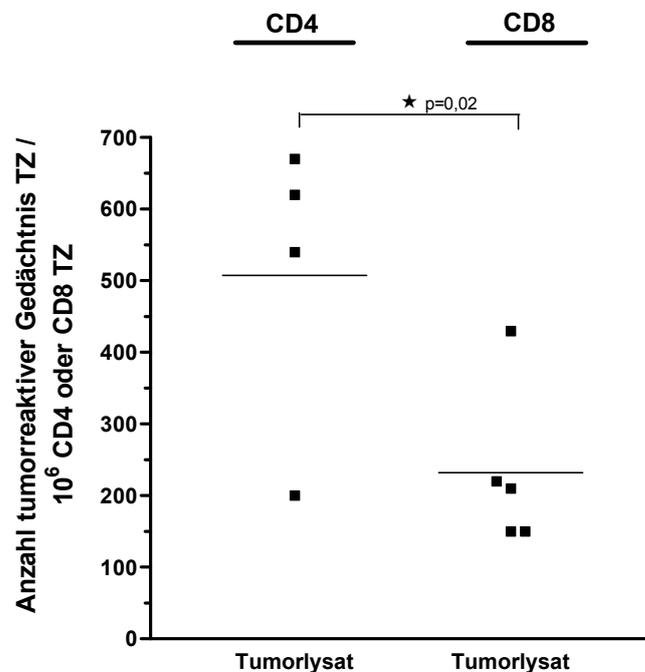


**Abb. 4.12: Tumorspezifische CD4 und CD8 Gedächtnis T-Zellreaktivität in Blut und Lymphknoten bei Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

Dargestellt ist eine Zusammenfassung mittels kurzzeitigem IFN- $\gamma$  ELISpot Test untersuchter Patienten für CD4 (gefüllte Balken) und/oder CD8 (gestreifte Balken) in Blut (blaue Balken) und/oder Lymphknoten (gelbe Balken). Die Anzahl reaktiver Patienten (farbige Balken) ist der Anzahl nicht reaktiver Patienten (weiße Balken) gegenübergestellt.  $10^5$  CD4 und/oder CD8 T-Zellen aus Blut und/oder Lymphknoten wurden für 40 Stunden mit autologen dendritischen Zellen stimuliert, die mit autologem Tumor- oder Kontrolllysate vorinkubiert worden waren. Ein Patient wurde als immunologisch reaktiv eingestuft, wenn die Anzahl der IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen signifikant höher lag als die der entsprechenden Negativkontrolle (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ).

Die Zahlen geben die Anzahl getesteter reaktiver bzw. nicht reaktiver Patienten an, während sich die Prozentangaben auf die Gesamtimmunreaktivität innerhalb der jeweiligen Gruppen beziehen.

Sehr informative Aufschlüsse ergab die Bestimmung der Frequenz tumorspezifischer CD4 und CD8 Gedächtnis T-Zellen. Sowohl für peripheres Blut ( $410$  pro  $10^6$  CD4 T-Zellen;  $287$  pro  $10^6$  CD8 T-Zellen) als auch für tumordrainierenden, nicht metastasierten Lymphknoten ( $605$  pro  $10^6$  CD4 T-Zellen;  $150$  pro  $10^6$  CD8 T-Zellen) konnte eine höhere Frequenz tumorspezifischer CD4 Zellen beobachtet werden. Für das lymphatische Organ war dies sogar statistisch signifikant ( $p \leq 0,05$ ). Erfasst aus Blut und Lymphknoten zusammen, lies sich eine ebenso signifikant höhere Frequenz tumorreaktiver CD4 Zellen im Vergleich zu CD8 ( $p \leq 0,05$ ) erkennen (Abb. 4.13).



**Abb. 4.13: Frequenzen tumorreaktiver CD4 und CD8 Gedächtnis T-Zellen bei Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

Dargestellt ist die Anzahl IFN- $\gamma$  produzierender CD4 (links,  $n=4$ ) und CD8 (rechts,  $n=5$ ) Gedächtnis T-Zellen des Blutes und/oder Lymphknotens pro  $10^6$  CD4 bzw. CD8 T-Zellen nach Detektion im kurzzeitigen IFN- $\gamma$  ELISpot Test.  $10^5$  CD4 und/oder CD8 T-Zellen aus Blut und/oder Lymphknoten wurden für 40 Stunden mit autologen dendritischen Zellen stimuliert, die mit autologem Tumor- oder Kontrolllysat vorinkubiert worden waren. Ein Patient wurde als immunologisch reaktiv eingestuft, wenn die Anzahl der IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen signifikant höher lag als die der entsprechenden Negativkontrolle (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ). Die Frequenz tumorreaktiver T-Zellen für die eingesetzte CD4 bzw. CD8 T-Zellzahl ergab sich nach Subtraktion der unspezifischen Reaktivität in der entsprechenden Negativkontrolle. \* zeigt eine signifikante Erhöhung der Frequenz tumorspezifischer CD4 T-Zellen im Vergleich zu CD8 (Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ; Mann-Whitney nicht

parametrischer U Test  $p \leq 0,05$ ). Die waagerechten Linien stellen den jeweiligen Mittelwert der untersuchten Gruppe dar.

Zusammengefasst deuten diese Untersuchungen darauf hin, dass sowohl zytotoxische als auch Helfer T-Zellen Anti-Tumorgedächtnis erlangen könnten. Erstmals ist gezeigt worden, dass die im kurzzeitigen IFN- $\gamma$  ELISpot erfassten Immunreaktivitäten beiden T-Zellsubpopulationen zuzuordnen sind. Interessant dabei ist die Tatsache, dass CD8 T-Zellen öfter als CD4 tumorimmunologisch reagierten, letztere jedoch in einer höheren Frequenz existierten. Ob es sich hierbei eventuell um polyklonale, kleinere CD8 und oligoklonale, stark proliferierende CD4 Populationen handelte, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Dafür würde jedoch die höhere Anzahl CD4 als CD8 T-Zellen in Blut und Lymphknoten sprechen.

### 4.3 Nachweis Tumorassoziierter antigenreaktiver Gedächtnis T-Zellen bei primär operierten Kopf-Hals-Tumorpatienten

Ein Schritt in Richtung Charakterisierung der Klone tumorreaktiver CD8 Gedächtnis T-Zellen ist dennoch unternommen worden. Hierfür wurden Peptide aus immundominanten Epitopen bekannter, in Kopf-Hals-Tumoren überexprimierter tumorassoziierter Antigene verwendet. Dabei handelte es sich um die Tumorantigene MUC-1, Her-2/neu, EGFR, p53, MAGE-3 und Heparanase. Die aus neun Aminosäuren bestehenden Peptide wurden anstelle von Tumorlysat dendritischen Zellen zur Aktivierung gegeben. Als Negativkontrolle dienten ebenso kurze Peptide aus einem Auto- (RNA Helikase) und einem Fremdartigen (HIV gag). Die Nonamere werden im Kontext vom MHC I Molekül HLA-A2 präsentiert und ausschließlich von CD8 T-Zellen erkannt.

Die T-Zellen von sieben Kopf-Hals-Tumorpatienten, sowie diejenigen von neun gesunden Spendern, zur Erfassung der Hintergrundreaktivität, wurden tumorimmunologisch analysiert. Alle Personen waren HLA-A2 positiv und HIV negativ.

Der kurzzeitige IFN- $\gamma$  ELISpot Test wurde für Tumorpatienten und gesunden Spender wie unter 4.1 beschrieben durchgeführt und evaluiert.

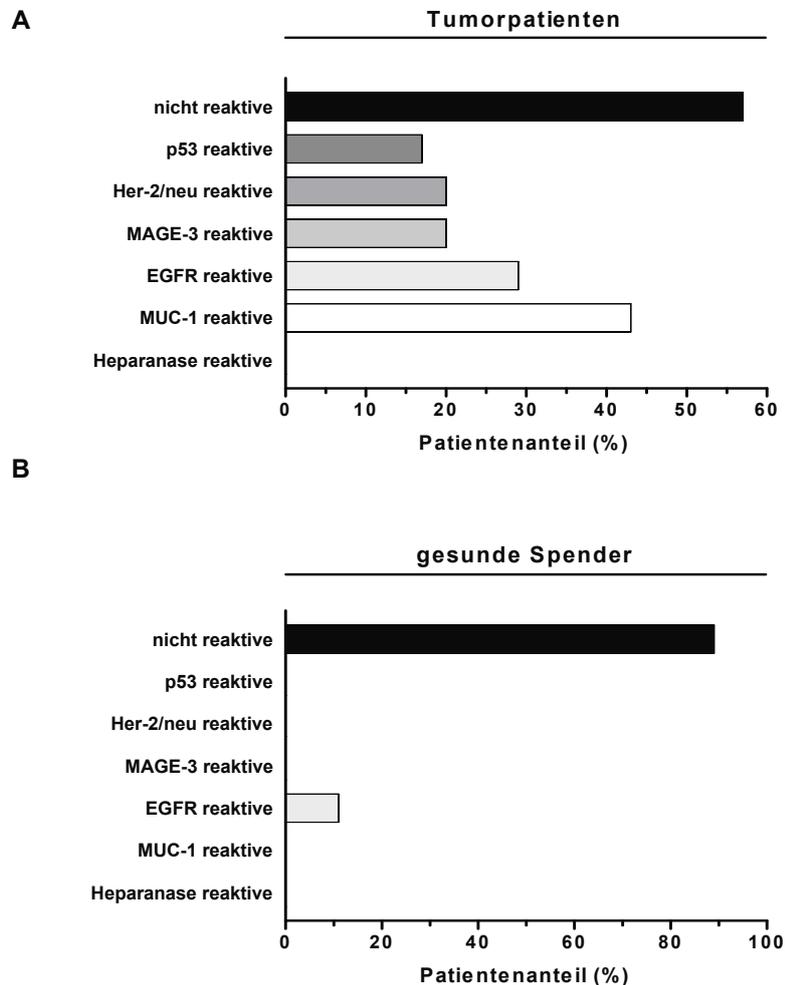
In der vorliegenden Arbeit wurden sieben Kopf-Hals-Tumorpatienten, die mittels Durchflusszytometrie nachweislich HLA-A2 positiv waren, nach dem Vorkommen tumorantigenspezifischer Klone untersucht. Davon waren drei Patienten (43%) für mindestens eins der untersuchten tumorassozierten Antigene reaktiv. Tumorimmunologisches Ansprechen zeigte sich für MUC-1 (3/7), EGFR (2/7), MAGE-3 (1/5), Her-2/neu (1/5) und P53 (1/6). Bei neun gesunden Spendern fiel der Anteil viel kleiner aus. Lediglich ein Spender (11%) zeigte Reaktivität, hier jedoch gegen ein einziges Tumorantigen, nämlich EGFR (Abb. 4.14).

Die Gesamtimmunreaktivität (43%) war hier deutlich höher als bei den Experimentengruppen (25 bzw. 32%) zuvor. Dies liegt möglicherweise daran, dass hier die unspezifische Reaktivität der Kontrollpeptide sehr viel geringer als beim Kontrolllysat ausfiel. Dadurch wurde die Detektionsschwelle gesenkt.

Eine Unterscheidung zwischen Blut- und Lymphknotenimmunität war in dieser Patientenkohorte aufgrund der kleinen Anzahl nicht möglich.

Die Frequenzen tumorantigenspezifischer Gedächtnis T-Zellen waren deutlich niedriger als bei den Experimentengruppen zuvor. Eine nicht weiter verwunderliche Beobachtung, da hier nur Tumor-Immuntantworten einer einzigen Spezifität aufgeschlüsselt wurden. So betrug die Frequenzen pro  $10^6$  Gesamt T-Zellen 130 für MUC-1-, 184 für EGFR-, 400 für MAGE-3-,

120 für Her-2/neu- und schließlich 280 für p53-spezifische CD8 T-Zellen. Beim gesunden Spender waren es 158 pro  $10^6$  Gesamt T-Zellen für EGFR.



**Abb. 4.14: TAA spezifische CD8 Gedächtnis T-Zellreaktivität bei Kopf-Hals-Tumorpatienten und gesunden Spendern.**

Dargestellt ist eine Zusammenfassung mittels kurzzeitigem IFN- $\gamma$  ELISpot Test untersuchter (A) Patienten (n=7) und (B) gesunder Spender (n=9) für Blut und/oder Lymphknoten. Der Anteil TAA-reaktiver Personen (graue Balken) ist dem Anteil nicht reaktiver (schwarze Balken) gegenübergestellt.  $10^5$  T-Zellen aus Blut und/oder Lymphknoten wurden für 40 Stunden mit autologen dendritischen Zellen stimuliert, die mit TAA- oder Kontrollpeptiden vorinkubiert worden waren. Eine Person wurde als immunologisch reaktiv eingestuft, wenn die Anzahl der IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen signifikant höher lag als die der entsprechenden Negativkontrolle (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ).

#### **4.4 Polarisierte tumorreaktive Gedächtnis T-Zellen primär operierter Kopf-Hals-Tumorpatienten**

Die bisher beobachtete Antitumorreaktivität von Gedächtnis T-Zellen des peripheren Blutes und tumordrainierenden, nicht metastasierten Lymphknotens beruhte ausschließlich auf der IFN- $\gamma$  Produktion von so genannten Th1 polarisierten T-Zellen, bestehend aus Th1 CD4 Helfer und zytotoxischen CD8 T-Zellen. Besondere Effektoreigenschaften letzterer Zellgruppe, wie die Ausschüttung lytischer Moleküle, wurden nicht berücksichtigt. Bislang wurde nicht auf eine tumorreaktive CD4 Th2 polarisierte Gedächtnis T-Zellantwort näher eingegangen. Diese kann tumorspezifische Immuntoleranz induzieren und ist von zentraler Bedeutung für die Bewertung der patienteneigenen Tumorimmunität.

Die Tumor-Immunantwort sollte nun umfassender betrachtet werden. Zu diesem Zweck wurden die aus Blut und Lymphknoten isolierten CD4 T-Zellen gleichzeitig auf die Sekretion von IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-10 untersucht; CD8 T-Zellen hingegen parallel auf IFN- $\gamma$  und Perforin. Der Frequenznachweis der Zytokinausschüttung erfolgte im kurzzeitigen ELISpot Test nach 40-stündiger Stimulation mit autologen dendritischen Zellen, die zuvor mit autologem Tumor- oder Kontrolllysat inkubiert worden waren.

Die Beurteilung der immunologischen Reaktivität und die Berechnung der Frequenz tumorreaktiver Zellen erfolgten wie in Abschnitt 4.1 beschrieben.

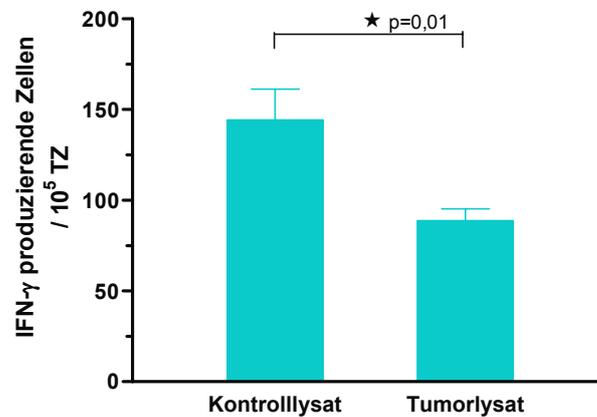
Im Rahmen dieser Arbeit wurden die CD4 und CD8 T-Zellen aus peripherem Blut und tumordrainierendem, nicht metastasiertem Lymphknoten von zwölf Patienten auf Th1 und Th2 Tumorimmunität untersucht. Die verhältnismäßig kleine Anzahl untersuchter Patienten war durch die stark gestiegene Menge an nötigem Zell- und Lysatmaterial zur Versuchsdurchführung bedingt.

##### **4.4.1 Besonderheiten der tumorspezifischen IFN- $\gamma$ Sekretion von Gedächtnis T-Zellen bei Kopf-Hals-Tumorpatienten**

Neben der IFN- $\gamma$  Produktion scheint das Zytokinprofil tumorreaktiver Patienten sehr komplex zu sein. Erste Hinweise daraufhin kamen durch die Beobachtung, dass eine beachtliche Anzahl der 69 im kurzzeitigen IFN- $\gamma$  ELISpot Test untersuchten Patienten (wie unter 4.1.1 beschrieben) sehr hohe unspezifische Reaktivität im Kontrolllysat aufwies. Da keine Autoimmunerkrankung bestand, wurde hier eine Suppression der Th1 polarisierten Tumorimmunität angenommen.

Ein Patient wurde als immunologisch supprimiert eingestuft (Abb. 4.15), wenn die Anzahl der IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen signifikant niedriger lag als die der entsprechenden

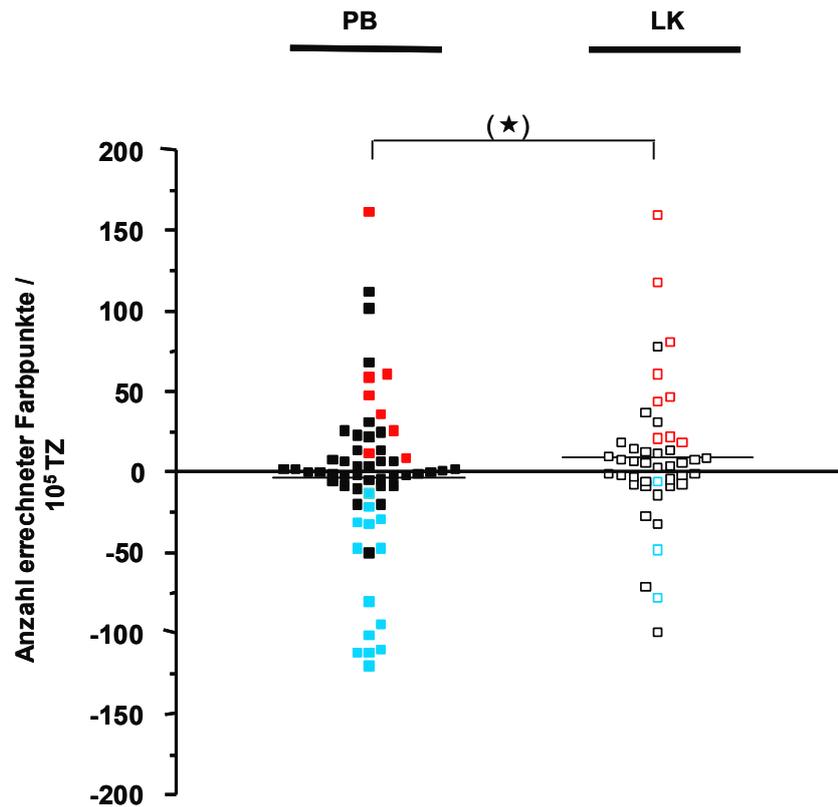
Negativkontrolle (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ). Diese dritte Möglichkeit der Zuordnung von tumorreaktiven Patienten war zuvor in der nicht reaktiven Patientenkohorte integriert.



**Abb. 4.15: Suppression der IFN-γ Sekretion von Gedächtnis T-Zellen bei einem Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

Dargestellt ist die IFN-γ Sekretion von Gedächtnis T-Zellen eines repräsentativen, supprimierten Kopf-Hals-Tumorpatienten im kurzzeitigen ELISpot Test. 10<sup>5</sup> T-Zellen aus Blut und/oder Lymphknoten wurden für 40 Stunden mit autologen dendritischen Zellen stimuliert, die mit autologem Tumor- oder Kontrolllysate vorinkubiert worden waren. Ein Patient wurde als immunologisch supprimiert eingestuft, wenn die Anzahl der IFN-γ produzierenden Zellen signifikant niedriger lag als die der entsprechenden Negativkontrolle (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ). \* zeigt eine signifikant mehr IFN-γ produzierende T-Zellen im Kontrolllysate als im Tumorlysate (Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ).

Die Besonderheiten der IFN-γ Sekretion in tumorreaktiven, nicht reaktiven und supprimierten Kopf-Hals-Tumorpatienten werden in Abb. 4.16 sichtbar gemacht.



**Abb. 4.16: Analyse tumorspezifischer Gedächtnis T-Zellen anhand kurzzeitigem IFN- $\gamma$  ELISpot Tests in Blut und Lymphknoten bei Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

Dargestellt ist die errechnete Anzahl der mittels Axioplan2/KS ELISpot Software gemessener IFN- $\gamma$  Farbpunkte für Blut (geschlossene Quadrate, n=61) und Lymphknoten (offene Quadrate, n=45) nach Subtraktion der unspezifischen Reaktivität in der entsprechenden Negativkontrolle.  $10^5$  T-Zellen aus Blut und/oder Lymphknoten wurden für 40 Stunden mit autologen dendritischen Zellen stimuliert, die mit autologem Tumor- oder Kontrolllysate vorinkubiert worden waren. Ein Patient wurde als immunologisch reaktiv eingestuft (rote Quadrate; Blut n=8; Lymphknoten n=9), wenn die Anzahl der IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen signifikant höher lag als die der entsprechenden Negativkontrolle (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ). Ein Patient wurde als immunologisch supprimiert eingestuft (türkisfarbige Quadrate; Blut n=14; Lymphknoten n=3), wenn die Anzahl der IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen signifikant niedriger lag als die der entsprechenden Negativkontrolle (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ). Ein Patient wurde als immunologisch nicht reaktiv eingestuft (schwarze Quadrate; Blut n=39; Lymphknoten n=33), wenn die Anzahl der IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen im selben Bereich lag als die der entsprechenden Negativkontrolle. (\*) zeigt eine auffällige Erhöhung der Tumorreaktivität im Lymphknoten im Vergleich zum Blut (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p=0,08$ ). Die waagerechten Linien stellen den jeweiligen Mittelwert der untersuchten Gruppe dar.

Hinsichtlich der oben genannten Definition waren 23% (16/69) der im kurzzeitigen IFN- $\gamma$  ELISpot Test untersuchten Patienten supprimiert, während nunmehr 52% (36/69) nicht reaktiv waren. Dessen ungeachtet blieb der Anteil reaktiver Patienten gleich bei 25% (17/69). Die Unterscheidung der Tumor-Immunreaktivität in Blut und Lymphknoten ergab, dass sich

supprimierte Tumor-Immunreaktivitäten im Vergleich zu nicht reaktiven signifikant öfter im peripheren Blut als im tumordrainierenden, nicht metastasierten Lymphknoten finden lassen ( $p \leq 0,05$ ). Die Gegenüberstellung von supprimierten und reaktiven Patienten in Blut und Lymphknoten offenbarte einen weiteren interessanten Befund: im Blut gab es signifikant mehr IFN- $\gamma$  Suppression als Reaktivität, während im lymphatischen Organ genau das Gegenteil wahr war ( $p \leq 0,05$ ). Alle Beobachtungen sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Letztere Feststellung wird auch von der Aussage der Abb. 4.16 bekräftigt: die Anzahl errechneter IFN- $\gamma$  Farbpunkte nach Subtraktion der unspezifischen Reaktivität in der entsprechenden Negativkontrolle lag für peripheres Blut im Durchschnitt unter Null, während sich dieser für Lymphknoten auffällig erhöht im positiven Bereich befand ( $p=0,08$ ). Das unterschiedliche Effektorverhalten von Gedächtnis T-Zellen des Blutes und Lymphknotens wird hier noch einmal sichtbar.

TZ-Herkunft	Tumorreaktivität im IFN- $\gamma$ ELISpot			Gesamt
	reaktive Patienten	nicht reaktive Patienten	supprimierte Patienten	
PB + LK	17	36	16	69
PB	8	39	14	61
LK	9	33	3	45

**Tab. 4.2: Tumorspezifische Gedächtnis T-Zellreaktivität bei Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

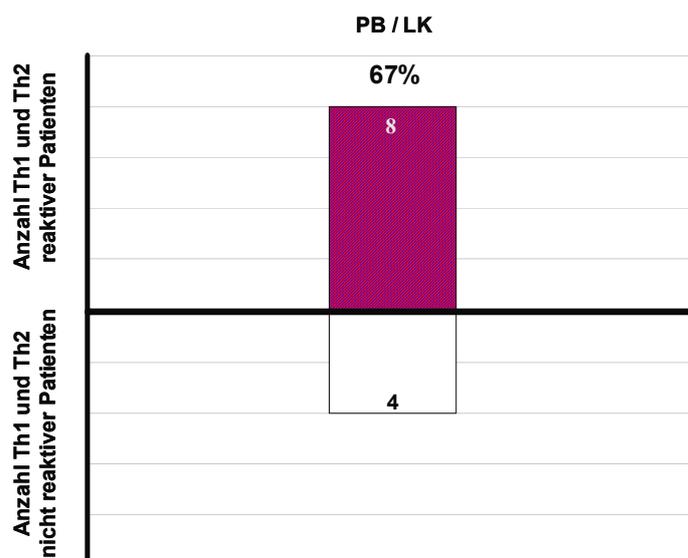
Dargestellt ist eine Zusammenfassung mittels kurzzeitigem IFN- $\gamma$  ELISpot Test untersuchter Patienten in Blut und Lymphknoten, sowie das Gesamtergebnis. Aufgelistet sind die Anzahlen reaktiver, nicht reaktiver und supprimierter Patienten.  $10^5$  T-Zellen aus Blut und/oder Lymphknoten wurden für 40 Stunden mit autologen dendritischen Zellen stimuliert, die mit autologem Tumor- oder Kontrolllysat vorinkubiert worden waren. Ein Patient wurde als immunologisch reaktiv eingestuft, wenn die Anzahl der IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen signifikant höher lag als die der entsprechenden Negativkontrolle (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ). Ein Patient wurde als immunologisch supprimiert eingestuft, wenn die Anzahl der IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen signifikant niedriger lag als die der entsprechenden Negativkontrolle (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ). Ein Patient wurde als immunologisch nicht reaktiv eingestuft, wenn die Anzahl der IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen im selben Bereich lag als die der entsprechenden Negativkontrolle. \* zeigt eine signifikante Erhöhung der Reaktivität im Lymphknoten im Vergleich zum Blut (Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest  $p \leq 0,05$ ).

Im Hinblick auf die klinischen Daten der supprimierten Patienten, fiel zunächst auf, dass alle 16 Patienten eine Tumorerkrankung im Spätstadium (IV) aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

#### 4.4.2 Analyse des Zytokinprofils von tumorreaktiven Gedächtnis T-Zellen bei Kopf-Hals-Tumorpatienten

Um die Immunreaktivität derjenigen Patienten zu erfassen, die nach tumorantigener Stimulation möglicherweise kein IFN- $\gamma$  sondern andere Zytokine produzieren, wurden kurzzeitige multiparametrische ELISpot Tests durchgeführt. Für separierte CD4 T-Zellen wurde gleichzeitig die IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-10 Sekretion getestet; für isolierte CD8 T-Zellen wurde parallel die IFN- $\gamma$  und Perforin Freisetzung untersucht.

Bei zwölf untersuchten Patienten wurde eine Th1 bzw. Th2 Tumorreaktivität in acht Fällen nachgewiesen (Abb. 4.17). Es handelte sich hierbei um 67% der Patienten. Dieser relativ hohe Reaktivitätswert spiegelt sowohl die Notwendigkeit als auch die Informationsbreite der multiparametrischen ELISpot Analysen wider. Nach genauem Betrachten fiel auf, dass sämtliche reaktive Patienten mit der Sekretion anderer Zytokine als IFN- $\gamma$  allein reagierten (Abb. 4.18 A). Die hier aufgedeckten Immunreaktionen wären bei einem kurzzeitigen IFN- $\gamma$  ELISpot Test mit Gesamt T-Zellen möglicherweise in der nicht reaktiven bzw. supprimierten Patientenkohorte verborgen.

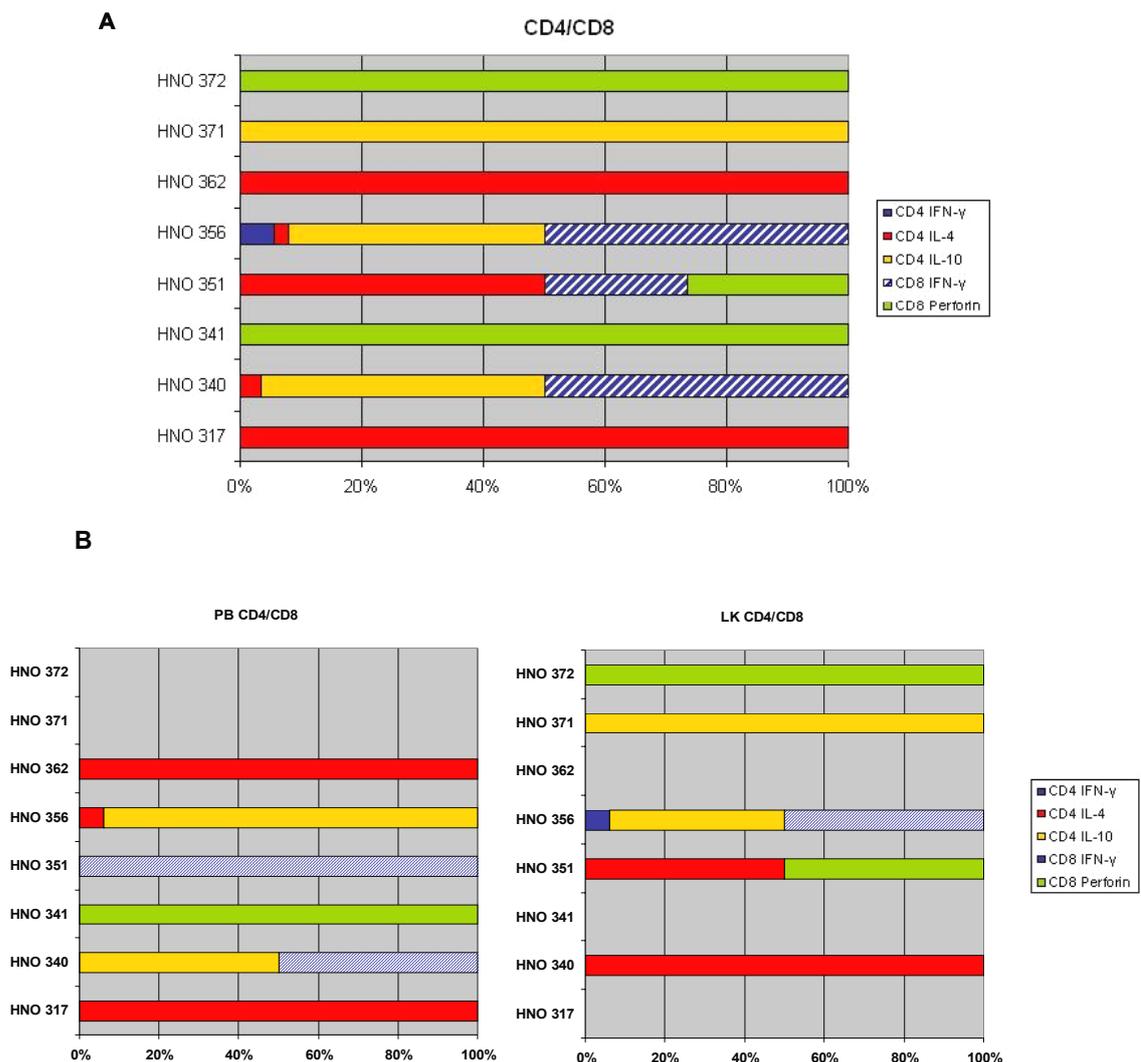


**Abb. 4.17: Tumorspezifische Th1 und Th2 Gedächtnis T-Zellreaktivität bei Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

Dargestellt ist eine Zusammenfassung mittels kurzzeitiger IFN- $\gamma$ , Perforin, IL-4 und IL-10 ELISpot Tests untersuchter Patienten (n=12). Die Anzahl reaktiver Patienten (farbiger Balken; n=8) ist der Anzahl nicht reaktiver

(weißer Balken; n=4) gegenübergestellt.  $10^5$  CD4 und/oder CD8 T-Zellen aus Blut (PB) und/oder Lymphknoten (LK) wurden für 40 Stunden mit autologen dendritischen Zellen stimuliert, die mit autologem Tumor- oder Kontrolllysat vorinkubiert worden waren. Ein Patient wurde als immunologisch reaktiv eingestuft, wenn die Anzahl der Zytokin produzierenden Zellen signifikant höher lag als die der entsprechenden Negativkontrolle (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ). Die Zahlen geben die Anzahl getesteter reaktiver bzw. nicht reaktiver Patienten an, während sich die Prozentangabe auf die Gesamtimmunreaktivität innerhalb der Gruppe bezieht.

In der obigen Zusammensetzung der Zytokinpolarisierung tumorreaktiver CD4 und CD8 Gedächtnis T-Zellen wurde peripheres Blut dem tumordrainierenden, nicht metastasierten Lymphknoten nicht gegenübergestellt. Trotz der relativ niedrigen Patientenzahl waren tatsächlich zwei Hauptunterschiede in der Tumormunität zu erkennen (Tab. 4.3 und Abb. 4.18 B). CD4 T-Zellen des Blutes haben nach tumorantigener Stimulation zu 38% (3/8) mit IL-4 Sekretion reagiert; für Lymphknoten waren es nur 22% (2/9). Dieselbige Aktivierung induzierte in 25% (2/8) der CD8 T-Zellen des Lymphknotens die Freisetzung von Perforin; für Blut waren es nur 14% (1/7).



**Abb. 4.18: Prozentuale Anteile an Th1 und Th2 Zytokinen tumorreaktiver CD4 und CD8 Gedächtnis T-Zellen in Blut und Lymphknoten bei Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

Dargestellt ist eine Zusammensetzung des IFN- $\gamma$ , Perforin, IL-4 und IL-10 Sekretionsprofils von CD4 und CD8 T-Zellen in der Gesamtimmunreaktivität **(A)** und in der Immunreaktivität von Blut- und Lymphknoten **(B)**.

**(A)** Reaktive (n=8) Patienten des Blutes und/oder Lymphknotens werden gegenübergestellt. **(B)** Reaktive Patienten des Blutes (links, n=6) werden solchen des Lymphknotens (rechts, n=5) gegenübergestellt.

Die Anteile ausgeschütteter Zytokine sind in horizontalen Balkendiagrammen gezeigt.  $10^5$  CD4 und/oder CD8 T-Zellen aus Blut und/oder Lymphknoten wurden für 40 Stunden mit autologen dendritischen Zellen stimuliert, die mit autologem Tumor- oder Kontrolllysate vorinkubiert worden waren. Ein Patient wurde als immunologisch reaktiv eingestuft, wenn die Anzahl der Zytokin produzierenden Zellen signifikant höher lag als die der entsprechenden Negativkontrolle (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ). Die y-Ordinate zeigt die Patientenidentifikation an. Die verschiedenen Gruppenzuordnungen sind dem integrierten Fenster zu entnehmen. Bei Patienten 317 und 340 wurde die Perforin Sekretion nicht getestet.

Gemischt polarisierte T-Zellimmunantworten gab es in drei der sieben tumorreaktiven Patienten (Abb. 4.18 B, HNO 340/ HNO 351/ HNO 356). Allerdings war die gemischte Immunität auch in verschiedenen T-Zellsubpopulationen zu finden. Lediglich ein Patient (HNO 356) zeigte IFN- $\gamma$  und gleichzeitig IL-10 Produktion nach tumorantigener Stimulation seiner CD4 Gedächtnis T-Zellen. Letzteres war jedoch in dieser Kombination das hauptsächlich induzierte Effektormolekül (12% IFN- $\gamma$  gegenüber 88% IL-10 Ausschüttung). Die Frequenzen Th1 und Th2 polarisierter Gedächtnis T-Zellen wiesen in beiden Kompartimenten keine signifikanten Unterschiede auf (Tab. 4.3).

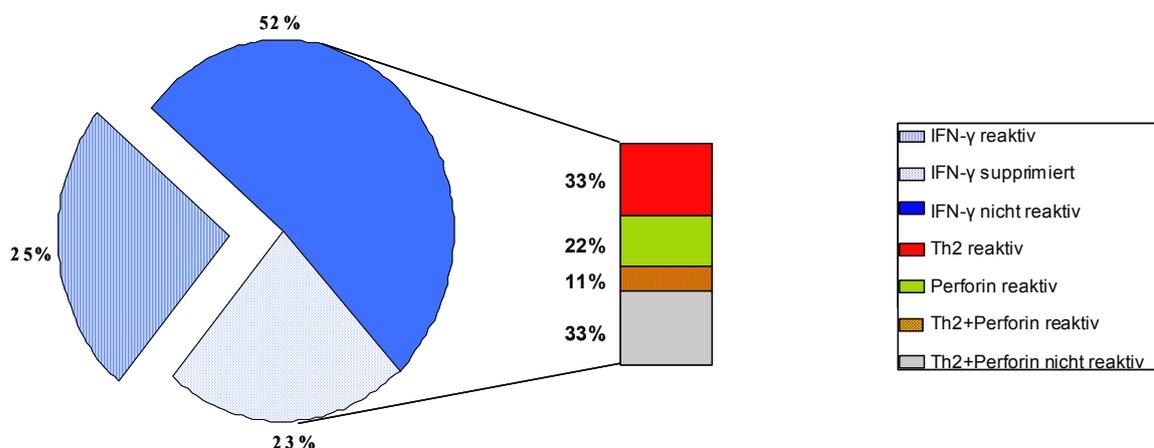
Zytokin	TZ-Population	reaktive Patienten	Anteil reaktiver Patienten	Frequenz reaktiver Zellen/ $10^6$
IFN- $\gamma$	PB CD4	0/12	0%	-
IFN- $\gamma$	PB CD8	2/11	18%	205 $\pm$ 5
IFN- $\gamma$	LK CD4	1/10	10%	540 $\pm$ 0
IFN- $\gamma$	LK CD8	1/9	11%	150 $\pm$ 0
Perforin	PB CD8	1/7	14%	40 $\pm$ 0
Perforin	LK CD8	2/8	25%	135 $\pm$ 105
IL-4	PB CD4	3/8	38%	167 $\pm$ 77
IL-4	LK CD4	2/9	22%	60 $\pm$ 10
IL-10	PB CD4	2/10	20%	2130 $\pm$ 1450
IL-10	LK CD4	2/10	20%	2125 $\pm$ 1838

**Tab. 4.3: Tumorspezifisches Zytokinprofil von Gedächtnis T-Zellen bei Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

Dargestellt ist eine Auflistung mittels kurzzeitiger IFN- $\gamma$ , Perforin, IL-4 und IL-10 ELISpot Tests untersuchter Patienten für CD4 und CD8 in Blut und Lymphknoten. Aufgelistet sind die getesteten Zytokine und die entsprechenden T-Zell Populationen, die Anzahlen und Anteile reaktiver Patienten, sowie deren gemittelte Frequenz pro  $10^6$  CD4 bzw. CD8 T-Zellen. T-Zellen aus Blut und/oder Lymphknoten wurden für 40 Stunden mit autologen dendritischen Zellen stimuliert, die mit autologem Tumor- oder Kontrolllysat vorinkubiert worden waren. Ein Patient wurde als immunologisch reaktiv eingestuft, wenn die Anzahl der Zytokin produzierenden Zellen signifikant höher lag als die der entsprechenden Negativkontrolle (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ). Die Frequenz tumorreaktiver T-Zellen für die eingesetzte T-Zellzahl ergab sich nach Subtraktion der unspezifischen Reaktivität in der entsprechenden Negativkontrolle.

Die in dieser Versuchsanordnung zusätzliche Information zur IFN- $\gamma$  Reaktivität (25%; 3/12) war, dass 50% (6/12) der untersuchten Patienten CD4 T-Zellen Th2 polarisiert waren; gleichzeitig waren 33% (3/9) der CD8 T-Zellen lytisch aktiv. Zusammengefasst reagierten 25% (3/12) der Patienten Th1 polarisiert, während 50% Th2 Immunantworten auslösten. Beim direkten Vergleich der Zytokinpolarisierung, der nur für CD4 Zellen möglich war, fiel auf, dass hier signifikant mehr Th2 (50%, 6/12) als Th1 (8%, 1/12) Immunität induziert wurde.

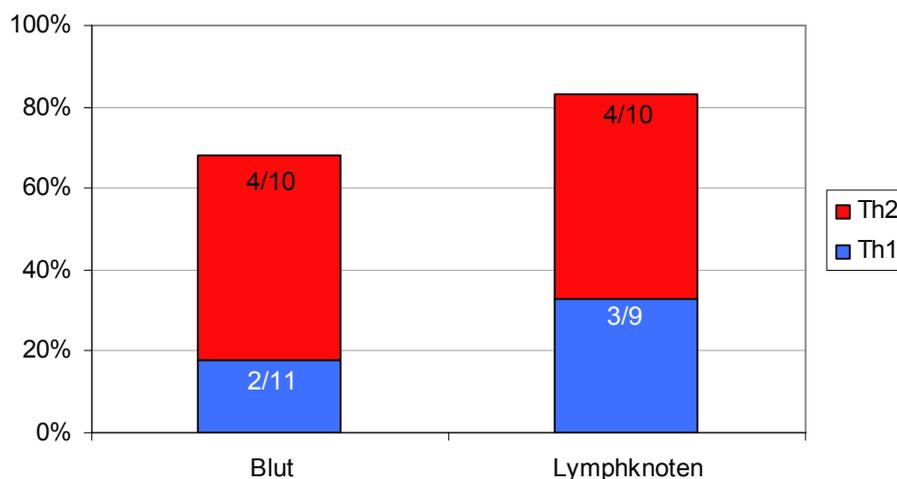
Nur für Th2 und zytotoxische Immunantworten lies sich nach Berücksichtigung einer für CD4 und CD8 gemischten Immunreaktivität folgendes Bild auszeichnen: möglicherweise IFN- $\gamma$  supprimierte oder nicht reaktive Patienten besaßen zu 33% ausschließlich Th2 polarisierte Gedächtnis T-Zellen, zu 22% zytotoxische und 11% sind gemischte Immunantworten. 33% der Patienten war für alle untersuchten Zytokine nicht reaktiv. Eine Zusammenfassung ist Abb. 4.19 zu entnehmen.

**Abb. 4.19: Zytokinprofil tumorspezifischer Gedächtnis T-Zellen bei Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

Dargestellt ist eine Zusammenfassung mittels kurzzeitiger IFN- $\gamma$ , Perforin, IL-4 und IL-10 ELISpot Tests untersuchter Patienten. Die Anteile IFN- $\gamma$  untersuchter Patienten (Tortendiagramm, links, n=69) sind den Anteilen

multiparametrischer ELISpot untersuchter Patienten (Balkendiagramm, rechts, n=12) gegenübergestellt.  $10^5$  T-Zellen aus Blut und/oder Lymphknoten wurden für 40 Stunden mit autologen dendritischen Zellen stimuliert, die mit autologem Tumor- oder Kontrolllysate vorinkubiert worden waren. Ein Patient wurde als immunologisch reaktiv eingestuft, wenn die Anzahl der Zytokin produzierenden Zellen signifikant höher lag als die der entsprechenden Negativkontrolle (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ). Ein Patient wurde als immunologisch supprimiert eingestuft, wenn die Anzahl der Zytokin produzierenden Zellen signifikant niedriger lag als die der entsprechenden Negativkontrolle (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ). Ein Patient wurde als immunologisch nicht reaktiv eingestuft, wenn die Anzahl der Zytokin produzierenden Zellen im selben Bereich lag als die der entsprechenden Negativkontrolle. Die verschiedenen Gruppenzuordnungen sind dem integrierten Fenster zu entnehmen. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Gesamtimmunreaktivität innerhalb der jeweiligen Gruppen.

Die multiparametrische ELISpot Analyse erlaubte die Identifizierung und Unterscheidung Th1 und Th2 polarisierter Gedächtnis T-Zellen inner- und außerhalb der IFN- $\gamma$  Tumor-Immunreaktivität für peripheres Blut und tumordrainierenden, nicht metastasierten Lymphknoten. Nach Beachtung aller Tumor-Immunreaktivitäten offenbarte sich ein Gesamtbild (Abb. 4.20) des Zytokinprofils von tumorreaktiven CD4 und CD8 Gedächtnis T-Zellen in Blut und Lymphknoten. Beide Kompartimente zeigten anteilig öfter Th2 (40%, 4/10, für beide) als Th1 Polarisierung. Letztere war jedoch in Lymphknoten (33%, 3/9) fast doppelt so häufig vertreten als in Blutlymphozyten (18%, 2/11). Möglicherweise könnte das heterogene Effektorverhalten von Gedächtnis T-Zellen des Blutes und Lymphknotens, das zuvor aufgeschlüsselt wurde, auf diesem Befund basieren.

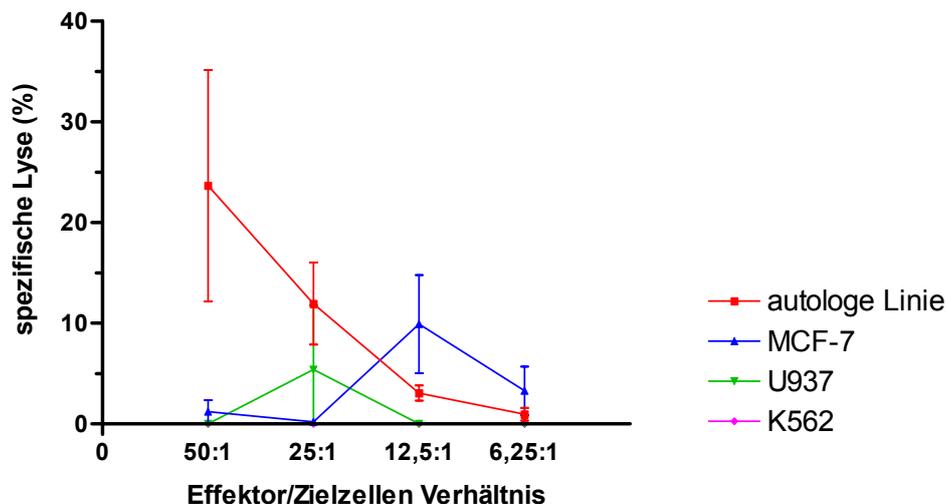


**Abb. 4.20: Zytokinpolarisierung tumorspezifischer Gedächtnis T-Zellen in Blut und Lymphknoten bei Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

Dargestellt ist eine Zusammenfassung mittels kurzzeitiger IFN- $\gamma$  und Perforin (Th1), sowie IL-4 und IL-10 (Th2) ELISpot Tests untersuchter Patienten. Die Anteile Th1 reaktiver Patienten (blau) sind den Anteilen Th2 reaktiver (rot) gegenübergestellt.  $10^5$  T-Zellen aus Blut und/oder Lymphknoten wurden für 40 Stunden mit autologen

dendritischen Zellen stimuliert, die mit autologem Tumor- oder Kontrolllysat vorinkubiert worden waren. Ein Patient wurde als immunologisch reaktiv eingestuft, wenn die Anzahl der Zytokin produzierenden Zellen signifikant höher lag als die der entsprechenden Negativkontrolle (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ). Die Zahlenangaben beziehen sich auf die reaktiven Patienten innerhalb der jeweiligen untersuchten Gruppen.

Schließlich stellte sich nun die Frage, ob tumorspezifische, zytotoxische T-Lymphozyten, neben der Perforin Sekretion im ELISpot Test, auch Tumorzellen direkt erkennen und töten können. Dazu wurde ein vierstündiger  $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest mit Blutlymphozyten und autologen Tumorzellen bei einem HLA-A2 positiven Kopf-Hals-Tumorpatienten durchgeführt. Zuvor wurden die Effektorzellen drei Tage lang mit bestrahlten, autologen Tumorzellen inkubiert. Diese Analyse ergab, dass spontan generierte, tumorspezifische T-Zellen des Blutes HLA-A2 positive Tumorzellen erkennen und zu ca. 25% lysieren konnten (Abb. 4.21). Die ebenso HLA-A2 positiven Tumorklinien K562 und MCF-7, sowie die MHC Klasse I positive Linie U937 demonstrierten signifikant niedrigere Lyse (unter 10%;  $p \leq 0,05$ ).



**Abb. 4.21: Zytotoxische Aktivität tumorspezifischer T-Zellen im Blut bei einem Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

Dargestellt ist die spezifische Lyse in Prozent gegenüber Effektor/Zielzellen Verhältnisse in einem Kurvendiagramm. Effektor T-Zellen des Blutes von einem HLA-A2 positiven Kopf-Hals-Tumorpatienten, generiert nach Stimulation mit bestrahlten, autologen Tumorzellen, wurden in verschiedenen Verhältnissen (50:1; 25:1; 12,5:1 und 6,25:1) mit  $3 \times 10^3$   $^{51}\text{Chrom}$  markierten, autologen oder heterologen Tumorzellen (MCF-7, U937 bzw. K562) für vier Stunden inkubiert. Es sind gemittelte Werte aus Triplikaten mit Standardabweichungen angezeigt. Autologe Tumorzellen wurden im Vergleich zu heterologen Linien signifikant lysiert (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ).

## **4.5 Zytokinmilieu von Tumorlysat und Blutplasma primär operierter Kopf-Hals-Tumorpatienten**

Der bisherige Nachweis von tumorreaktiven Th1 und Th2 polarisierten, sekundären Gedächtnis T-Zellen setzt eine primäre Aktivierung der T-zellvermittelten Immunität untersuchter Kopf-Hals-Tumorpatienten im Laufe ihrer Tumorerkrankung voraus. Die Mehrheit der Krebspatienten weist jedoch keine Anzeichen einer Auseinandersetzung mit der malignen Erkrankung auf. Die Faktoren, die eine solche Stimulation ermöglichen oder verhindern, sind im Primärtumor und dem umliegenden Gewebe zu finden. Dabei handelt es sich unter anderem um immunmodulatorische Zytokine, die das Milieu im Tumor bestimmen. Stimulatorische und suppressive Zytokine, die die Interaktionen zwischen Tumor- und Immunzellen beeinflussen und dadurch die Differenzierung der T-Zellantwort polarisieren, wurden hier untersucht.

In Primärtumorlysaten und/oder im Blutplasma von 65 Patienten wurden die Mengen an IFN- $\alpha$ , IL-10, IL-12 (p70), IL-17 und TGF- $\beta$ 1 mittels ELISA Tests bestimmt, um das lokale Zytokinmilieu des Tumors und das systemische Zytokinprofil im Plasma zu charakterisieren. Gewebelysate des metastasierten Lymphknotens wurden aufgrund der hohen Präsenz von Immunzellen nicht analysiert. Zur Bestimmung der basalen Konzentration untersuchter Zytokine wurden Gewebelysate des Kopf-Hals-Bereiches sechs gesunder Spender verwendet.

Das Tumorzytokinprofil wurde mit den induzierten ausschließlich primärtumorspezifischen Immunantworten im kurzzeitigen IFN- $\gamma$  ELISpot Test korreliert. Dadurch sollte der Einfluss pro- und antiinflammatorischer Zytokine in Primärtumor und Blutplasma auf die An- oder Abwesenheit des Anti-Tumorgedächtnisses untersucht werden.

Die hiesige Analyse von Tumorlysaten der Kopf-Hals-Tumorpatienten auf ihre Zytokinproduktion stellt den bisher ersten Versuch dar, das Immunsystem solcher Patienten auf diese Weise zu studieren.

### **4.5.1 Zytokinprofil von Tumorlysaten und Blutplasmata bei Kopf-Hals-Tumorpatienten**

Die Zytokinkonzentration wurde in 54 Tumorlysaten und 45 Plasmata bestimmt. Allerdings handelt es sich hierbei um die maximal untersuchten Probenzahlen. Sie wurden aufgrund der geringen Materialmenge, die zur Verfügung stand, nicht immer erreicht. Sowohl lokal als auch systemisch wurden die Proben von 23 Tumorpatienten analysiert. Eine Zusammenfassung sämtlicher Untersuchungen ist in Abb. 4.22 dargestellt. Zunächst tritt hier

die Beobachtung hervor, dass in Tumor und Plasma von Kopf-Hals-Tumorpatienten sowohl immunsuppressive als auch -stimulatorische Zytokine nachgewiesen werden konnten. Ferner fielen die große Varianz und die verschiedenen Bereiche der Zytokinmengen auf. Während ersteres auf die Heterogenität der jeweiligen Tumore und Immunsysteme zurückzuführen ist, basiert letzteres auf das Detektionsvermögen des ELISA Tests. TGF- $\beta$ 1 zum Beispiel wurde nach einer *in vitro* Aktivierung in seiner aktiven Form quantitativ erfasst.

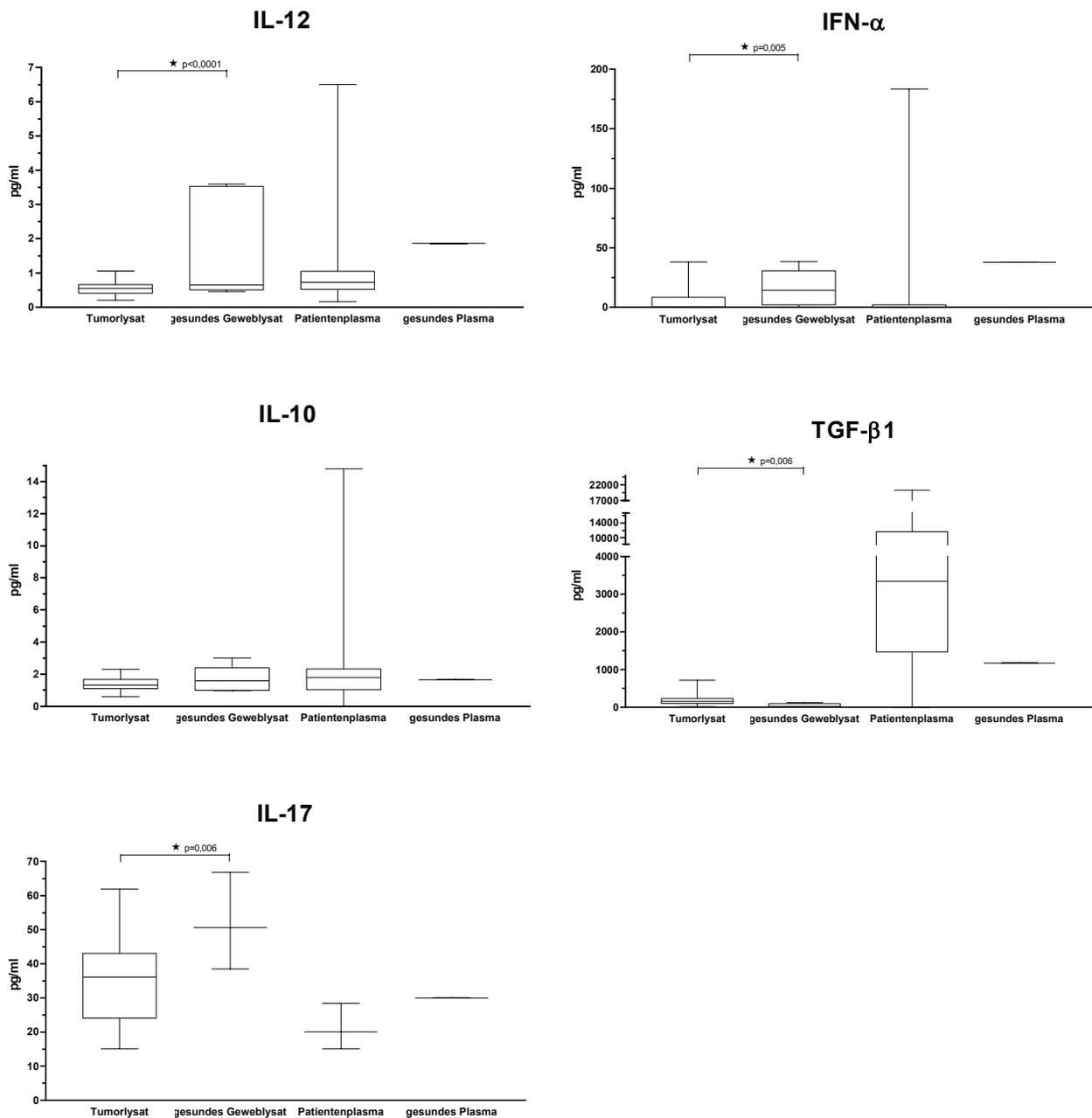
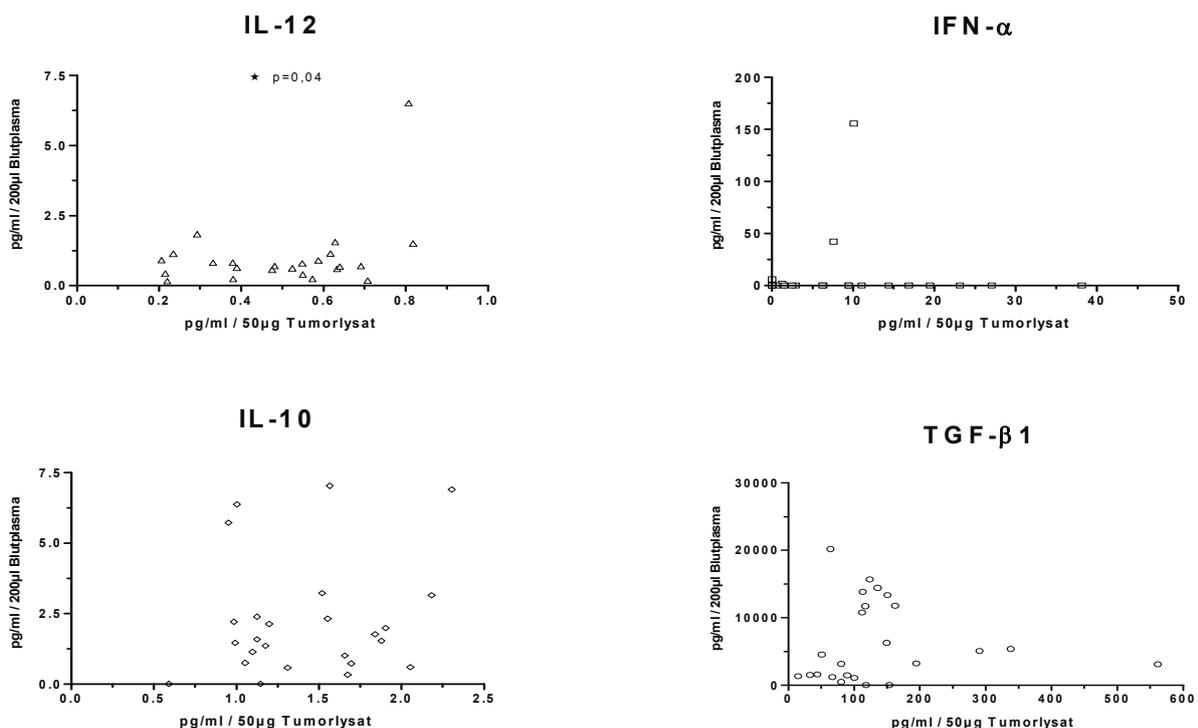


Abb. 4.22: Zytokinkonzentrationen in Tumor- bzw. Gewebelysaten und Blutplasmata bei Kopf-Hals-Tumorpatienten und gesunden Donoren.

Als Boxdiagramm dargestellte Zusammenfassung mittels ELISA Tests gemessener Konzentrationen (pg/ml) von IFN- $\alpha$ , IL-10, IL-12 (p70), IL-17 und TGF- $\beta$ 1 in 50 $\mu$ g Tumor- bzw. Gewebelysat und 200 $\mu$ l Blutplasma. Die untersuchten Patientenzahlen betragen in der oben genannten Reihenfolge für Tumorlysat 49, 44, 41, 30 und 54, sowie 41, 43, 45, 5 und 27 für Blutplasma. Es wurden sechs gesunde Gewebelysate analysiert. Die Zytokinkonzentration im Plasma gesunder Spender stammen aus dem Datenblatt der Firma R&D oder nach persönlichem Kontakt der Firma PBL, beide Hersteller der hier benutzten ELISA Kits. Die jeweiligen minimalen, medianen und maximalen Werte werden mit waagerechten Linien gekennzeichnet. \* zeigt eine signifikante Erhöhung/Erniedrigung der Zytokinkonzentration im Tumorlysat im Vergleich zum gesunden Gewebelysat (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ).

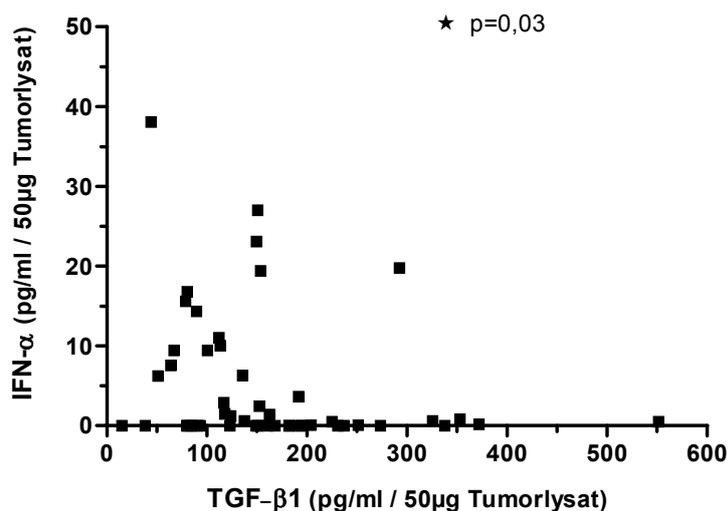
Um das systemische Zytokinmilieu bei Kopf-Hals-Tumorpatienten mit gesunden Spendern direkt prüfen zu können, wurden Angaben der Firmen R&D und PBL, die unter denselben Bedingungen gesunde Blutproben untersuchten, verwendet. Zum Zytokinwertevergleich von malignen und gesunden Kopf-Hals-Geweben wurden Gesamtproteinlysate von sechs gesunden Spendern ebenso analysiert. Mehr Donorenproteine waren zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung kommerziell nicht zu erwerben. Grundsätzlich waren in Tumorpatienten die immunstimulatorischen Zytokine erniedrigt und gleichzeitig die suppressorischen erhöht (Abb. 4.22). IL-17 lag im Tumorgewebe jedoch erniedrigt vor. Bei 24 Patienten wurden für IFN- $\alpha$ , IL-10, IL-12 (p70) und TGF- $\beta$ 1 Tumorlysat- und Plasmaproben parallel analysiert. Tumorkonzentrationen korrelierten nur im Falle des IL-12 mit Plasmakonzentrationen signifikant positiv (Pearson Koeffizient  $r=0,35$ ;  $p \leq 0,05$ ; Abb. 4.23). Dies lässt auf eine lokale IL-10, IL-17 und TGF- $\beta$ 1 Produktion schließen.



**Abb. 4.23: Lokaler und systemischer Zytokinnachweis bei Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

Dargestellt sind die mittels ELISA Tests gemessenen Konzentrationen (pg/ml) von IFN- $\alpha$  ( $\square$ ), IL-10 ( $\diamond$ ), IL-12 (p70) ( $\triangle$ ) und TGF- $\beta$ 1 ( $\circ$ ) in 50 $\mu$ g Tumorlysat und 200 $\mu$ l Blutplasma zusammengehöriger Patienten (n=24). Für IL-12 besteht eine signifikant positive Korrelation (Pearson Koeffizient  $r=0,35$ ). \* zeigt eine signifikante Korrelation in der Zytokinkonzentration von Tumorlysat und Blutplasma (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p\leq 0,05$ ).

Innerhalb der Zytokine gab es im Tumorlysat eine signifikant inverse Korrelation zwischen IFN- $\alpha$  und TGF- $\beta$ 1 (Pearson Koeffizient  $r=-0,24$ ,  $p\leq 0,05$ , Abb. 4.24). Die Präsenz von TGF- $\beta$ 1 im Tumormilieu wirkt der IFN- $\alpha$  Produktion dendritischer Zellen und der daraus resultierenden Th1 polarisierenden Aktivierung entgegen. Dieser Zusammenhang liefert einen weiteren Beweis zur allgemeinen Immunsuppression untersuchter Kopf-Hals-Tumorpatienten.

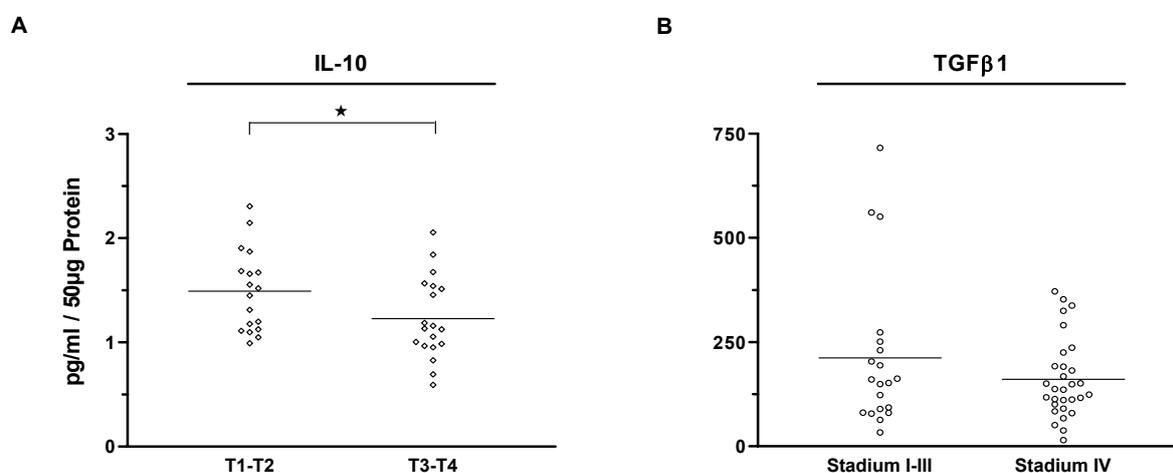
**Abb. 4.24: Korrelation zwischen IFN- $\alpha$  und TGF- $\beta$ 1 in Tumorlysaten von Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

Dargestellt sind die mittels ELISA Tests gemessenen Konzentrationen (pg/ml) von IFN- $\alpha$  und TGF- $\beta$ 1 in 50 $\mu$ g Tumorlysat zusammengehöriger Patienten (n=49). Es besteht eine signifikant inverse Korrelation (Pearson Koeffizient  $r=-0,24$ ). \* zeigt eine signifikant inverse Korrelation in der Tumorkonzentration beider Zytokine (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p\leq 0,05$ ).

Im Folgenden sollte das Zytokinprofil von Tumorlysaten und Blutplasmata bei Kopf-Hals-Tumorpatienten mit den klinischen Daten der Patienten korreliert werden. Ähnlich wie bei den Korrelationen dieser mit IFN- $\gamma$  ELISpot Analysen, konnten Konzentrationsunterschiede

in verschiedenen Tumorstadien und Tumorgrößen, sowie in unterschiedlicher Rezidivmanifestation beobachtet werden.

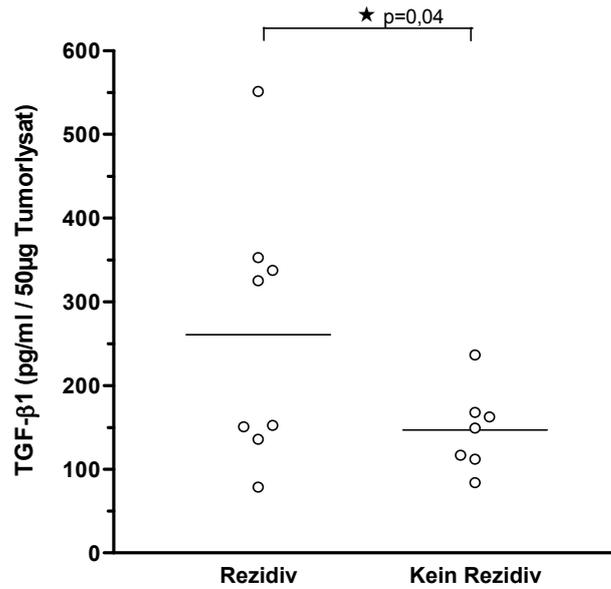
Für die untersuchten immunsuppressorischen Zytokine ergaben die Korrelationsanalysen in Zusammenhang mit der Tumorgröße und dem Tumorstatus, dass IL-10 und TGF- $\beta$ 1 hauptsächlich zu Beginn einer Tumorerkrankung mit noch kleinerem Tumorwachstum eine mögliche Rolle spielten. IL-10 war in Tumorlysaten von T1-T2 großen Primärtumoren (n=18) im Vergleich zu T3-T4 (n=19) signifikant erhöht ( $p \leq 0,05$ ; Abb. 4.25 A). Gleichzeitig war TGF- $\beta$ 1 in Tumorlysaten von Patienten früher Stadien (I-III; n=20) im Vergleich zum Spätstadium (IV; n=30) teilweise erhöht ( $p \leq 0,05$ ; Abb. 4.25 B).



**Abb. 4.25: Zytokingehalt in Tumorlysaten von Kopf-Hals-Tumorpatienten in Abhängigkeit der Tumorgröße und -stadium.**

Dargestellt ist die Verteilung der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen (pg/ml) in 50µg Tumorlysat von (A) IL-10 ( $\diamond$ ) innerhalb der verschiedenen Tumorgrößen (T1-T2 links, T3-T4 rechts) und (B) TGF- $\beta$ 1 ( $\circ$ ) in Abhängigkeit der verschiedenen Tumorstadien (Stadium I-III links, IV rechts). \* kennzeichnet eine signifikante Erhöhung der Zytokinkonzentrationen in Patienten der miteinander vergleichenden Gruppen (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ). Die waagerechten Linien stellen den jeweiligen Mittelwert der untersuchten Gruppe dar.

Bezüglich der 3-Jahres-Rezidivbildung ergab die Korrelationsanalyse, dass sich bei 15 Kopf-Hals-Tumorpatienten Rezidive manifestierten, wenn der Primärtumor signifikant viel TGF- $\beta$ 1 produzierte (Abb. 4.26). Das Vorkommen von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen im Blutplasma scheint die Rezidivbildung nicht zu beeinflussen (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4.26: TGF-β1 Konzentration von Tumorlysaten bei Kopf-Hals-Tumorpatienten in Abhängigkeit der 3-Jahres-Reizidivmanifestation.**

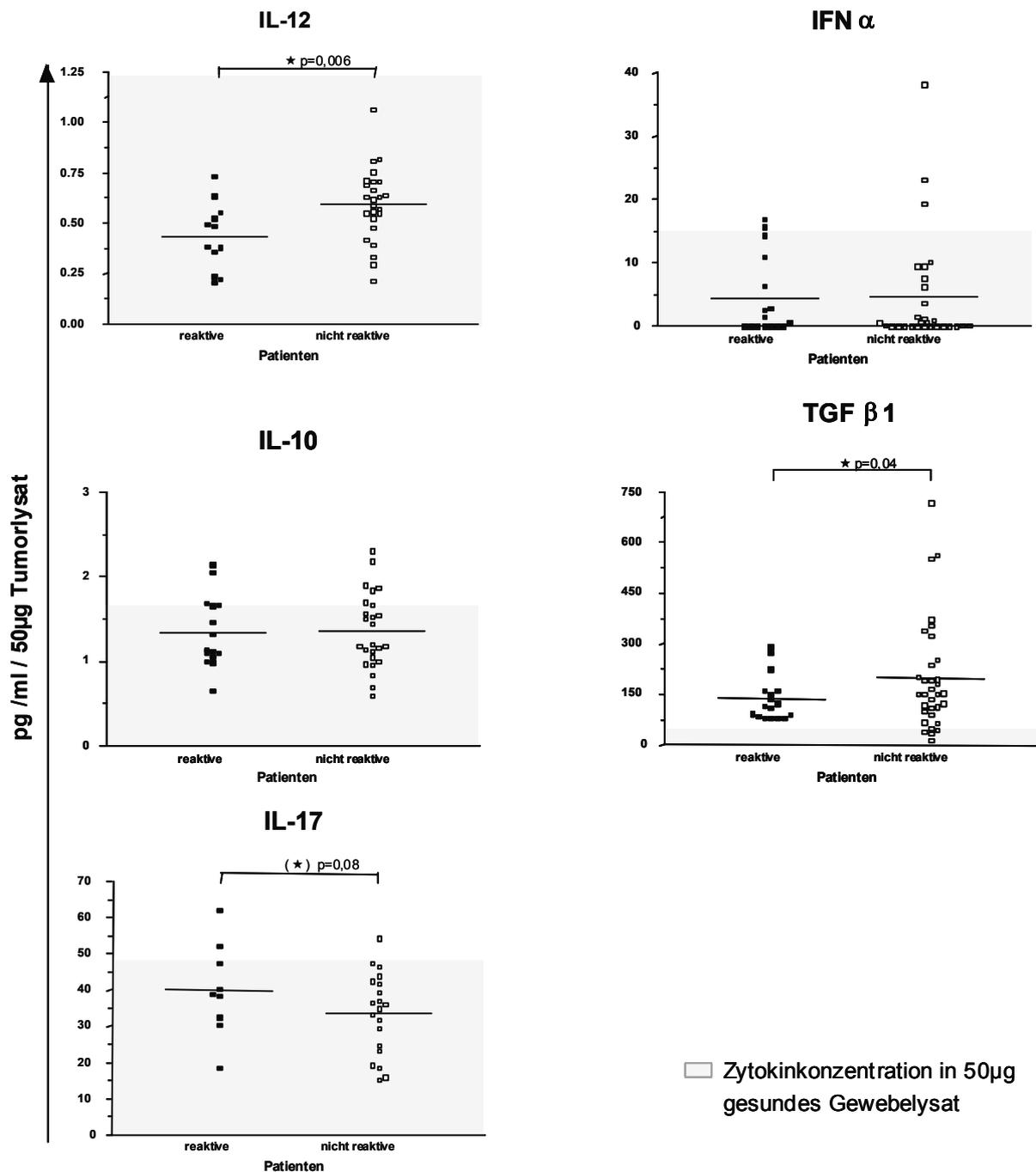
Dargestellt ist die Verteilung mittels ELISA gemessener Konzentrationen (pg/ml) von TGF-β1 (○) in 50µg Tumorlysat in Abhängigkeit der 3-Jahres-Reizidivbildung bei 15 Patienten. \* kennzeichnet eine signifikante Erhöhung der Zytokinkonzentrationen in Patienten mit und ohne Reizidivmanifestation (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ). Die waagerechten Linien stellen den jeweiligen Mittelwert der untersuchten Gruppe dar.

#### 4.5.2 Einfluss des Zytokinmilieus im Primärtumor auf die Etablierung einer tumorspezifischen Gedächtnis T-Zellimmunantwort

Als Nächstes sollte das zuvor in Abschnitt 4.1 nachgewiesene Vorkommen einer tumorreaktiven Immunantwort im kurzzeitigen IFN- $\gamma$  ELISpot Test bei Kopf-Hals-Tumorpatienten direkt mit dem Zytokinprofil korrespondierender Primärtumor- und Plasmaproben verglichen werden. Dabei wurden Reaktivitäten, die ausschließlich gegen den Primärtumor generiert wurden, berücksichtigt. Der Vergleich mit Plasmaproben ergab keine aufschlussreichen Korrelationen. Aus diesem Grund werden im Folgenden nur die Gegenüberstellungen der IFN- $\gamma$  ELISpot Reaktivitäten mit dem Tumormilieu dargestellt (Abb. 4.27). Die möglichen Gegenüberstellungen beinhalteten für IFN- $\alpha$  45, für IL-10 40, für IL-12 (p70) 37, für IL-17 29 und im Falle des TGF- $\beta$ 1 50 Patienten.

Für vier der fünf untersuchten Zytokine lag die Mehrheit der gemessenen Konzentrationen unter den jeweiligen Konzentrationswerten gesunder Spender (Abb. 4.22). Aus diesem Grund können die für IL-12 und IL-17 beobachteten Unterschiede der Verteilung von IFN- $\gamma$  Immunantworten nur mit großer Vorsicht berücksichtigt werden (Abb. 4.27). IL-12 kam unerwarteterweise in nicht tumorreaktiven Patienten signifikant erhöht vor ( $p \leq 0,05$ ), während IL-17 in tumorreaktiven Patienten auffällig erhöht war ( $p = 0,08$ ). Allein für TGF- $\beta$ 1 können die Beobachtungen ohne weitere Einwände evaluiert werden. Aus diesen wird ersichtlich, dass in Patienten, die keine Tumorreaktivität im kurzzeitigen IFN- $\gamma$  ELISpot aufwiesen, verstärkt TGF- $\beta$ 1 im Tumorgewebe produziert wurde ( $p \leq 0,05$ ).

Das hier im Primärtumor erfasste Zytokinmuster von nicht reaktiven Patienten, nämlich viel TGF- $\beta$ 1, erinnert an die bereits in Abb. 4.26 bemerkte, hohe TGF- $\beta$ 1 Konzentration bei Patienten mit Rezidivmanifestation innerhalb der ersten drei Jahre der Tumorerkrankung. Die hier indirekt beobachtete Korrelation zwischen IFN- $\gamma$  ELISpot Reaktivität und Rezidivmanifestation ist jedoch bei 29 Patienten nicht statistisch gesichert (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der hier vorliegenden Daten kann also nicht abschließend geklärt werden, ob IFN- $\gamma$  ELISpot Tumor-Immunreaktivität und TGF- $\beta$ 1 Nachweis im Tumorgewebe und Rezidivbildung miteinander verknüpft sind. Tendenziell scheint diese Beobachtung zuzutreffen.



**Abb. 4.27: Korrelation des Zytokingehalts in Tumorlysat mit der induzierten T-Zellantwort im IFN- $\gamma$  ELISpot.**

Dargestellt ist die Verteilung von induzierten IFN- $\gamma$  Immunantworten im kurzzeitigen ELISpot Test innerhalb der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen (pg/ml) für IFN- $\alpha$ , IL-10, IL-12 (p70), IL-17 und TGF- $\beta$ 1 in 50µg Tumorlysat. Immunologisch reaktive (geschlossene Quadrate) und nicht reaktive (offene Quadrate) Patienten werden miteinander verglichen. Die gemittelte Zytokinkonzentration in 50µg Gewebelysat gesunder Spender für jedes Zytokin wird als grauer Hintergrund angezeigt. \* und (\*) kennzeichnen eine signifikante oder auffällige Erhöhung/Erniedrigung der Zytokinkonzentrationen in reaktiven Patienten im Vergleich zu nicht reaktiven (zwei

Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$  bzw.  $p \leq 0,1$ ). Die waagerechten Linien stellen den jeweiligen Mittelwert der untersuchten Gruppe dar.

Physiologisch kommen im Tumorgewebe sowohl stimulatorische als auch suppressorische Zytokine miteinander kombiniert vor. Deshalb wurden als Nächstes Kombinationen der im Tumorgewebe erhöhten bzw. erniedrigten Zytokine mit der Reaktivität im kurzzeitigen IFN- $\gamma$  ELISpot korreliert. Ob die Zytokine gesteigert oder vermindert waren, konnte relativ zum jeweiligen Mittelwert festgestellt werden. Nach Evaluation aller möglichen Kombinationen ließ sich ein Gesamtbild, das auf IL-12 zusammen mit pro- bzw. antiinflammatorischen Zytokinen basiert, erkennen (Abb. 4.28). Die Anzahl IFN- $\gamma$  reaktiver Patienten war signifikant größer, wenn IL-12 zusammen mit IL-10 bzw. TGF- $\beta$ 1 im Tumorgewebe erniedrigt vorlag ( $p \leq 0,05$ ). Gleichzeitig waren die meisten IFN- $\gamma$  Immunantworten dann zu finden, wenn wenig IL-12 kombiniert mit viel IFN- $\alpha$  bzw. IL-17 in Tumorlysaten vorkam ( $p \leq 0,05$ ).

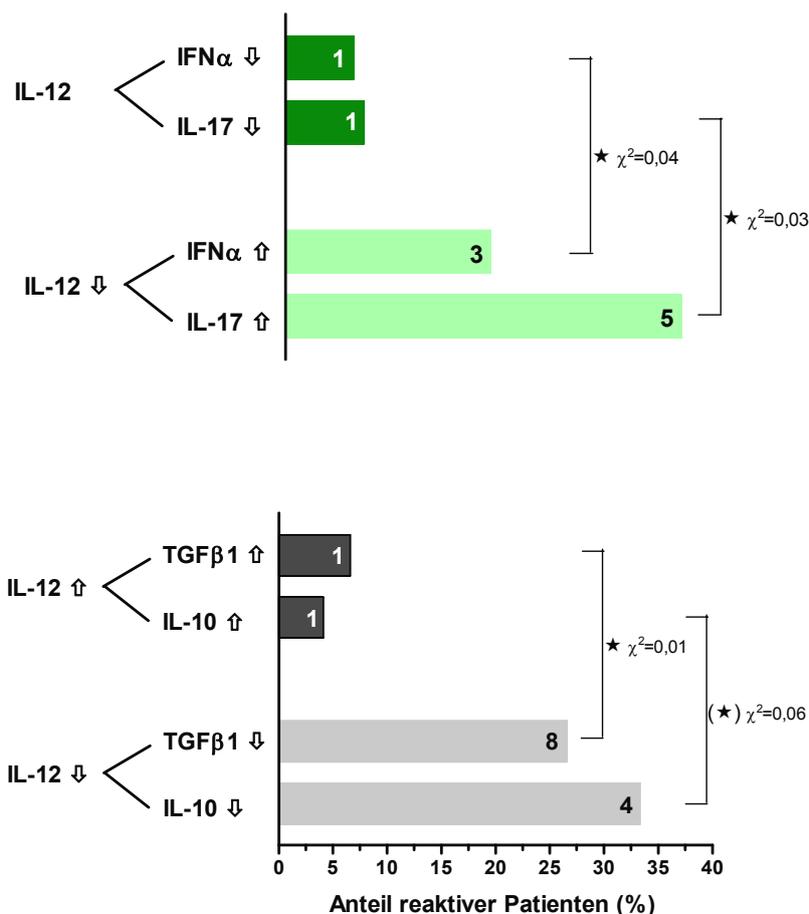


Abb. 4.28: Korrelation der Zytokinkombinationen in Tumorlysaten mit der induzierten T-Zellantwort im IFN- $\gamma$  ELISpot.

Dargestellt ist der Anteil im kurzzeitigen IFN- $\gamma$  ELISpot Test reaktiver Patienten (farbige Balken) für verschiedene Zytokinkombinationen. Ein Zytokin lag als erhöht/erniedrigt vor, wenn sich die im ELISA Test gemessene Konzentration (pg/ml) über/unter der gemittelten Konzentration des jeweiligen Zytokins befand. Die Zytokinkombinationen sind der Beschriftung der Balkendiagramme zu entnehmen. Die absolute Anzahl reaktiver Patienten ist angegeben. Die evaluierte Patientenzahl betrug für die erste Gruppe 22 für IFN- $\alpha$  und 19 für IL-17; für die zweite Gruppe (grau) war sie 24 für TGF- $\beta$ 1 und 15 für IL-10. \* und (\*) zeigen eine signifikante oder auffällige Erhöhung der Reaktivität in den dunkelfarbigen Gruppen im Vergleich zu den hellfarbigen (Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest  $p \leq 0,05$  bzw.  $p \leq 0,1$ ).

Bei allen oben aufgeführten, im kurzzeitigen IFN- $\gamma$  detektierten Reaktivitäten wurde zwischen Blut- und Lymphknotenimmunität nicht unterschieden. Tatsächlich ergab eine derartige Gegenüberstellung keine auffälligen Unterschiede. Das Zytokinmilieu, insbesondere TGF- $\beta$ 1, scheint hauptsächlich die Generierung von Effektor/Gedächtnis T-Zellen zu beeinflussen. Nach den hier vorliegenden Daten wurde ihre Anreicherung im peripheren Blut oder tumordrainierenden, nicht metastasierten Lymphknoten von Tumorzytokinen nicht betroffen. Bei der Gegenüberstellung des Zytokinprofils und Anti-Tumorgedächtnisses wurde nicht zwischen reaktiven, nicht reaktiven und supprimierten Patienten unterschieden. Das lag daran, dass in der hier untersuchten Patientenkohorte nur wenige Patienten (sechs) supprimiert waren.

Ein Vergleich des Zytokinprofils im Primärtumor mit der Gesamtimmunreaktivität in multiparametrischen ELISpot Tests war aufgrund der kleinen Anzahl für beide Analysen untersuchter Patienten (neun) nicht weiter möglich. Ungeachtet dessen fiel die Beobachtung auf, dass sämtliche im IL-10 ELISpot reaktiven Patienten deutlich erhöhte IL-10 Konzentrationen im Tumorgewebe aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund weist auf eine Aktivität Th2 polarisierter oder möglicherweise regulatorischer T-Zellen hin.

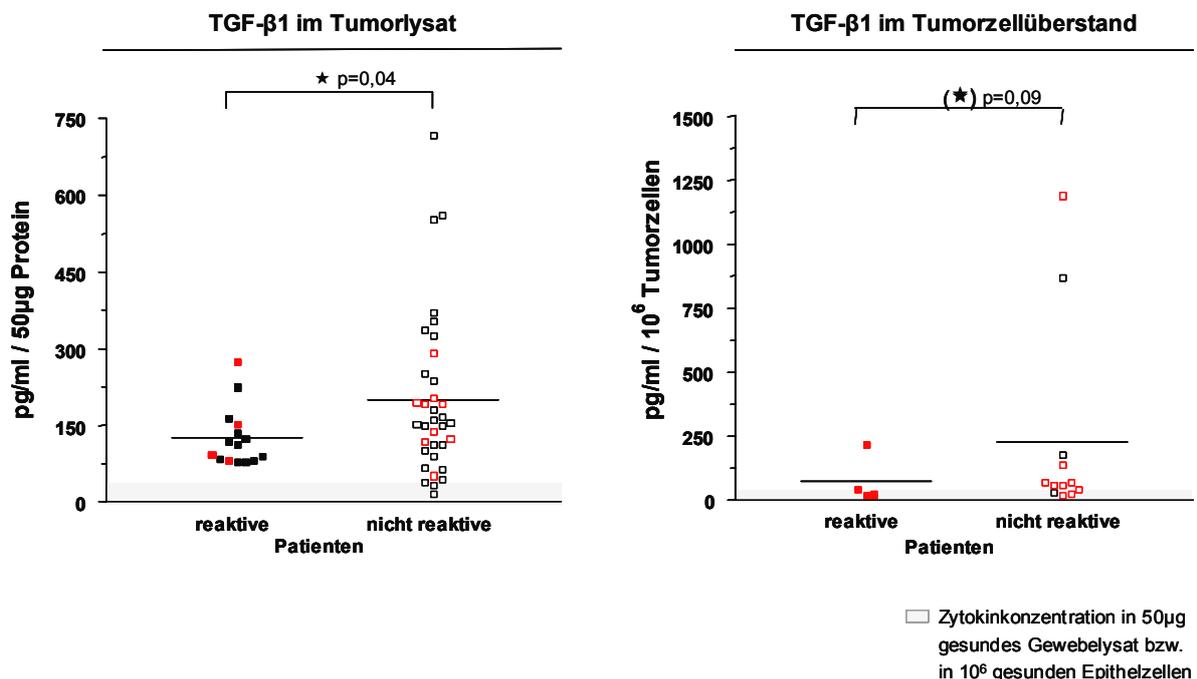
#### **4.5.3 Vergleich des Zytokinmilieus im Primärtumor mit der Zytokinproduktion primärer Kopf-Hals-Tumorzelllinien**

Die zuvor nachgewiesenen Zytokinkonzentrationen wurden im Primärtumor mittels ELISA Test gemessen. Das gesamte Tumorgewebe besteht aus Tumorzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und Immunzellen. Ob die Tumorzellen alleine an der Zytokinproduktion beteiligt sind, wurde als Nächstes untersucht. In Überständen von 16 zuvor als Lysat untersuchten und aus Tumorbiopsien generierten Tumorzellkulturen wurde im ELISA Test die Zytokinfreisetzung gemessen. Bei allen Tumorzelllinien handelte es sich um frühe Passagen (unter Passage acht). Dies hatte zur Folge, dass auch Fibroblasten in den Kulturen vorhanden waren. Die Mehrheit der Tumorzellkulturüberständen Kopf-Hals-

Tumorpatienten wies die Freisetzung von IL-10 und TGF- $\beta$ 1 auf. Wenige Tumorzelllinien produzierten IL-12, während IFN- $\alpha$  nicht vorhanden war (Daten nicht gezeigt).

Nun wurden die Zytokinkonzentrationen in Tumorzellüberständen mit der Tumorreaktivität im IFN- $\gamma$  ELISpot verglichen. Der einzig auffallende Unterschied war noch einmal für TGF- $\beta$ 1 zu sehen (Abb. 4.29 rechts). Im Überstand der Tumorzelllinien nicht reaktiver Patienten kamen auffällig erhöhte TGF- $\beta$ 1 Werte im Vergleich zu reaktiven vor ( $p \leq 0,1$ ).

Die in Tumorlysat und korrespondierendem Tumorzellüberstand gemessenen Zytokinkonzentrationen sind nur schwer direkt miteinander vergleichbar. Im Überstand werden nur Tumorzellen und Fibroblasten erfasst und die Behandlung der Proben ist grundsätzlich verschieden (Gewebelysat gegenüber Zellkulturüberstand). Letzteres wird auch durch die unterschiedlichen Einheiten bestätigt (pg/ml für 50 $\mu$ g Protein und pg/ml für 10<sup>6</sup> Zellen). Dennoch war die Verteilung IFN- $\gamma$  reaktiver und nicht reaktiver Patienten gleich, ungeachtet der Art des TGF- $\beta$ 1 Nachweises (Abb. 4.29). Schussfolgernd sieht es nach Berücksichtigung aller oben genannten Aspekte danach aus, als wäre der Hauptzelltyp der TGF- $\beta$ 1 Sekretion die Tumorzelle selbst.



**Abb. 4.29: Korrelation des TGF- $\beta$ 1-Gehalts in Tumorlysaten und Tumorzellüberständen mit der induzierten T-Zellantwort im IFN- $\gamma$  ELISpot.**

Dargestellt ist die Verteilung von induzierten IFN- $\gamma$  Immunantworten im kurzzeitigen ELISpot Test innerhalb der mittels ELISA gemessenen Konzentrationen (pg/ml) für TGF- $\beta$ 1 in 50 $\mu$ g Tumorlysat und 10<sup>6</sup> Tumorzellen. Immunologisch reaktive (geschlossene Quadrate) und nicht reaktive (offene Quadrate) Patienten werden miteinander verglichen. Korrespondierende Patienten beider Graphiken sind mit rot markiert. Die gemittelte

Zytokinkonzentration in 50µg Gewebelysat gesunder Spender oder  $10^6$  normalen Brustepithelzellen bzw. -fibroblasten (Malet *et al.*, 2001) wird als grauer Hintergrund angezeigt. \* und (\*) kennzeichnen eine signifikante oder auffällige Erhöhung der Zytokinkonzentrationen in nicht reaktiven im Vergleich zu reaktiven Patienten (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$  bzw.  $p \leq 0,1$ ). Die waagerechten Linien stellen den jeweiligen Mittelwert der untersuchten Gruppe dar.

Zusammenfassend wurde mit dieser Arbeit die allgemeine These (Heimdall *et al.*, 1999; Tisch *et al.*, 1998) bestätigt, dass Kopf-Hals-Tumorpatienten systemisch und lokal immunsupprimiert sind. Dabei wurde hier erstmalig das Zytokinmilieu im Primärtumor selbst und nicht nur in Zellkulturüberständen untersucht. Die oben genannte Annahme ist teilweise auf IL-10, hauptsächlich jedoch auf TGF-β1 zurückzuführen. Die starke TGF-β1 Produktion maligner Zellen scheint die Erkennung des Tumors von T-Zellen, deren Aktivierung und die daraus resultierende Etablierung eines immunologischen Gedächtnisses zu beeinflussen.

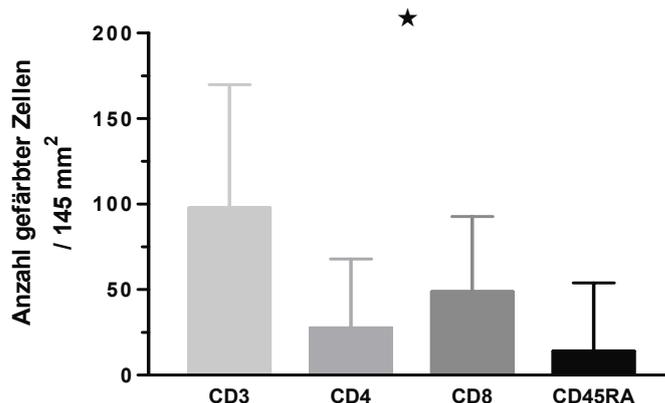
## 4.6 T-Zellinfiltration in Kopf-Hals-Tumoren

Bisher ist gezeigt worden, dass die Mehrheit der Kopf-Hals-Tumorpatienten Th1 oder Th2 polarisierte Immunantworten peripher und lymphatisch aufweisen. In Primärtumoren waren sowohl pro- als auch antiinflammatorische Zytokine nachweisbar. Es sollte nun geklärt werden, wie sich beide tumorimmunologische Aspekte zu einem Gesamtbild zusammenfügen. Dazu wurde die T-Zellinfiltration von 68 Primärtumoren und Metastasen bestimmt (unveröffentlichte Daten von S. Pfannenstiel). Immunhistologisch wurde das Vorkommen von CD3, CD4 und CD8 positiven Zellen analysiert. Mit diesem Vorgehen ist die Detektion tumorspezifischer T-Zellklone jedoch nicht gewährleistet. Dies wäre mittels Immunhistologie nur schwer einsetzbar, da Serienschnitte des gesamten Tumors, sowie sehr spezifische Antikörper gegen die hypervariablen Regionen des T-Zellrezeptors benötigt werden würden. Ein besseres System stellt die mittels rekombinanter MHC Tetramere Fluoreszenzfärbung frisch isolierter tumorinfiltrierender Lymphozyten dar. Diese Multimere erlauben in der Durchflusszytometrie eine genaue Bestimmung der T-Zellspezifität. Da nur eingefrorene Tumor- und Metastasenbiopsien zur Verfügung standen, wurde zur besseren Charakterisierung der infiltrierenden Immunzellen auch das CD45RA Molekül, vorkommend nur in naiven T-Zellen, immunhistologisch untersucht.

Als Nächstes wurde die T-Zellinfiltration von 38 Kopf-Hals-Tumoren mit der IFN- $\gamma$  Immunreaktivität und dem Tumorzytokinmilieu korrespondierender Patienten verglichen.

### 4.6.1 Nachweis der T-Zellinfiltration in Primärtumoren und Metastasengeweben und Vergleich dieser mit der Tumorklassifizierung

Insgesamt wurde in 68 Primärtumoren oder Metastasengewebe die Infiltration von CD3, CD4, CD8 und CD45RA positiven Zellen analysiert. CD3 stellte dabei die größte Population dar, bestehend hauptsächlich aus CD8 und nicht CD4 Zellen. CD45RA war dabei die kleinste Lymphozytensubpopulation (Abb. 4.30). Alle möglichen Gegenüberstellungen wiesen Signifikanzen auf ( $p \leq 0,05$ ).



**Abb. 4.30: T-Lymphozyteninfiltration in Tumor- und Metastasengewebe von Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

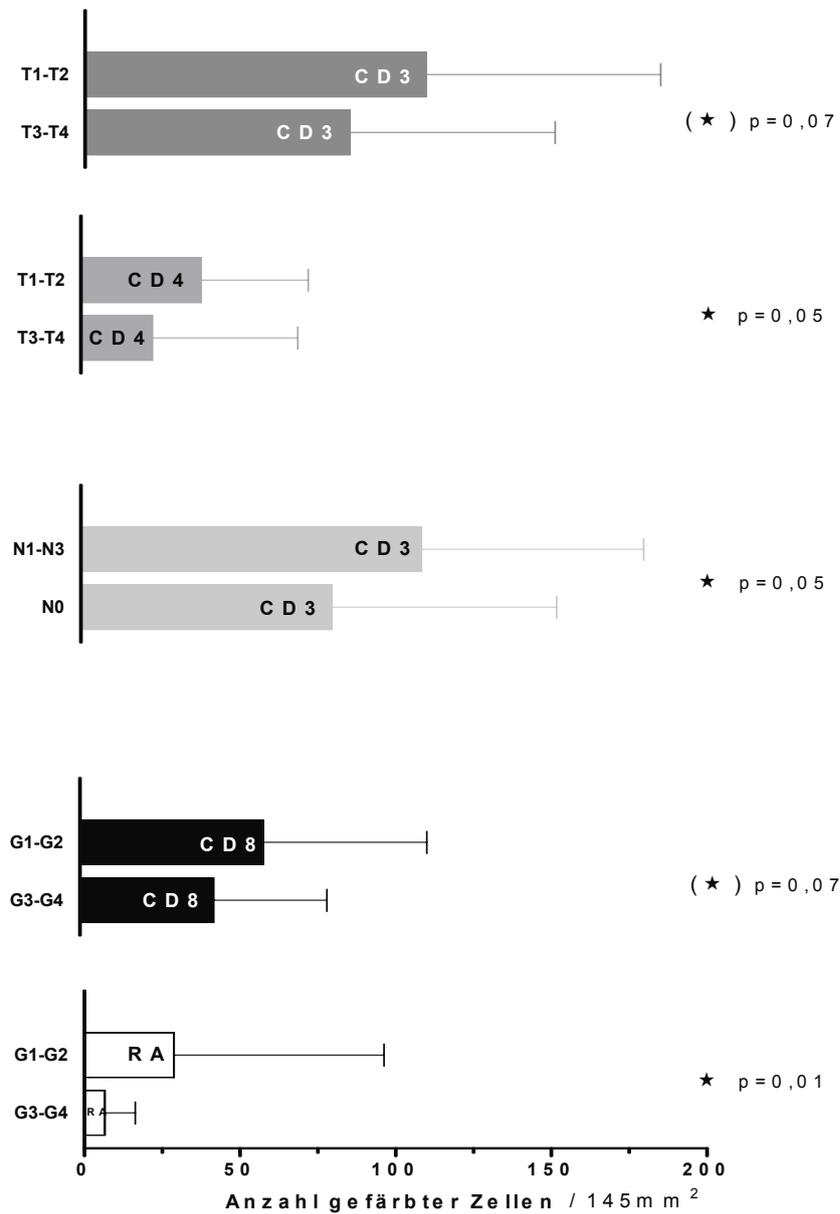
Dargestellt ist die Anzahl mittels Immunhistologie gefärbter CD3 (hellgrauer Balken), CD4 (grauer Balken), CD8 (dunkelgrauer Balken) und CD45RA (schwarzer Balken) Zellen in 68 Patientenbiopsien. Die Auszählung der positiven Zellen innerhalb von sechs Tumorarealen (145mm<sup>2</sup>) erfolgte automatisiert mit der *analySIS* Software. \* kennzeichnet eine für die gesamte Infiltration signifikante Verteilung der einzelnen Lymphozytenpopulationen miteinander (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ). Der Fehlerindikator zeigt die Standardabweichung an.

Nachfolgend wurde für diese Patientenkohorte die T-Zellinfiltration mit der Klassifizierung der Kopf-Hals-Tumore verglichen. Als erstes wurde die T-Zellinfiltration mit der TNM-Klassifizierung verglichen (Abb. 4.31 oben und Mitte). Für die Größe des Primärtumors (T) hat sich rausgestellt, dass Patienten mit einer kleineren Tumorgöße (T1-T2; n=36) auffällig mehr CD3 ( $p=0,07$ ) und signifikant mehr CD4 ( $p \leq 0,05$ ) Zellen im Vergleich zu solchen mit größeren Tumoren (T3-T4; n=32) aufwiesen. Die Präsenz von CD3 und CD4 Zellen könnte die lokale Ausdehnung des Primärtumors möglicherweise beeinflussen. Bezüglich dem Befall regionärer Lymphknoten (N) ließ sich erkennen, dass mit zunehmender Involvierung der Lymphknoten (N1-N3; n=41) die Anzahl CD3 positiver Zellen im Vergleich zu keiner Lymphknotenmetastasierung (N0; n=27) signifikant größer war ( $p \leq 0,05$ ). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass im metastasierten Lymphknoten verstärkt T-Zellaktivierung stattgefunden hat. Dies wäre aufgrund des Vorkommens MHC I positiver Tumorzellen im befallenen Lymphknoten möglich. Fernmetastasen (M) kommen bei Kopf-Hals-Tumorpatienten in der Regel selten vor, deswegen konnte dieser Aspekt nicht analysiert werden.

Einen interessanten Befund lieferte die Korrelation der T-Zellinfiltration mit dem Differenzierungsgrad (G) des Primärtumors (Abb. 4.31 unten). Nur hochdifferenzierte Karzinome (G1-G2; n=21) wiesen auffällig erhöhte CD8 ( $p=0,07$ ) und signifikant höhere CD45RA ( $p \leq 0,05$ ) Zellzahlen im Vergleich zu solchen mit mäßiger bis schlechter

Differenzierung (G3-G4, n=44). Folglich migrieren zytotoxische und naive T-Zellen vermehrt in Tumorgewebe minimaler Entartung.

Zusammengefasst war die T-Zellinfiltration am stärksten, wenn der Primärtumor von kleiner Größe ist und geringe Malignität aufweist. Die Metastasierung regionärer Lymphknoten begünstigte die T-Zellinfiltration ebenso.



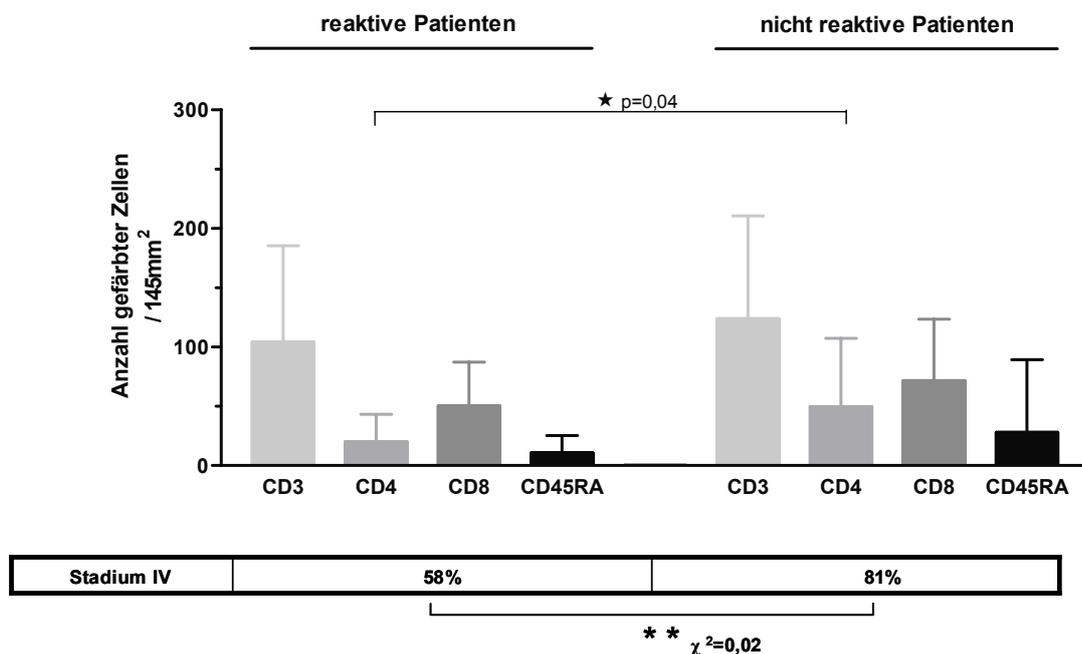
**Abb. 4.31: Korrelation der T-Zellinfiltration im Tumor mit der Klassifizierung von Kopf-Hals-Tumoren.**

Dargestellt ist die mittlere Anzahl durch Immunhistologie gefärbter CD3, CD4 und CD8 Zellen in 68 Patientenbiopsien eingeteilt gemäß der Tumorklassifizierung (siehe Achsenbeschriftung). Die Patientenzahlen innerhalb der Gruppen betragen für T1-T2 36, für T3-T4 32, für N0 27, für N1-N3 41, für R1 45 und für R2-R3 23. Die Auszählung der positiven Zellen innerhalb von sechs Tumorarealen (145mm<sup>2</sup>) erfolgte automatisiert mit der *analySIS* Software. \* und (\*) kennzeichnen eine signifikant oder auffällig erhöhte Verteilung der

Lymphozytenpopulationen in den jeweils miteinander vergleichenden Gruppen (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$  bzw.  $p \leq 0,1$ ). Der Fehlerindikator zeigt die Standardabweichung an.

#### 4.6.2 T-Zellinfiltration in Kopf-Hals-Tumoren und tumorreaktives T-Zellgedächtnis

Im Folgenden sollte die T-Zellinfiltration und die Präsenz tumorspezifischer Gedächtnis T-Zellen im kurzzeitigen IFN- $\gamma$  ELISpot Test korrespondierender Patienten geprüft werden. Eine derartige Gegenüberstellung war in 38 Patienten möglich. In der Gesamtanalyse fiel auf, dass nicht tumorreaktive Patienten signifikant mehr CD4 Zellen im Tumorgewebe aufwiesen ( $p \leq 0,05$ ; Abb. 4.32). Hinzu lieferte die Korrelation dieser Verteilung von tumorinfiltrierenden Lymphozyten mit der Tumorstadieneinteilung dieser Kohorte einen signifikanten Befund: nicht reaktive Patienten waren zu 81% (21/26) dem Spätstadium IV zuzuordnen, während dies für 58% (7/12) aller tumorreaktiven Patienten der Fall war (Abb. 4.32).

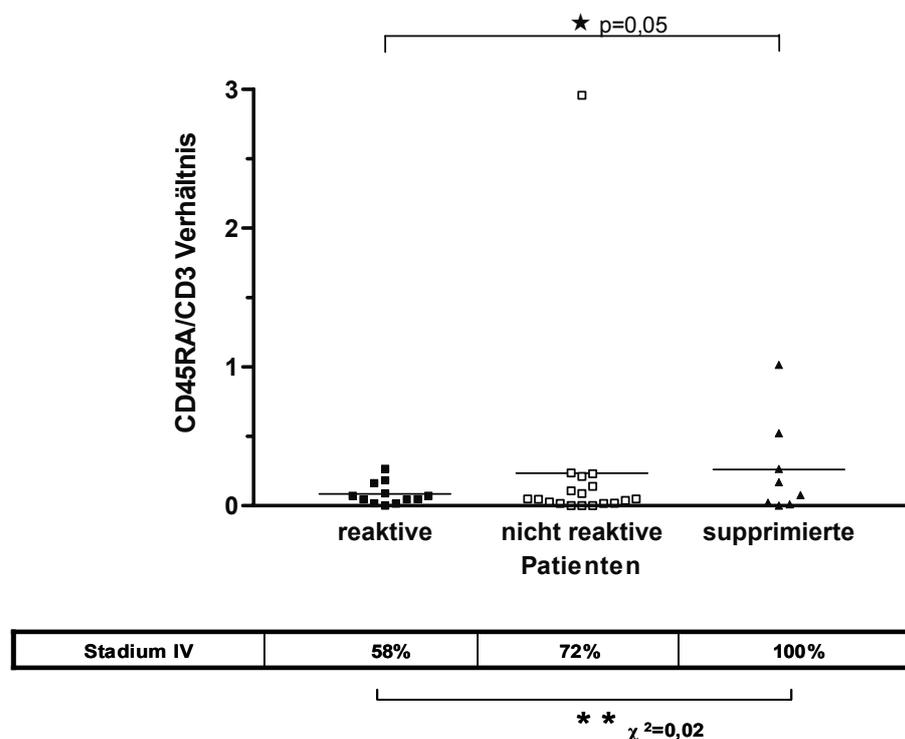


**Abb. 4.32: T-Lymphozyteninfiltration des Tumorgewebes in An- und Abwesenheit des Anti-Tumorgedächtnisses bei Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

Dargestellt ist die Anzahl mittels Immunhistologie gefärbter CD3 (hellgraue Balken), CD4 (graue Balken), CD8 (dunkelgraue Balken) und CD45RA (schwarze Balken) Zellen in 38 Patientenbiopsien innerhalb tumorreaktiver (links) und nicht tumorreaktiver (rechts) Patienten. In der integrierten Tabelle wird die Stadium IV Zuordnung dieser Gruppen angezeigt. Die Auszählung der positiven Zellen innerhalb von sechs Tumorealen ( $145\text{mm}^2$ ) erfolgte automatisiert mit der analySIS Software. \* kennzeichnet eine signifikant erhöhte CD4 Infiltration bei nicht reaktiven Patienten im Vergleich zu reaktiven (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ). \*\* zeigt eine

signifikante Erhöhung der Stadium IV Zuordnung von nicht reaktiven Patienten im Vergleich zu reaktiven (Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest  $p \leq 0,05$ ). Der Fehlerindikator zeigt die Standardabweichung an.

Deutlich war hier auch, dass tendenziell weniger CD45RA positive Zellen im Tumor reaktiver Patienten detektiert wurden. Um dies näher beurteilen zu können, wurde das CD45RA/CD3 Verhältnis analysiert und dessen Verteilung innerhalb der IFN- $\gamma$  Immunantwort untersucht. Die Gegenüberstellung ergab, dass die Mehrheit der infiltrierenden CD3 T-Zellen nicht reaktiver und supprimierter Patienten naiven Phänotyps war (Abb. 4.33). Für supprimierte Patienten war dies statistisch signifikant ( $p \leq 0,05$ ). Gleichzeitig war eine signifikant niedrigere Stadium IV Zuordnung reaktiver Patienten (7/12) im Vergleich zu supprimierten (8/8, Abb. 4.33) zu verzeichnen. Allem Anschein nach handelte es sich bei den mittels Immunhistologie detektierten Zellen reaktiver Patienten um tumorspezifische Effektor/Gedächtnis T-Zellen.

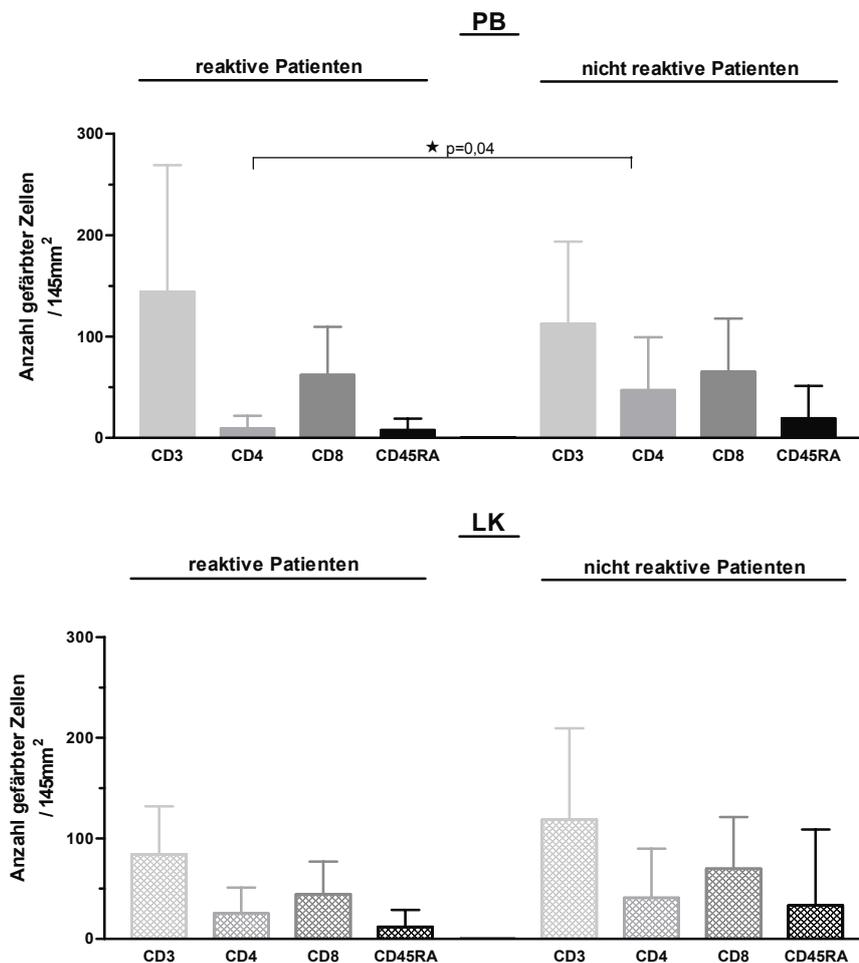


**Abb. 4.33: Verteilung des CD45RA/CD3 Verhältnisses infiltrierender Zellen des Tumorgewebes innerhalb der IFN- $\gamma$  Immunantwort bei Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

Dargestellt ist die Verteilung aller gebildeter CD45RA/CD3 Quotienten für mittels Immunhistologie gefärbte Zellen des Tumorgewebes ( $n=38$ ) in IFN- $\gamma$  reaktiven (geschlossene Quadrate,  $n=6$ ), nicht reaktiven (offene Quadrate,  $n=18$ ) und supprimierten (Dreiecke,  $n=8$ ) Patienten. In der integrierten Tabelle wird die Stadium IV Zuordnung dieser Gruppen angezeigt. \* kennzeichnet eine signifikante Erhöhung des CD45RA/CD3 Verhältnisses supprimierter Patienten im Vergleich zu reaktiven (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,05$ ). \* \* zeigt eine signifikante Erhöhung der Stadium IV Zuordnung von nicht reaktiven Patienten im Vergleich zu reaktiven (Chi-Quadrat-

Unabhängigkeitstest  $p \leq 0,05$ ). Die waagerechten Linien stellen den jeweiligen Mittelwert der untersuchten Gruppe dar.

Das vermehrte Vorkommen CD4 positiver Zellen in nicht reaktiven Patienten deutet auf die Präsenz regulatorischer T-Zellen hin. Zur näheren Charakterisierung dieser Annahme wäre eine immunhistologische Färbung des Transkriptionsfaktors FOXP3 notwendig. Da dies im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde, wurde die regulatorische Aktivität nur indirekt nachgewiesen. Dafür wurde die Verteilung der Lymphozyteninfiltration innerhalb reaktiver und nicht reaktiver Patienten für peripheres Blut und tumordrainierenden, nicht metastasierten Lymphknoten getrennt analysiert. An das in 4.4.1 gezeigte Vorkommen supprimierter Patienten, das hauptsächlich im Blut und nicht im Lymphknoten evident war, wurde hier noch einmal erinnert. Jedoch war die Anzahl supprimierter Patienten für jeweils Blut und Lymphknoten in dieser Patientenkohorte zu klein und damit für weitere Aufschlüsselungen nicht repräsentativ. Ungeachtet dessen wiesen nur nicht tumorreaktive Patienten des Blutes signifikant mehr CD4 Tumorinfiltration auf (Abb. 4.34).



**Abb. 4.34: T-Lymphozyteninfiltration des Tumorgewebes in An- und Abwesenheit des Anti-Tumorgedächtnisses in Blut und Lymphknoten bei Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

Dargestellt ist die Anzahl mittels Immunhistologie gefärbter CD3 (hellgraue Balken), CD4 (graue Balken), CD8 (dunkelgraue Balken) und CD45RA (schwarze Balken) Zellen in Patientenbiopsien innerhalb tumorreaktiver (links) und nicht tumorreaktiver (rechts) Patienten des Blutes (A) (solide Balken, n=34) und Lymphknotens (B) (schraffierte Balken, n=27). Die Auszählung der positiven Zellen innerhalb von sechs Tumorarealen ( $145\text{mm}^2$ ) erfolgte automatisiert mit der *analySIS* Software. \* kennzeichnet eine signifikant erhöhte CD4 Infiltration bei nicht reaktiven Patienten des Blutes im Vergleich zu reaktiven (Mann-Whitney nicht parametrischer U Test  $p \leq 0,05$ ). Der Fehlerindikator zeigt die Standardabweichung an.

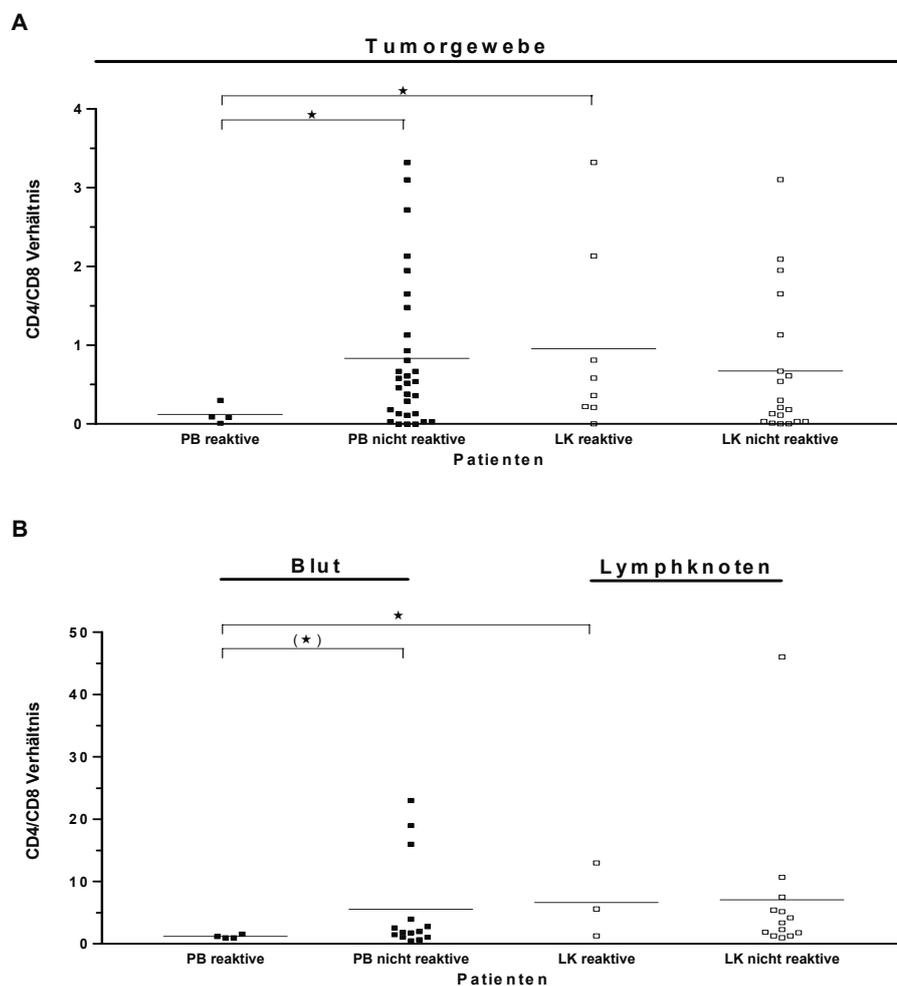
Aus dieser Analyse wurde ersichtlich, dass die allgemein stärkere CD4 Tumordinfiltration nicht tumorreaktiver Patienten hauptsächlich den tumorimmunologischen Zustand des peripheren Blutes widerspiegelte. Nun liegt die Annahme nahe, dass die CD4 Zellen beider Kompartimente, die in den Tumor migrierten, grundsätzlich verschieden waren. Möglicherweise gehörten die CD4 Zellen des Blutes überwiegend der antiinflammatorischen, suppressorischen oder gar regulatorischen T-Zellpopulation an, während die aus dem nicht metastasierten Lymphknoten teilweise auch inflammatorische Aktivität zeigten. Alle zuvor aufgedeckten Th1 und Th2 polarisierten, sowie supprimierten Reaktivitäten, die sich in Blut und Lymphknoten unterscheiden, würden dafür sprechen.

Der oben genannte Sachverhalt wurde näher charakterisiert, indem das Verhältnis von CD4 zu CD8 infiltrierender Zellen des Tumorgewebes gebildet wurde. Dieses wurde dann mit der IFN- $\gamma$  ELISpot Reaktivität verglichen. Der CD4/CD8 Quotient war in reaktiven Patienten des Blutes im Vergleich zum Lymphknoten grundsätzlich verschieden (Abb. 4.35 A). Während in Tumorgeweben reaktiver Patienten des Lymphknotens genauso viele CD4 wie CD8 Zellen vorkamen, lag in solchen Patienten des Blutes ein signifikantes Ungleichgewicht zugunsten der CD8 Zellen vor ( $p \leq 0,05$ ). Im Hinblick auf die signifikante Wiedererlangung des Gleichgewichts in nicht reaktiven Patienten des Blutes ( $p \leq 0,05$ ) und in Einklang mit den multiparametrischen ELISpot Analysen, lässt sich für das periphere Blut folgende Aussage machen: die hier bestehende Immunreaktivität kam möglicherweise durch die Existenz direkt wirkender, zytotoxischer CD8 Gedächtnis T-Zellen zustande. Diese könnten ins Tumorgewebe einwandern und würden durch niedrige CD45RA Expression erfasst werden (Abb. 4.34 A). Ob nun die CD8 Effektor/Gedächtnis T-Zellen im Tumorgewebe ihre Effektorfunktionen ausüben können, wurde nicht untersucht. Die klinischen Daten der Patienten, sowie die Tumorklassifizierung könnten hier sehr aufschlussreich sein; jedoch sind derartige Gegenüberstellungen aufgrund der kleinen Anzahl tumorreaktiver Patienten des Blutes in dieser Kohorte nicht weiter möglich. Dennoch handelte es sich bei der höheren

Tumordinfiltration von CD8 T-Zellen in nicht reaktiven Patienten hauptsächlich um CD45RA positive, naive T-Zellen (Daten nicht gezeigt).

Im tumordrainierenden, nicht metastasierten Lymphknoten besaßen sowohl CD4 als auch CD8 T-Zellen tumorgerichtete indirekt (Zytokine) und direkt (lytische Effektormoleküle) wirkende Aktivität. Insbesondere erstere könnten das migratorische Verhalten der T-Zellen beeinflussen, was zu einem Gleichgewicht der CD4 und CD8 Infiltration führen könnte.

Interessante und ergänzende Informationen lieferte der Vergleich des CD4/CD8 Quotienten infiltrierender Zellen im Tumorgewebe (Abb. 4.35 A) mit dem blutzirkulierenden oder lymphatisch residenter T-Zellen (Abb. 4.35 B). Die Verteilung des CD4/CD8 Verhältnisses war innerhalb reaktiver und nicht reaktiver Patienten in allen drei Kompartimenten tendenziell gleich. Somit war ein direkter Vergleich erlaubt. Im Blut reaktiver Patienten zirkulierten auffällig mehr CD8 T-Zellen im Vergleich zu nicht reaktiven Patienten ( $p=0,06$ ) und signifikant mehr im Vergleich zu reaktiven Patienten des Lymphknotens. Möglicherweise kamen auch gerade deswegen signifikant mehr CD8 Zellen im Tumorgewebe reaktiver Patienten des Blutes ( $p \leq 0,05$ ) vor.

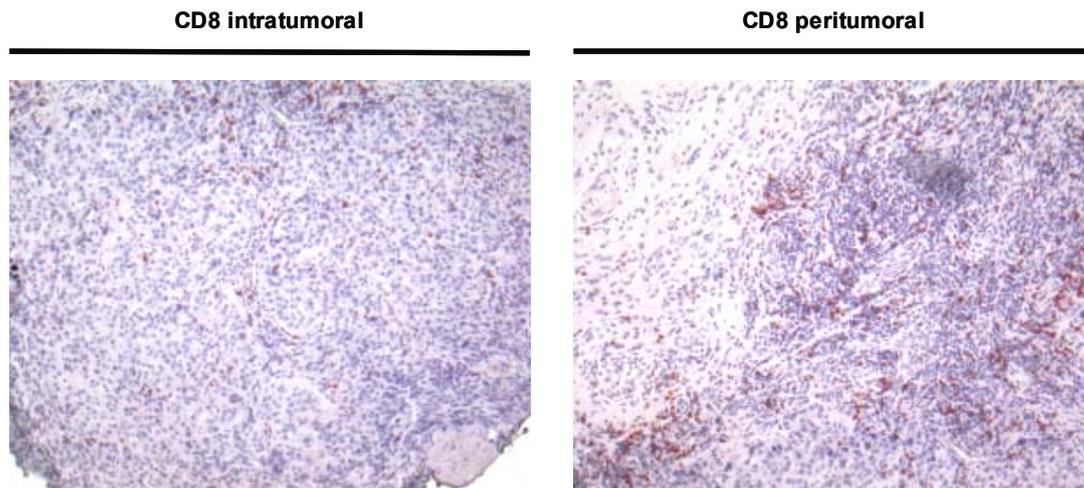


**Abb. 4.35: Verteilung des CD4/CD8 Verhältnisses erfasst aus Zellen des Tumorgewebes, Blutes und Lymphknotens in An- und Abwesenheit des Anti-Tumorgedächtnisses in Blut und Lymphknoten bei Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

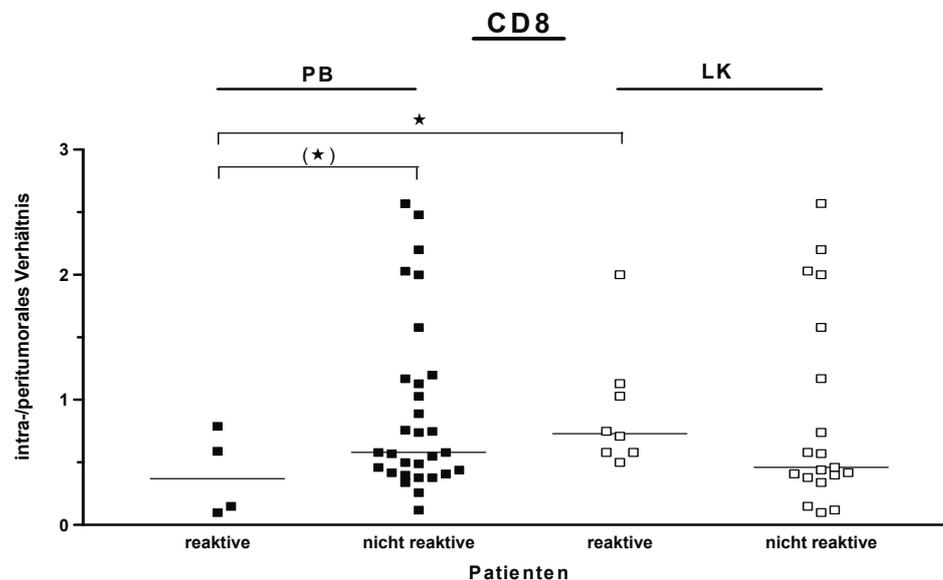
Dargestellt ist die Verteilung aller gebildeter CD4/CD8 Quotienten für mittels Immunhistologie gefärbte Zellen des Tumorgewebes ((A), n=38) und für durch MACS<sup>®</sup> Separation isolierte Zellen des Blutes (links) und Lymphknotens (rechts) ((B), n=19) innerhalb reaktiver und nicht reaktiver Patienten für Blut (geschlossene Quadrate) und Lymphknoten (offene Quadrate). \* und (\*) kennzeichnen eine signifikante oder auffällige Erniedrigung des CD4/CD8 Verhältnisses reaktiver Patienten im Blut im Vergleich zu nicht reaktiven desselben Kompartiments oder reaktiven des anderen (Mann-Whitney nicht parametrischer U Test  $p \leq 0,05$  bzw.  $p \leq 0,1$ ). Die waagerechten Linien stellen den jeweiligen Mittelwert der untersuchten Gruppe dar.

Die multiparametrischen ELISpot Analysen wiesen auf eine ausschließlich Th2 polarisierte Immunantwort tumorreaktiver Blut CD4 Zellen hin, während im Lymphknoten sowohl Th1 als auch Th2 Immunreaktivität der CD4 Subpopulation vorhanden war. In Hinsicht auf die zuvor beschriebenen Beobachtungen infiltrierender CD8 Zellen, stellte sich nun die Frage, ob tumorspezifische zytotoxische T-Zellen in einem Th2 polarisierenden Milieu ihre Effektorfunktionen ausüben können. Dazu wurde die T-Zellinfiltration nicht im gesamten Tumorgewebe beurteilt, sondern intra- und peritumoral getrennt betrachtet. Diese Unterscheidung war auf sämtlichen untersuchten Patientenbiopsien möglich (Abb. 4.36 A) und wurde mit Hilfe des intra-/peritumoralen Verhältnisses sichtbar. Tatsächlich fiel hier noch einmal die für das periphere Blut IFN- $\gamma$  reaktive Patientengruppe auf. Sowohl für CD3 und CD4 (Daten nicht gezeigt) als auch für CD8 (Abb. 4.36 B) war für diese Patienten die Infiltration am Rand des Tumors konzentriert. Die Patientenkohorte mit Reaktivität im Lymphknoten demonstrierte dagegen eine gleichmäßige CD8 Tumordinfiltration. Bei nicht reaktiven Patienten war die CD8 Infiltration peritumoral mehr ausgeprägt und es bestand ein Gleichgewicht zwischen Blut und Lymphknoten. Unter den hier analysierten Patientengruppen fiel bei letztgenannten Patienten die intratumorale CD8 Infiltration am stärksten aus. Die Unterschiede waren gegenüber nicht reaktiven Patienten des Blutes auffällig ( $p=0,08$ ) und gegenüber reaktiven Patienten des Lymphknotens signifikant ( $p \leq 0,05$ ). Nennenswert ist auch die Beobachtung, dass CD4 Zellen in allen nicht reaktiven Patienten intratumoral überwiegen (Daten nicht gezeigt). Zudem waren ca. 80% der hier peripher analysierten Patienten dem Stadium IV zuzuordnen (Abb. 4.36). Dieser Prozentsatz stimmte auch für lymphatisch nicht reaktive Tumorerkrankte zu. Tumorreaktive Patienten des Lymphknotens demonstrierten dagegen zur Hälfte fortgeschrittenes Tumorstadium.

A



B



Stadium IV	75%	80%	50%	79%
------------	-----	-----	-----	-----

**Abb. 4.36: Verteilung des intra-/peritumoralen Verhältnisses für CD8 T-Zellen des Tumorgewebes in An- und Abwesenheit von Anti-Tumorgedächtnis in Blut und Lymphknoten bei Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

Gezeigt in (A) ist die histologische Analyse der CD8 Infiltration eines repräsentativen Kopf-Hals-Tumorpatienten. Es sind 5µm dicke Gefrierschnitte vom Tumorgewebe dargestellt, mit Hämalaun (blau) gegengefärbt wurden. CD8 gefärbte Zellen (rot) sind intra- (rechts) und peritumoral (links) nachweisbar. 20-fache Vergrößerung. Dargestellt in (B) ist die Verteilung aller gebildeter intra-/peritumoraler Quotienten für mittels Immunhistologie gefärbte CD8 T-Zellen des Tumorgewebes (n=38) innerhalb reaktiver (links) und nicht reaktiver (rechts) Patienten für Blut (geschlossene Quadrate) und Lymphknoten (offene Quadrate). In der integrierten Tabelle wird die Stadium IV Zuordnung dieser Gruppen angezeigt. (\*) und \* kennzeichnen eine auffällige oder signifikante Erniedrigung des intra-/peritumoralen Verhältnisses reaktiver Patienten im Blut im Vergleich zu nicht reaktiven

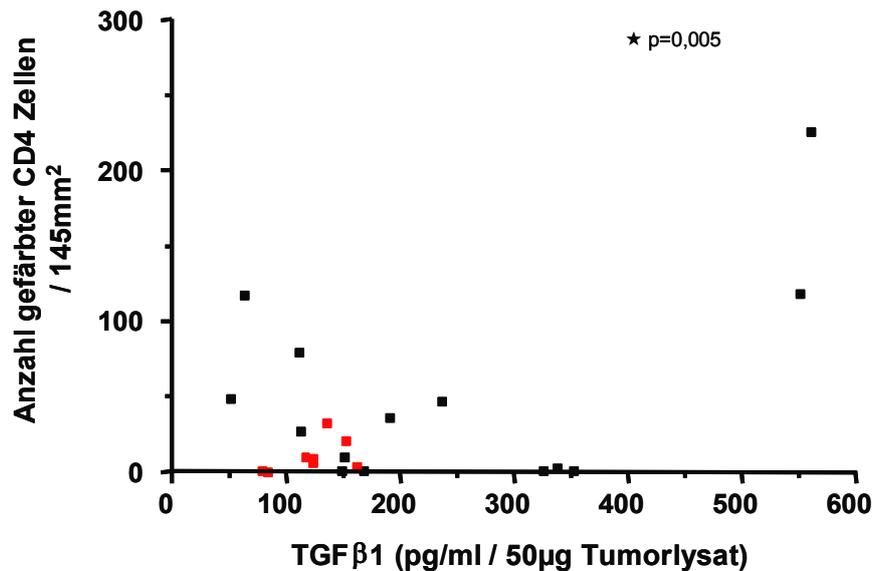
desselben Kompartiments oder für reaktive des anderen (zwei Stichproben Student'scher t-Test  $p \leq 0,1$  bzw.  $p \leq 0,05$ ). Die waagerechten Linien stellen den jeweiligen Median der untersuchten Gruppe dar.

Zusammengefasst lässt sich folgendes Gesamtbild erkennen: im peripheren Blut Kopf-Hals-Tumorpatienten zirkulierten hauptsächlich Th1 modulierende CD4 T-Zellen, während im tumordrainierenden, nicht metastasierten Lymphknoten bedeutend viele Th1 polarisierte CD4 T-Zellen existierten. Im Falle einer Immunreaktivität des Patienten im peripheren Blut migrierten tumorspezifische CD8 T-Zellen zahlreich ins Tumorgewebe, drangen jedoch nicht ins Tumornere ein. In Abwesenheit einer Immunreaktivität waren es die Th2 bzw. Th3 polarisierte oder regulatorische T-Zellen, die dorthin gelangten. In lymphknotenuntersuchten Patienten waren CD4 und CD8 T-Zellen stets gleichmäßig verteilt. Einen Unterschied gab es darin, dass das Tumorgewebe reaktiver Patienten weniger naive Zellen beinhaltete.

#### **4.6.3 T-Zellinfiltration und Zytokinmilieu in Kopf-Hals-Tumoren**

Die Frage, von welchen Zellen das in Abschnitt 4.5.2 als erhöht nachgewiesene TGF- $\beta$ 1 nicht tumorreaktiver Patienten produziert wird, ist schon einmal adressiert worden. Größtenteils scheinen die Tumorzellen selbst für die starke TGF- $\beta$ 1 Freisetzung verantwortlich zu sein. Ob nun auch Immunzellen daran beteiligt waren, wurde in einer Gegenüberstellung der T-Zellinfiltration mit dem Zytokinmilieu geprüft. Die Sekretionsmuster aller Zytokine wurden mit sämtlichen T-Zellinfiltraten verglichen, es war aber noch einmal das TGF- $\beta$ 1, in dem sich für 22 Patienten eine Korrelation gezeigt hat. Hohe TGF- $\beta$ 1 Konzentrationen im Tumorgewebe korrelierten mit steigender CD4 Infiltration in diesem (Pearson Koeffizient  $r=0,53$ ,  $p \leq 0,05$ , Abb. 4.37). Dies war sowohl für das gesamte Tumorgewebe (hier gezeigt) als auch intra- und peritumoral (Daten nicht gezeigt) wahr.

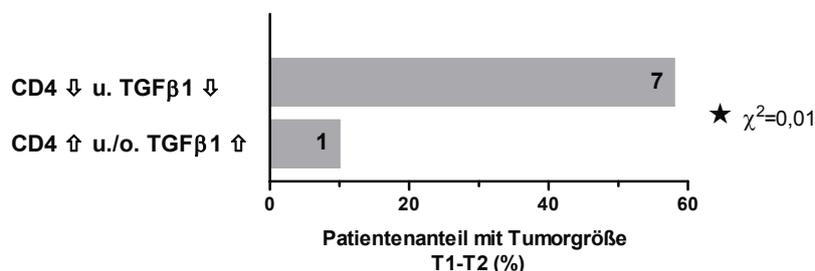
Diese Patientenkohorte beinhaltete acht IFN- $\gamma$  reaktive Patienten. Sieben davon zeigten relativ zum jeweiligen Mittelwert niedrige CD4 Infiltration und TGF- $\beta$ 1 Produktion gleichzeitig. Nur ein Patient wies hohe CD4 Infiltration in Kombination mit niedrigem TGF- $\beta$ 1 Wert auf.



**Abb. 4.37: Korrelation zwischen CD4 Infiltration und TGF- $\beta$ 1 Freisetzung in Tumorgeweben von Kopf-Hals-Tumorpatienten.**

Dargestellt sind die mittels ELISA Tests gemessenen Konzentrationen (pg/ml) von TGF- $\beta$ 1 in 50 $\mu$ g Tumorlysat und die mittels Immunhistologie nachgewiesene CD4 Tumorinfiltration zusammengehöriger Patienten (n=22). Es besteht eine signifikant positive Korrelation (Pearson Koeffizient  $r=0,53$ ,  $p \leq 0,05$ ). IFN- $\gamma$  reaktive Patienten sind in rot gekennzeichnet.

Schließlich war es von großem Interesse, wie die Tumorklassifizierung in dieser Patientenkohorte ausfiel. Für diesen Aspekt hat sich rausgestellt, dass Patienten mit wenig CD4 Infiltration und wenig TGF- $\beta$ 1 Freisetzung gleichzeitig eine kleinere Tumorgöße (T1-T2) aufwiesen (58%, 7/12) im Vergleich zu Patienten mit mindestens einer Komponente erhöht (10%, 1/10, Abb. 4.38).



**Abb. 4.38: Korrelation der CD4 Tumorinfiltration in Kombination mit der TGF- $\beta$ 1 Konzentration im Tumorgewebe mit der T-Klassifizierung von Kopf-Hals-Tumoren.**

Dargestellt ist der Anteil von Patienten mit Tumorgöße T1-T2 (dunkelgraue Balken) für die angezeigten Infiltration/Zytokinkombinationen (siehe Achsenbeschriftung). Es wurden 22 Patienten evaluiert. CD4 und TGF- $\beta$ 1

lagen als erhöht/erniedrigt vor, wenn sich die in der Histologie nachgewiesene Anzahl an gefärbten Zellen bzw. die im ELISA Test gemessene Konzentration (pg/ml) über/unter der gemittelten Anzahl/Konzentration befand. Die absolute Anzahl reaktiver Patienten ist angegeben. \* zeigt eine signifikant unterschiedlichen Patientenanteil in den miteinander vergleichenden Infiltration/Zytokinkombinationen (Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest  $p \leq 0,05$ ).

Zusammengefasst lassen die oben gezeigten Daten die Schlussfolgerung zu, dass auch CD4 T-Zellen an der TGF- $\beta$ 1 Produktion im Tumor beteiligt sind. Je mehr CD4 Zellen sich im Tumor befanden, umso stärker war die Freisetzung dieses suppressiven Zytokins. Dies wirkte sich auf das IFN- $\gamma$  Anti-Tumorgedächtnis, sowie auf die Tumorgroße aus. Es kann also angenommen werden, dass es sich hierbei um suppressorische Th3 oder regulatorische T-Zellen handelte.

## 5. Diskussion

Ursprünglich wurde angenommen, dass Lymphozyten die Basis der Tumor-Immunüberwachung (*cancer immunosurveillance*) bildeten: ein Prozess, der immunkompetente Organismen gegen primäre Tumorentwicklung schützt (Lawrence, 1959; Burnet, 1970). Dieser Grundgedanke wurde aber weitgehend verlassen, nachdem keine Unterschiede in der primären Tumorentwicklung von athymischen Nacktmäusen und syngenen Wildtypmäusen beobachtet werden konnten (Stutman, 1979b; Stutman, 1979a; Stutman, 1974). Nachfolgende Untersuchungen belegten, dass Nacktmäuse nicht vollständig frei von funktionsfähigen T-Zellen sind (Maleckar *and* Sherman, 1987; Hunig *and* Bevan, 1980) und dass zwei Komponenten des Immunsystems, IFN- $\gamma$  (Kaplan *et al.*, 1998; Dighe *et al.*, 1994) und Perforin (Smyth *et al.*, 2000b; Smyth *et al.*, 2000a; van den Broek *et al.*, 1996), die Tumorprogression in Mäusen verhindern können.

Seitdem konnten mehrere Forschungsgruppen bei Tumorpatienten nachweisen, dass auf neoplastischen Zelloberflächen exprimierte Antigene vom Immunsystem spontan erkannt werden und dass dies zur Auslösung von humoralen und zellulären Immunantworten führt. Während die Antikörper vermittelte Immunität neuerdings an Aufmerksamkeit gewinnt (Old *and* Chen, 1998), sind T-Zell vermittelte Immunreaktionen in lymphatischen Organen bedeutendes Untersuchungsobjekt. Spontane Tumor-Immunreaktivität konnte unter anderem beim Mamma- (Feuerer *et al.*, 2001; McCoy *et al.*, 2000), Kolon- (Nagorsen *et al.*, 2000) und Pankreaskarzinom (Schmitz-Winnenthal *et al.*, 2005), sowie malignen Melanom (Muller-Berghaus *et al.*, 2006; Letsch *et al.*, 2000) und multiplen Myelom (Choi *et al.*, 2005) beobachtet werden. Tumorspezifische T-Zellen waren in Blut-, Lymphknoten- und Knochenmarklymphozyten, sowie in Tumor- und Metastasengewebe detektierbar und produzierten nach Stimulation IFN- $\gamma$ .

Die immunologische Tumorreaktivität korrelierte mit klinischen Faktoren, wie niedrigere Rezidivrate in Stadium I und II Brustkrebspatientinnen (McCoy *et al.*, 2000). Tumorspezifische T-Zellen konnten aus Mammakarzinompatientinnen in NOD/SCID Mäusen xenotransplantierte, autologe Tumorstücke infiltrieren und waren in der Lage diese abzustößeln (Feuerer *et al.*, 2001). Tumorimmuntherapeutische Ansätze zur Verstärkung von Immunantworten zeigten klinisch relevante Ergebnisse, wie zum Beispiel die Vakzinierung mit NDV-modifizierten Zellen für Patienten mit Gehirntumoren (Karcher *et al.*, 2004; Steiner *et al.*, 2004) oder der adoptive Transfer von tumorspezifischen Blut- oder tumorinfiltrierender Lymphozyten beim malignen Melanom (Dudley *et al.*, 2002; Yee *et al.*, 2002).

Die Erforschung von Tumor-Immuninteraktionen bei Kopf-Hals-Tumorpatienten hat erst in den letzten Jahren an Interesse gewonnen. Diese Krebsart gilt als sehr aggressiv (Bradford *et al.*, 1999; Bradford *et al.*, 1997; Truelson *et al.*, 1992) und stark immunsupprimierend (Heimdal *et al.*, 1999; Tisch *et al.*, 1998; Pak *et al.*, 1995). Neueste Methoden ermöglichten auch in dieser Tumorentität den Nachweis tumorreaktiver T-Zellen. Tumorspezifische T-Zellen sind bei Kopf-Hals-Tumorpatienten bisher erst von einer Forschungsgruppe direkt und indirekt nachgewiesen worden: p53-spezifische T-Zellen konnten über Tetramerfärbungen in Blut und Tumormasse bei neun von 24 untersuchten Patienten direkt detektiert werden (Albers *et al.*, 2005). Die T-Zellen dieser Kopf-Hals-Tumorpatienten demonstrierten deutlich niedrigere intrazelluläre IFN- $\gamma$  Expression nach CD3-Stimulation im Vergleich zu gesunden Donoren. In dieser Studie wurde auch die Existenz von p53-spezifischen T-Zellen in nicht metastasierten Lymphknoten gezeigt, dies allerdings bei nur drei Patienten. Bei acht Patienten diente die V $\beta$ -Restriktion des T-Zellrezeptors in Blut- und tumorinfiltrierenden Lymphozytenklonen als indirekter Reaktivitätsnachweis gegen ein gemeinsames Tumorepitop (Albers *et al.*, 2006).

In dieser Arbeit wurde die Präsenz, Funktion und Spezifität von tumorspezifischen T-Zellen bei Kopf-Hals-Tumorpatienten in einer größeren, repräsentativen Kohorte von insgesamt 88 Patienten untersucht. Systemische und lokale Immunsuppression wurden näher charakterisiert. Es wurde die Auswirkung dieser Aspekte auf die Immunzellinfiltration von Tumorgewebe untersucht.

In ihrer Gesamtheit stellen die hier gezeigten Analysen eine umfassende Studie der Tumormunität bei Kopf-Hals-Tumorpatienten dar.

## **5.1 Tumorreaktive Gedächtnis T-Zellen existieren bei primär operierten Kopf-Hals-Tumorpatienten**

Die spontane Auseinandersetzung des Immunsystems von primär operierten Kopf-Hals-Tumorpatienten mit ihrem Malignom wurde in der vorliegenden Arbeit anhand von sekundären, tumorspezifischen Gedächtnis T-Zellantworten untersucht. Diese Zellen können nach Stimulation schneller proliferieren und Effektorfunktionen ausüben (Zinkernagel, 2002; Geginat *et al.*, 2001; Goldrath and Bevan, 1999). Nur Gedächtnis T-Zellen können in nicht lymphatischen Geweben sofortige Zytotoxizität nach Aktivierung aufweisen (Masopust *et al.*, 2001). In der Zirkulation von Kopf-Hals-Tumorpatienten existieren weniger naive und gleichzeitig mehr Gedächtnis T-Zellen im Vergleich zu gleichaltrigen gesunden Donoren (Kuss *et al.*, 2005).

Zum Nachweis von Tumor-Immunreaktionen wurde der ELISpot Test angewandt. Dieser Test, der zur so genannten „zweiten Generation von T-Zellanalysen“ gehört (Keilholz *et al.*,

2006), erlaubt die Detektion von bis zu  $1/10^5$  spezifischen, zytokinproduzierenden T-Zellen (Asai *et al.*, 2000) und basiert auf die *ex vivo* Untersuchung von funktionellen T-Zelleigenschaften auf Einzelzellniveau. In den hiesigen Analysen dauerte der ELISpot Test nur 40 Stunden, um die Zytokinfreisetzung von restimulierten Gedächtnis T-Zellen zu erfassen. In unserer Arbeitsgruppe ist gezeigt worden, dass nach einer 40-stündigen Restimulation mit Tumorantigenen ausschließlich Gedächtniszellen, nicht aber Effektor- und naive Zellen, mit einer signifikant erhöhten Zytokinsekretion antworteten (Dissertation C. Choi).

Die spezifische Aktivierung der Gedächtnis T-Zellen erfolgte in den hiesigen Analysen mit dendritischen Zellen, die mit autologem Tumor- oder Metastasenlysat beladen wurden. Die Verwendung von Tumorlysaten als Tumorantigenquelle umgeht den Bedarf von lebenden, frischen Tumorzellen oder die Notwendigkeit Tumorzelllinien *in vitro* zu etablieren.

Beim Zytokinnachweis handelte es sich um IFN- $\gamma$  Produktion von aktivierten CD4 und CD8 Gedächtnis T-Zellen. IFN- $\gamma$  ist ein charakteristisches Typ 1 Zytokin und ein entscheidender Marker für Th1 Immunität. IFN- $\gamma$  hängt mit zellulärer Immunität, Makrophagenaktivierung und Zytotoxizität zusammen (Boehm *et al.*, 1997). Dieses inflammatorische Zytokin wurde aufgrund von pleiotropischen tumorgerichteten Eigenschaften zur Analyse der zellulären Immunität bei Kopf-Hals-Tumorpatienten herangezogen. Im Mausystem ist gezeigt worden, dass Lymphozyten und IFN- $\gamma$  zur Protektion gegen die Etablierung von karzinogeninduzierten Sarkomen und spontanen Epithelkarzinomen kollaborierten (Shankaran *et al.*, 2001). IFN- $\gamma$  ist in der Lage die Apoptose von Tumorzellen einzuleiten (O'Connell *et al.*, 2000; Ossina *et al.*, 1997) und die Tumorangiogenese (Qin *and* Blankenstein, 2000) zu verhindern. Verschiedene klinische Studien zeigten die antitumorale Aktivität von IFN- $\gamma$  beim Ovarialkarzinom (Windbichler *et al.*, 2000) oder Melanom (Propper *et al.*, 2003).

Die Immunantworten der Gedächtnis T-Zellen bei Kopf-Hals-Tumorpatienten wurden in peripherem Blut und Lymphknoten untersucht. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass obwohl hier histologisch nicht metastasierte Lymphknoten (N0) analysiert wurden, Tumorzellen bzw. Tumorfaktoren sich in den hier analysierten, tumordrainierenden Lymphknoten befanden. Die Restimulierbarkeit von tumorspezifischen Gedächtnis T-Zellen in Lymphknoten von N0 Patienten (siehe 5.2) setzt eine primäre Aktivierung naiver T-Zellen im sekundären lymphatischen Organ voraus. Dieser interessante Befund unterstützt die Annahme, dass Mikrometastasierungen bzw. Tumorantigen-präsentierende Zellen vorkamen, die histologisch nicht detektierbar sind. Durch die hohe Sensitivität könnte der IFN- $\gamma$  ELISpot Test sehr frühe Ereignisse der Tumorprogression und -metastasierung erfassen.

Mit Hilfe einer breiten Untersuchung von insgesamt 69 Kopf-Hals-Tumorpatienten konnte in der vorliegenden Arbeit der Nachweis erbracht werden, dass 25% der Patienten spontane Tumorimmunität in Blut und Lymphknoten generierten. Voraussetzung für die Aktivierung des zellulären Immunsystems war die Immunogenität des Tumors. Die Expression von bekannten Tumorantigenen, wie die der MAGE- und EGFR-Familie, und MHC I Molekülen auf Tumorzellen ist in Voruntersuchungen belegt worden (Diplomarbeit Y. Ziouta). Die Tumordinfiltration von dendritischen Zellen bei Kopf-Hals-Tumorpatienten ist gezeigt worden und korrelierte mit einer besseren Prognose (Reichert *et al.*, 2001; Goldman *et al.*, 1998). Zur T-Zellaktivierung könnten apoptotische Tumorzellen (Albert *et al.*, 1998), *heat shock* Protein-Peptidkomplexe (Suto *and* Srivastava, 1995), Immunkomplexe (Regnault *et al.*, 1999) oder Exosomen (Wolfers *et al.*, 2001) Quellen von exogenem Antigen zur (Kreuz)Präsentation im sekundären lymphatischen Gewebe darstellen.

Die 25%ige Gesamtimmunreaktivität bei Kopf-Hals-Tumorpatienten war etwas niedriger als die in einem ähnlichen Versuchsaufbau detektierbare Tumorreaktivität bei 21 Myelom- (Choi *et al.*, 2005), 29 Melanom- (Muller-Berghaus *et al.*, 2006) oder 91 Mammakarzinompatienten (Feurerer *et al.*, 2001 und unveröffentlichte Daten von P. Beckhove) von 34-43%. Bei letzteren Analysen handelte es sich um Untersuchungen von peripherem Blut und Knochenmark, wodurch eine direkte Gegenüberstellung der Studien nicht möglich ist. Diese Untersuchungen unserer Gruppe ergaben, dass das Knochenmark ein spezielles Reservoir für Gedächtnis T-Zellen darstellt (Schirmacher *et al.*, 2003). Die Ursache der geringen Tumorimmunität könnte darin liegen, dass tumorspezifische Gedächtnis T-Zellen in sehr niedrigen Frequenzen im lymphatischen System der Kopf-Hals-Tumorpatienten vorkamen. Diese Zellen könnten ohne vorherige *in vitro* Expansion im ELISpot Test nicht erfasst werden (Asai *et al.*, 2000).

Ca. 75% der hier analysierten Patienten waren dem spätem Tumorstadium IV zuzuordnen. Bei den anderen Tumorentitäten waren maximal 65% der Patienten im Spätstadium. Die Mehrheit nicht tumorreaktiver Kopf-Hals-Patienten gehörte signifikant dem fortgeschrittenen Tumorstatus an. Die 5-Jahres-Überlebensrate von 208 Stadium IV Kopf-Hals-Tumorpatienten liegt bei 30%, während sie bei 155 Stadium III Erkrankten signifikant erhöht ist und 48% beträgt (Gleich *et al.*, 2003). Die hohe Stadium IV Patientenrate, die damit verbundene niedrige Tumor-Immunreaktivität und das Paradox der Tumorformation in immunologisch intakten Personen lassen sich voraussichtlich auf die allgemeine Immunsuppression bei Kopf-Hals-Tumorpatienten zurückführen (Whiteside, 2005).

Der niedrigen Tumorreaktivität liegen Flucht- und Tarnmechanismen (*tumor escape* Mechanismen) des Tumors zugrunde, deren Konsequenz Krebsprogression und -metastasierung sind. Sie wurden für verschiedene Tumorerkrankungen beschrieben (Marincola *et al.*, 2000) und spielen bei Kopf-Hals-Tumoren eine wesentliche Rolle. *Tumor*

*escape* Mechanismen senken die Tumorimmunogenität und erhöhen die Tumoraggressivität; in der Peripherie induzierte Immunreaktionen werden im Tumorgewebe inaktiviert. Für Kopf-Hals-Tumore ist bekannt, dass Defekte in der antigenprozessierenden Maschinerie, vor allem im TAP2-Molekül, vorkommen und dass dies mit einer niedrigen Überlebenszeit korreliert (Meissner *et al.*, 2005; Whiteside, 2005). Die Effektorzellen starben bei Kopf-Hals-Tumorerkrankten in der Peripherie öfter als bei gesunden Donoren (Kuss *et al.*, 2003). Erhöhtes Vorkommen von Fas Ligand-positiven Vesikeln in Blutseren von Patienten korrelierte mit erhöhter Tumorgroße und Lymphknoteninvolvierung (Kim *et al.*, 2005b). Im Tumorgewebe wurde die Apoptose von infiltrierenden Immunzellen durch die konstitutive Fas Ligand Expression der Tumormasse eingeleitet (Gastman *et al.*, 1999). Weitere Untersuchungen bei Kopf-Hals-Tumorpatienten haben ergeben, dass p53-spezifische T-Zellen in Blut- und tumorinfiltrierenden Lymphozyten niedrige intrazelluläre IFN- $\gamma$  Expression nach CD3-Stimulation demonstrierten (Albers *et al.*, 2005). Im Blut von HPV16-infizierten Oropharynxkarzinompatienten existierten zirkulierende HPV16 E7-spezifische T-Zellen, die nach spezifischer Stimulation *in vitro* zu Antitumor Effektorzellen differenzierten; die Koexistenz von spezifischen T-Zellen und wachsendem Tumor schließt eine derartige Differenzierung *in vivo* aus (Hoffmann *et al.*, 2006). In Kopf-Hals-Tumore migrierte T-Zellen zeigten fehlende oder niedrige Expression der  $\zeta$ -Kette des T-Zellrezeptor-Komplexes (Reichert *et al.*, 1998).

Für andere Tumorentitäten wurden weitere *tumor escape* Mechanismen aufgedeckt, die möglicherweise auch in Kopf-Hals-Tumoren existieren (Radoja and Frey, 2000). Melanominfiltrierende, tumorspezifische T-Zellen waren nicht terminal differenziert (Anichini *et al.*, 2003; Mortarini *et al.*, 2003) und nach tumorantigener Aktivierung funktionell tolerant (Zippelius *et al.*, 2004) im Vergleich zu tumorspezifischen Blutlymphozyten, die inflammatorische und zytotoxische Funktionen ausübten. Bei zytotoxisch inaktiven, melanominfiltrierenden CD8 T-Zellen war das Mikrotubuli-Organisationszentrum nicht an der immunologischen Synapse lokalisiert und die Exozytose der lytischen Granula konnte nicht stattfinden (Radoja *et al.*, 2001).

Bis vor kurzem wurde angenommen, dass sämtliche *tumor escape* Mechanismen auf Über- bzw. Unterexpression von Liganden, Rezeptoren und anderen Molekülen (Hahne *et al.*, 1996), sowie auf Sekretion von supprimierenden Zytokinen, wie TGF- $\beta$ 1 oder Prostaglandin E<sub>2</sub> (Linnemeyer and Pollack, 1993; Inge *et al.*, 1992), des Tumors basierten. Neueste Untersuchungen konnten weitere Mechanismen aufdecken. Nach dem *cancer immunoediting* werden Tumore von der immunologischen Umgebung geprägt (Smyth *et al.*, 2006; Shankaran *et al.*, 2001). Die Präsenz von regulatorischen T-Zellen, die in Tumorgeweben autoreaktive, tumorspezifische T-Zellen kontrollieren, scheinen die Überlebensrate beim Ovarialkarzinom negativ zu beeinflussen (Curiel *et al.*, 2004). Bei Kopf-

Hals-Tumorpatienten sind solche Zellen in Blut (Schaefer *et al.*, 2005) und Tumorgeweben (Albers *et al.*, 2005) identifiziert worden. Beim fortgeschrittenen Larynxkarzinom scheint die Existenz von Tumorreaktivität das Überleben nicht zu beeinflussen (Truelson *et al.*, 1992).

Um die Charakteristik tumorspezifischer T-Zellen bei Kopf-Hals-Tumorpatienten genauer zu untersuchen, wurde als Nächstes ihre Lokalisation analysiert.

## **5.2 Tumorreaktive Gedächtnis T-Zellen lokalisieren bei Kopf-Hals-Tumorpatienten hauptsächlich im Lymphknoten**

Wie bereits erwähnt, sind zirkulierende tumorspezifische T-Zellen bei Kopf-Hals-Tumorpatienten bekannt (Albers *et al.*, 2005). Effektive T-Zellimmunität und Tumor-Immunüberwachung benötigen die Präsenz solcher Zellen in Geweben, die von Tumorzellen infiltriert werden (Letsch *et al.*, 2003). Kopf-Hals-Tumore metastasieren bevorzugt in lokoregionäre Lymphknoten. Studien unserer Gruppe konnten belegen, dass tumorreaktive T-Zellen öfter im Knochenmark als im Blut von Mammakarzinom- oder Myelompatienten (Choi *et al.*, 2005; Schirmacher *et al.*, 2003; Feuerer *et al.*, 2001) generiert und erhalten werden. Da Knochenmarkaspiration bei Kopf-Hals-Tumorpatienten nicht durchgeführt wird, ergab sich durch die Halsoperation (*neck-dissection*) die Möglichkeit, ein anderes lymphatisches Organ tumorimmunologisch zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden Gedächtnis T-Zellen aus peripherem Blut und nicht metastasiertem, tumordrainierendem Lymphknoten im IFN- $\gamma$  ELISpot Test analysiert. Somit war ein Vergleich der verschiedenen Zellkompartimente als Orte der Induktion und Speicherung von Tumor-Immunantworten bei Kopf-Hals-Tumorpatienten möglich.

Untersuchungen von Blut- und/oder Lymphknotenzellen der 69 Kopf-Hals-Tumorpatienten lieferten erste Hinweise, dass im Lymphknoten öfter Tumorreaktivität verzeichnet wird: 20% Immunreaktivität im Lymphknoten und 13% im Blut. Die direkte Gegenüberstellung von 37 Patienten, deren Immunantworten gleichzeitig in beiden Zellkompartimenten getestet wurden, bestätigte die oben genannte Annahme. Nur 5% der untersuchten Patienten wiesen tumorspezifische Gedächtnis T-Zellen im Blut nach, während ein auffällig erhöhter Patientenanteil, nämlich 19%, Tumorimmunität im Lymphknoten zeigte. Dies ist die erste Analyse von tumorspezifischen T-Zell Immunantworten aus nicht metastasierten Lymphknoten und Gegenüberstellung dieser mit solchen aus dem Blut. Die Studie von Albers *et al.*, 2005 detektiert über Tetramerfärbung p53-spezifische T-Zellen aus nicht metastasierten Lymphknoten. Hierbei handelt es sich allerdings um eine Analyse von lediglich drei Kopf-Hals-Tumorpatienten und es wurden keine Effektorfunktionen der oben genannten Zellen untersucht. Es ist beachtlich, dass sämtliche für Lymphknotenzellen

untersuchte Patienten p53-spezifische T-Zellen besaßen, während nur bei 38% der Blutanalysen solche Zellen nachgewiesen wurden (Albers *et al.*, 2005).

Bezüglich der Frequenz von tumorreaktiven T-Zellen konnte in beiden Zellkompartimenten kein auffälliger Unterschied beobachtet werden. Tumorspezifische Gedächtnis T-Zellen kamen bei primär operierten Kopf-Hals-Tumorpatienten in ähnlicher Frequenz vor, wie im Knochenmark primär operierter Brustkrebspatientinnen (Dissertation K. Ehlert). Auch Albers *et al.*, 2005 fanden p53-spezifische T-Zellen in vergleichbarer Frequenz in Blut und Lymphknoten. Beim malignen Melanom konnte zwischen Blut- und Knochenmarkzellen Reaktivitätsunterschied zugunsten des Knochenmarks festgestellt werden, jedoch kein Frequenzunterschied (Muller-Berghaus *et al.*, 2006). Der Ort der primären bzw. sekundären T-Zellaktivierung scheint das Ausmaß der Tumor-Immunantwort nicht zu beeinflussen.

Einen interessanten Befund lieferte die Beobachtung, dass keine Immunreaktivität in beiden Zellkompartimenten der Patienten gleichzeitig gefunden wurde. Tumorreaktive Gedächtnis T-Zellen waren entweder in der Zirkulation oder im lymphatischen Organ bei Kopf-Hals-Tumorpatienten lokalisiert. Es handelt sich hierbei um einen neuartigen Befund, da Entsprechendes weder in Analysen unserer Gruppe bei anderen Tumorerkrankungen (Muller-Berghaus *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2005; Schmitz-Winnenthal *et al.*, 2005), noch in der Studie von Albers, *et al.*, 2005 beobachtet wurde. Diese Studien unterscheiden sich von der vorliegenden dadurch, dass Blut- und Knochenmarkanalysen durchgeführt wurden und dass lediglich die Präsenz p53-spezifischer T-Zellen über Tetramere nachgewiesen wurde. Möglicherweise beruht der hiesige Befund darauf, dass es sich bei den immunreaktiven Lymphozyten des Blutes um rezirkulierende Gedächtnis T-Zellen aus Tumorgewebe, Milz oder sogar Knochenmark, jedoch nicht aus tumordrainierenden Lymphknoten, handelt. Zur Klärung der hiesigen Beobachtung wurden die T-Zellpolarisierung, sowie weitere Effektorfunktionen in Blut und Lymphknoten untersucht (siehe 5.4).

Die Bedeutung des nicht metastasierten, tumordrainierenden Lymphknotens als Reservoir tumorreaktiver Gedächtnis T-Zellen könnte verschiedene Ursachen haben. Grundsätzlich spielen die auf T-Zellaktivierung spezialisierte Architektur des Lymphknotens und die auf immunzell- und nährstoffbasierte Transportfunktion des Blutes eine wesentliche Rolle. Die primäre T-Zellaktivierung ist sehr komplex. Sie involviert Interaktionen zwischen Zellen der natürlichen Immunität wie antigenpräsentierende Zellen, NK-Zellen und NK T-Zellen, und Zellen der adaptiven Immunität wie CD4 und CD8 T-Zellen (Castellino *and* Germain, 2006). Die Wahrscheinlichkeit, dass seltene Zelltypen wie T-Zellen mit antigenspezifischem Rezeptor und antigenpräsentierende dendritische Zellen sich zu kognitiven Interaktionen

treffen, ist durch die Anatomie in Lymphknoten erhöht im Vergleich zum Blut (von Andrian *and* Mackay, 2000; Gretz *et al.*, 1997; 1996).

Die höhere Reaktivierbarkeit von Gedächtnis T-Zellen des Lymphknotens im Vergleich zum Blut bei Kopf-Hals-Tumorpatienten hängt höchstwahrscheinlich mit besonderen Eigenschaften dieser Zellpopulation und der Lymphozytenquelle zusammen. Die höhere Restimulierbarkeit von lymphatischen Gedächtnis T-Zellen ist wahrscheinlich auf zentrale Gedächtnis T-Zellen zurückzuführen (Sallusto *et al.*, 1999). Die primäre T-Zellaktivierung, die in sekundären lymphatischen Organen oder im Tumorgewebe stattgefunden hatte, führte zur klonalen Expansion der Effektorzellen und schließlich zur Akkumulation und Expansion von langlebigen, zentralen Gedächtnis T-Zellen im Lymphknoten (Antia *et al.*, 2005). Im Blut sind solche Zellen nicht vorhanden.

Dies ist darauf zurückzuführen, dass Gedächtnis T-Zellen entweder in lymphatischen Organen (zentrale Gedächtnis T-Zellen; Reinhardt *et al.*, 2001) oder in peripheren, nicht lymphatischen Geweben (Effektorgedächtnis T-Zellen; Masopust *et al.*, 2001) lokalisieren (Sallusto *et al.*, 1999). In die Blutzirkulation gelangen Gedächtnis T-Zellen erst nach antigenspezifischer Aktivierung, wie zum Beispiel nach einer Infektion. In diesem Fall differenzieren zentrale Gedächtnis T-Zellen zu Effektorgedächtniszellen, verlassen den Lymphknoten und zirkulieren, um die Infektionsherde zu erreichen. In Abwesenheit von reaktivierenden Signalen sind kaum Gedächtnis T-Zellen im Blut vorzufinden und entsprechend niedrig ist die Gedächtnisreaktivität. Es ist bei Tumorerkrankungen davon auszugehen, dass der Tumor die Aktivierung des Immunsystems durch Suppressionsmechanismen verhindert. Eine Mobilisierung der Gedächtniszellen kann nicht zustandekommen.

Die fehlende Expression des Lymphknoten *homing* Rezeptors CCR7 könnte einen Einfluss auf die Sterberate von zirkulierenden tumorspezifischen Gedächtnis T-Lymphozyten haben: CCR7 exprimierende Effektorzellen werden vor Apoptose geschützt (Kim *et al.*, 2005a). Bei der Mehrheit von Kopf-Hals-Tumorpatienten führte die Abwesenheit von CCR7 Expression in zytotoxischen Blutlymphozyten zur Apoptoseinduktion. In Lymphknoten eingewanderte T-Zellen haben *per se* diesen Chemokinrezeptor auf ihrer Zelloberfläche, wodurch eine Protektion dieser Effektorfraktion denkbar wäre. Die Bildung eines Gedächtniszellpools wäre also primär im Lymphknoten und nicht im Blut zu erwarten.

Unterschiede zwischen Blut und Lymphknoten Gedächtnis T-Zellen konnten nicht nur in Bezug auf Vorkommen und Tumorreaktivität verzeichnet werden. Korrelationen mit klinischen Daten ergaben, dass Kopf-Hals-Tumorpatienten mit Tumor-Immunreaktivität der Blut T-Zellen eine unterschiedliche histopathologische Einteilung hatten als entsprechende Patienten mit Immunantworten der Lymphknoten T-Zellen. Bezüglich der Stadieneinteilung

scheint die Tumor-Immunreaktivität des Blutes sich erst im Spätstadium IV zu manifestieren (ca. 80%). Patienten mit tumorreaktiven Gedächtnis T-Zellen des Lymphknotens waren dagegen in frühen und späten Stadien gleich oft vertreten. Hinzu kommt die Beobachtung, dass ca. 90% der Patienten mit tumorspezifischen Gedächtnis T-Zellen im Blut metastasierende Krankheit demonstrierten (N1-N3). Tumor-Immunreaktivität der Lymphknoten T-Zellen kam in N0 und N1-N3 Kopf-Hals-Tumoren gleich häufig vor. Bei einer großen Reihe von Kopf-Hals-Tumorpatienten konnte festgestellt werden, dass eine Involvierung der Lymphknoten mit einer schlechteren Prognose korreliert: bei 2257 N0 Patienten war die 5-Jahres-Überlebensrate bei 68%, während sie bei 1057 N1-N3 Patienten mit 40% signifikant niedriger lag (Layland *et al.*, 2005).

Einige der oben genannten Befunde stimmen mit Studien überein, in denen Korrelationen zwischen metastatischer Ausbreitung von Melanom- bzw. Kolonkarzinomzellen in Lymphknoten und Präsenz von zirkulierenden tumorspezifischen T-Zellen gefunden wurden (Mortarini *et al.*, 2003; Nagorsen *et al.*, 2000). Die Ursache liegt möglicherweise darin, dass erst ab einem bestimmten Invasionspotential Tumorzellen in Lymphknoten erscheinen, was zur Generierung von apoptotischem Tumorzellmaterial führt, das von dendritischen Zellen aufgenommen werden kann. Der Tumorantigenpräsentation auf MHC I und II Molekülen in drainierenden Lymphknoten folgt die Aktivierung naiver, tumorspezifischer T-Zellen.

Die Beobachtung, dass sich Tumorreaktivität in blutzirkulierenden T-Zellen weniger oft manifestiert als in entsprechenden Zellen im lymphatischen Organ, warf neue Fragen auf. Diese konzentrierten sich auf die Art der IFN- $\gamma$  ELISpot Immunantworten und die Polarisation der tumorspezifischen T-Zellen.

### **5.3 Kopf-Hals-Tumorpatienten besitzen CD8 T-Zellen mit hoher Tumorreaktivität und hohe Frequenz von tumorspezifischen CD4 T-Zellen**

Aufgrund der oben genannten Beobachtungen wurde die IFN- $\gamma$  ELISpot Tumorreaktivität der verschiedenen T-Zellpopulationen bei Kopf-Hals-Tumorpatienten genauer analysiert. Voraussetzung für diese Analysen war die Isolation der CD4 und CD8 Subpopulationen aus dem Gesamt T-Zellpool. Nach der positiven MACS<sup>®</sup>-Anreicherung offenbarte die quantitative Erfassung der CD4 und CD8 Lymphozyten aus 19 Kopf-Hals-Tumorpatienten eine wesentliche prozentuale Abnahme der Zellzahlen des peripheren Blutes im Vergleich zu Angaben aus FACS-Untersuchungen an 22 Spendern von Battaglia *et al.*, 2003. In Lymphknoten von Patienten und gesunden Donoren fiel dieser Unterschied kleiner aus. Der

CD4/CD8 Quotient war für beide Zellkompartimente in Patienten ca. 1,5 Mal größer als in Donoren; dies war größtenteils auf eine Anreicherung der CD4 Zellpopulation zurückzuführen. Das CD4/CD8 Verhältnis war im Lymphknoten größer als im Blut. Bei Patienten mit metastatischem Melanom, die Chemo-Immuntherapie bekamen, korrelierte ein steigender CD4/CD8 Quotient positiv mit der Patientenprognose (Hernberg *et al.*, 1996). Die Daten der hier analysierten 19 Kopf-Hals-Tumorpatienten stimmen mit FACS-Analysen von Blutproben aus 146 Kopf-Hals-Tumorpatienten und 54 gesunden Spendern tendenziell überein (Kuss *et al.*, 2004). Letztgenannte Studie zeigte, dass die Lymphopenie bei Kopf-Hals-Tumorpatienten Monate oder Jahre nach kurativen Therapien andauern kann.

Die Tumormunität von CD4 und CD8 T-Zellen wurde getrennt in Blut und Lymphknoten bei 19 Kopf-Hals-Tumorpatienten analysiert. Die kleinere Anzahl untersuchter Patienten war durch die Verdoppelung an nötigem Zell- und Lysatmaterial zur Versuchsdurchführung bedingt. Es konnte ein Übergewicht an CD8 Gedächtnis T-Zellantworten im IFN- $\gamma$  ELISpot Test festgestellt werden. CD8 T-Zellen waren bei 28% der Patienten tumorreaktiv, während CD4 T-Zellen zu 16% Tumormunität demonstrierten. Da die CD8 T-Zellreaktivität im Bereich der Gesamtimmunreaktivität von 25% in IFN- $\gamma$  ELISpot Analysen mit nicht separierten T-Zellen liegt, lässt sich hier keine Beeinträchtigung der *ex vivo* Restimulierbarkeit von CD8 Gedächtnis T-Zellen in Abwesenheit von Helfer T-Zellen feststellen. Eine verminderte Immunreaktivität von CD8 T-Zellen wäre aufgrund der niedrig affinen T-Zellrezeptorinteraktionen mit Selbstantigenen denkbar (Castellino *and* Germain, 2006). Diese Beobachtung ist insofern überraschend, als in Mausmodellen gezeigt wurde, dass die Expansion und Effektorfunktionen von sekundären Immunantworten bei CD8 T-Lymphozyten abhängig von der Anwesenheit von Helfer T-Zellen während der Aktivierungsphase waren (Janssen *et al.*, 2003). Eine andere Studie zeigte in tumortragenden Mäusen, dass nach adoptivem Transfer von spezifischen CD4 und CD8 T-Zellen oder spezifischen CD8 T-Zellen allein, CD4 T-Zellen die Aufrechterhaltung und zytolytischen Fähigkeiten des CD8 T-Zellpools unterstützen (Marzo *et al.*, 2000). Auf den *in vivo* Mechanismus der CD4 vermittelten Hilfe wurde hier nicht näher eingegangen.

Die Wichtigkeit von tumorspezifischen CD4 T-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit aus verschiedenen Gründen jedoch nicht in Frage gestellt. Die hiesigen Analysen zeigten, dass CD4 T-Zellen nach Stimulation mit Tumorantigenen IFN- $\gamma$  freisetzen können. IFN- $\gamma$  aus CD4 T-Zellen konnte Maustumore indirekt über Antiangiogenese (Beatty *and* Paterson, 2001) oder über Makrophagenaktivierung und Sauerstoffradikalfreisetzung (Mumberg *et al.*, 1999) zum Absterben bringen. IFN- $\gamma$  vermittelte Tumorabstoßung kann über direkte Mechanismen erfolgen, wie über die kaspaseabhängige Apoptose und die Wachstumshemmung von Ovarialtumorzellen (Barton *et al.*, 2005). Kürzlich wurde in einem Mausmodell nach

Immuntherapie in An- oder Abwesenheit von Helfer T-Zellen gezeigt, dass CD4 T-Zellen langzeitige Tumormunität fördern können (Lin *et al.*, 2006).

Bei den hier analysierten Kopf-Hals-Tumorpatienten war die Frequenz IFN- $\gamma$  produzierender, tumorspezifischer Gedächtnis T-Zellen in der CD4 Subpopulation im Vergleich zu CD8 T-Zellen signifikant größer. In diesem Zusammenhang kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass gerade deswegen die Frequenz tumorspezifischer CD8 T-Zellen gering ist, weil während der *ex vivo* Reaktivierungsphase CD4 T-Zellen nicht anwesend waren. Kürzlich zeigte eine Studie erstmalig, dass IL-2 notwendig für die IFN- $\gamma$  Sekretion von Gedächtnis CD8 T-Zellen ist (Blachere *et al.*, 2006). CD4 T-Zellen sind die Hauptproduzenten von IL-2. Im Blut von Kopf-Hals-Tumorpatienten ist vermehrte Apoptose von CD8 T-Zellen beobachtet worden (Kuss *et al.*, 2003; Tsukishiro *et al.*, 2003). Dabei wurde gezeigt, dass CD4 T-Zellen gegenüber Apoptoseinduktion weniger sensitiv als CD8 T-Zellen sind (Hoffmann *et al.*, 2002; Whiteside, 2002). Apoptose von zirkulierenden CD8 T-Zellen war auch bei Patienten vorhanden, die zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Tumormanifestation aufwiesen. Tumorantigenvermittelte Expansion und aktivierungsinduzierter Zelltod (Van Parijs *and* Abbas, 1998) könnten nicht alleinig die vermehrte Apoptose erklären. Die CD4 Gedächtnissubpopulation war bei 39 Kopf-Hals-Tumorpatienten im Vergleich zu gesunden Donoren signifikant erhöht (Kuss *et al.*, 2005).

Eine Verminderung des Repertoires der CD8 Gedächtnis T-Zellen im Vergleich zu den CD4 T-Zellen konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. IFN- $\gamma$  ELISpot Analysen nach Stimulation mit dendritischen Zellen, die tumorspezifische CD8 T-Zellepitope präsentierten, belegten, dass CD8 T-Zellen mindestens fünf verschiedene tumorassoziierte Antigene erkennen. Dieser Befund ist in Einklang mit ähnlichen Analysen unserer Gruppe, die ein polyvalentes CD8 T-Zellrepertoire in Knochenmarkzellen bei Mammakarzinompatientinnen offenbarten (Sommerfeldt *et al.*, 2006).

Nun war auch die Frage interessant, ob es eventuell Unterschiede bezüglich CD4 und CD8 Tumorreaktivität zwischen Blut- und Lymphknotenzellen gibt. Tatsächlich konnten Unterschiede zwischen beiden Zellkompartimenten beobachtet werden. Während CD4 Anti-Tumorreaktivität in Blut (13%) und Lymphknoten (12%) ähnlich vertreten waren, war die CD8 Anti-Tumorreaktivität der Blut T-Zellen prominenter als der Zellen aus Lymphknoten. 25% der untersuchten Patienten zeigten signifikante IFN- $\gamma$  Produktion dieser Lymphozyten nach T-Zellstimulation mit Tumorlysat. Im lymphatischen Organ waren es lediglich 12% der Patienten. Korrelationen mit Lymphknotenmetastasierungen konnten aufgrund der niedrigen Patientenzahl (19) nicht evaluiert werden. Zu diesem Zeitpunkt lässt sich das erhöhte

Vorkommen von CD8 Anti-Tumorreaktivität hauptsächlich im Blut von Kopf-Hals-Tumorpatienten nur schwer interpretieren. Es ist möglich, dass die Abtrennung der CD4 T-Zellen eine Entfernung von Th2 polarisierten Lymphozyten bewirkt hat. Dadurch wäre eine Freigabe der zytotoxischen Tumorreaktivität möglich, die im Blut stärker als im Lymphknoten auszufallen scheint. Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, dass nach Separation erstmalig Tumor-Immunantworten in Blut und Lymphknoten gleichzeitig auftraten.

Die genannten Beobachtungen könnten eine Suppression der Th1 polarisierten Immunität und eine verstärkte Th2 Polarisierung der Tumorreaktivität bei Kopf-Hals-Tumorpatienten nahe legen. Beiden Aspekten konnte in der vorliegenden Arbeit nachgegangen werden.

#### **5.4 Tumorspezifische Blut T-Zellen sind bei Kopf-Hals-Tumorpatienten hauptsächlich Th2 polarisiert**

Effektive Tumormunität basiert vor allem auf Th1 polarisierten Immunantworten (Shurin *et al.*, 1999; Mosmann *and* Sad, 1996). Dieses wurde in mehreren Studien gezeigt. Tumortherapiemodelle, die Th1 Immunität induzierten, führten zur Tumorabstoßung, während die Induktion von Th2 Immunantworten mit Tumorprogression assoziiert war (Ostrand-Rosenberg, 2005; Qin *et al.*, 1998). Dazu gehört auch das Modell von Stat6 *knock-out* Mäusen, die einen genetischen Defekt in der Th2 Polarisierung haben und dadurch erhöhte Tumormunität und Tumoresistenz aufweisen (Ostrand-Rosenberg *et al.*, 2000; Terabe *et al.*, 2000). Im humanen System konnte die Tumorprogression von Nierenkarzinom und Melanom mit Th2 Immunantworten korreliert werden (Tatsumi *et al.*, 2002). Wie das Th1/Th2 Verhältnis tumorspezifischer T-Zellen bei Kopf-Hals-Tumorpatienten ist, ist weitgehend unklar. Für intraorales Plattenepithelkarzinom ist bekannt, dass Blut T-Zellen nach unspezifischer Stimulation mit Phorbol 12-Myristat 13 Azetat (PMA) und Ionomycin öfter IL-4 und IL-10 Zytokingene exprimierten; gleichzeitig waren die IFN- $\gamma$  und IL-2 Gene supprimiert (Agarwal *et al.*, 2003). Letztgenannte Befunde waren bei Patienten mit schlecht differenzierten Tumoren und Lymphknotenmetastasierung nachzuweisen. Diese Analysen sind zwar aufschlussreich, sie adressieren jedoch nicht Fragen nach der Proteintranslation und -freisetzung, sowie nach der Frequenz von Th1 und Th2 polarisierten tumorspezifischen T-Zellen. Um diesen Sachverhalt nachzugehen, wurden in dieser Arbeit die Th1 und Th2 Immunantworten bei 12 Kopf-Hals-Tumorpatienten analysiert.

Erste Hinweise auf Th2 Polarisierung lieferten die IFN- $\gamma$  ELISpot Tests der 69 untersuchten Kopf-Hals-Tumorpatienten. Denn bei 23% der Erkrankten konnte eine Suppression der IFN- $\gamma$  Immunantwort beobachtet werden: die IFN- $\gamma$  Sekretion der Gedächtnis T-Zellen nach

Stimulation mit Tumorantigenen war signifikant niedriger als die der entsprechenden Negativkontrolle. Sämtliche IFN- $\gamma$  suppressierte Patienten waren dem Spätstadium IV zuzuordnen (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise war die IFN- $\gamma$  Suppression im Blut signifikant stärker als im Lymphknoten vertreten. Dieser Befund könnte einen möglichen Hinweis auf den Mechanismus hinter der niedrigen Tumorreaktivität in Blutlymphozyten bei Kopf-Hals-Tumorpatienten darstellen.

Die Th2 Polarisierung bei Kopf-Hals-Tumorpatienten wurde anhand von IL-4 und IL-10 ELISpot Analysen untersucht. Gleichzeitig erfolgte die Erfassung der Th1 Polarisierung mit Hilfe von IFN- $\gamma$ , wie auch Perforin ELISpot Tests.

Über den Nachweis von IL-10 sekretierenden Lymphozyten können in diesem Versuchsaufbau neben Th2 polarisierten Helfer T-Zellen, auch Th3 polarisierte, suppressorische T-Zellen (Tr1) und regulatorische T-Zellen (Treg) detektiert werden. Dass regulatorische T-Zellen tumorassoziierte Antigene erkennen können, ist im Falle von LAGE-1 gezeigt worden (Wang *et al.*, 2004).

Mittels dieser multiparametrischen ELISpot Analysen konnten Tumor-Immunantworten bei ca. 70% der untersuchten Kopf-Hals-Tumorpatienten aufgedeckt werden. Ähnliche Analysen unserer Gruppe zur Th1 und Th2 Polarisierung tumorspezifischer Gedächtnis T-Zellen ergaben eine ca. 75% Gesamtimmunreaktivität in Blut und Knochenmark beim Mammakarzinom (Dissertation C. Choi). Die hiesigen Untersuchungen stellen somit ein System der „dritten Generation von T-Zellanalysen“ (Keilholz *et al.*, 2006). In solchen werden die Eigenschaften von antigenspezifischen T-Zellen in einem zwei Stufen Schritt determiniert: zunächst erfolgt die Detektion spezifischer T-Zellen und dann ihre quantitative Charakterisierung gemäß ihrer Effektorfunktionen.

In den hiesigen Analysen von zwölf Patienten konnte noch einmal eine Th1 Gesamtimmunreaktivität von 25% verzeichnet werden. Bemerkenswert war hierbei jedoch die Th2 Gesamtimmunreaktivität. Diese war bei 50% der Patienten nachweisbar. Die Mehrheit der untersuchten Kopf-Hals-Tumorpatienten setzte entweder Typ 1 oder Typ 2 Zytokine frei. Dieser Befund lässt auf eine Polarisierung der Tumor-Immunantworten schließen.

Diese Beobachtungen stimmen mit ähnlichen Analysen anderer Forschungsgruppen weitgehend überein. Für undifferenziertes Nasopharynxkarzinom wurde erhöhte IL-10 Produktion von Blut T-Zellen nach unspezifischer Stimulation mit PMA und Ionomyzin gezeigt (Zanussi *et al.*, 2003). Eine ähnliche Stimulation deckte hauptsächlich IL-4 Freisetzung der zirkulierenden T-Zellen beim Nierenzellkarzinom auf (Onishi *et al.*, 2001). Prädominanz von IL-10 gegenüber IFN- $\gamma$  konnte auch beim Kolonkarzinom nach Aktivierung mit Tumorantigenen beobachtet werden (Bueter *et al.*, 2006).

Bezüglich der Effektormoleküle Th2 polarisierter CD4 T-Zellen bei Kopf-Hals-Tumoren, konnten in dieser Arbeit im Falle von IL-4 deutliche Unterschiede beobachtet werden. Die IL-4 Polarisierung fiel bei zirkulierenden Gedächtnis T-Zellen sehr deutlich (38% der Patienten) aus. Hingegen existierten IL-4 produzierende tumorspezifische Lymphknoten T-Zellen bei 22% der Patienten. Interessanterweise demonstrierte die IL-10 Freisetzung in beiden Zellkompartimenten gleiche Patientenanteile (jeweils 20%). Dabei war die Frequenz IL-10 produzierender T-Zellen deutlich größer als jene IL-4 sekretierender Lymphozyten.

Diese Beobachtungen legen nahe, dass in Blut und nicht metastasiertem Lymphknoten möglicherweise gleich viele IL-10 produzierende Suppressor T-Zellen (natürliche Treg oder induzierte Tr1) existieren. Dies wäre dann anders als bei Ovarialtumoren. Für diese Tumorerkrankung wurde gezeigt, dass regulatorische T-Zellen in Tumor- und Metastasengewebe, sowie Blut und Aszitesflüssigkeit im Vergleich zu Kontrollgeweben vermehrt vorkommen (Curiel *et al.*, 2004). Treg waren in tumordrainierenden Lymphknoten im Vergleich zu Kontrolllymphknoten signifikant erniedrigt. Die Forscher schlussfolgerten, dass anders als bei homeostatischen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen, die präferentiell in lymphatisches Gewebe migrieren, regulatorische CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen bei Krebserkrankten an die Tumormasse und nicht an tumordrainierende Lymphknoten wandern.

Im Hinblick auf die Studie von Albers *et al.*, 2005, die regulatorische T-Zellen ähnlicher Frequenz in Blut und nicht metastasierten Lymphknoten bei Kopf-Hals-Tumorpatienten detektierten, sollten die Ovarialkarzinomanalysen nur bedingt für ersteren Tumor relevant sein. Es muss hier noch einmal darauf hingewiesen werden, dass in der oben genannten Studie lediglich drei Kopf-Hals-Tumorpatienten analysiert wurden. Andere Untersuchungen ergaben, dass Kopf-Hals-Tumorpatienten weniger regulatorische T-Zellen besitzen, die die Lymphknoten *homing* Rezeptoren CCR7 und CD62L exprimieren (Schaefer *et al.*, 2005).

Vorkommen und Effektoreigenschaften regulatorischer T-Zellen bei Kopf-Hals-Tumoren konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden. Eine Anreicherung regulatorischer T-Zellen vor dem Zytokinnachweis bzw. eine FACS-Analyse der Gesamt CD4 Population zirkulierender und lymphatischer T-Zellen könnten hier einen wesentlichen Beitrag leisten.

Ebenso deutliche Unterschiede in der Zytokinpolarisierung zirkulierender und lymphatischer Gedächtnis T-Zellen konnten im Falle der Typ 1 Zytokinausschüttung der CD8 Gedächtnis T-Zellen verzeichnet werden. Lymphknoten Gedächtnis T-Zellen produzierten deutlich mehr Perforin als Blutlymphozyten (25% gegenüber 14%). Gleichzeitig waren die zirkulierenden T-Zellen diejenigen, die IFN- $\gamma$  nach tumorantigener Stimulation freisetzen konnten (18% gegenüber 11%). Letzterer Befund konnte schon einmal bei 19 Patienten beobachtet werden (siehe 5.3). In dieser Arbeit konnte über einen vierstündigen <sup>51</sup>Chrom-Freisetzungstest der

Nachweis erbracht werden, dass spontan generierte und *in vitro* 72 Stunden lang stimulierte zytotoxische T-Lymphozyten bei Kopf-Hals-Tumorpatienten Tumorzellen direkt erkennen und zu ca. 25% lysieren können. Lytische Aktivität von Immunzellen bei dieser Tumorerkrankung sind bereits bekannt (Yasumura *et al.*, 1993). In letztgenannter Studie wurden zytotoxische T-Zelllinien getestet, die in der Regel mehrere Wochen lang stimuliert wurden.

Die hiesigen Beobachtungen lassen schließen, dass Blut T-Zellen eher indirekt über Zytokine tumorgerichtet reagieren, während lymphatische T-Zellen öfter direkte Tumorzytotoxizität ausüben. In der oben vorgestellten Studie von Zanussi *et al.*, 2003, konnten CD8 T-Zellen bei Patienten mit undifferenziertem Nasopharynxkarzinom weder IFN- $\gamma$  noch Perforin freisetzen. Die Forscher gingen von *tumor escape* Mechanismen aus. Diese Analysen unterscheiden sich jedoch von den hiesigen multiparametrischen ELISpot Tests. Die CD8 T-Zellen wurden unspezifisch stimuliert und der Zytokinnachweis erfolgte mit Hilfe intrazellulärer FACS-Färbungen. An dieser Stelle wird das Potential der hier etablierten Methode noch einmal sichtbar.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit ein Ungleichgewicht von Th1 und Th2 Immunantworten beobachtet werden, das im Blut stärker als im tumordrainierenden, nicht metastasierten Lymphknoten ausgeprägt war. Während Th2 Immunität in beiden Zellkompartimenten gleich vertreten war, konnten ca. doppelt so hohe Th1 polarisierte Immunantworten im Lymphknoten im Vergleich zum Blut registriert werden. Leider konnten bei dieser kleinen Kohorte von zwölf Patienten die klinischen Daten keinen Aufschluss über Metastasierung und Tumorstadium geben. Somit bleibt die Ursache für die geringe Mobilisierung Th1 polarisierter, tumorreaktiver Blut T-Zellen unklar. Der Ort der primären T-Zellaktivierung scheint maßgebend zu sein.

Die fein orchestrierten Prozesse, die zu einer protektiven Immunantwort führen können, lassen sich größtenteils von Zytokinen in der Mikroumgebung, worin Immunität stattfindet, beeinflussen (Mocellin *et al.*, 2001). Davon ausgegangen, dass zirkulierende tumorspezifische Gedächtnis T-Zellen im Tumorgewebe primär aktiviert wurden, würde das immunsupprimierende Tumorzytokinmilieu diesen Vorgang entscheidend beeinflussen. Diese Annahme wird von einer Studie beim Zervixkarzinom unterstützt, die erstmalig zeigte, dass tumorinfiltrierende Lymphozyten hauptsächlich Th2 Phänotyp aufweisen (Sheu *et al.*, 2001). Diese Polarisierung kam durch die IL-10 und TGF- $\beta$  Sekretion der Tumorzellen zustande. Anders als im Blut ist anzunehmen, dass die Zytokinumgebung des nicht metastasierten Lymphknotens möglicherweise weniger mit immunmodulatorischen Molekülen belastet ist. Dort aktivierte naive T-Zellen könnten somit sowohl Th1 als Th2 polarisierende Signale erfahren. Für das nichtkleinzellige Lungenkarzinom ist kürzlich

gezeigt worden, dass TGF- $\beta$ 1 mRNA 30 Mal höher in Tumoren als in drainierenden Lymphknoten exprimiert war (Ito *et al.*, 2006).

Infolge dieser möglichen Zusammenhänge wurde als Nächstes das systemische und tumorlokale Zytokinmilieu bei Kopf-Hals-Tumorpatienten genauer untersucht.

### **5.5 TGF- $\beta$ 1 ist im Tumorgewebe von nicht IFN- $\gamma$ tumorreaktiven Kopf-Hals-Tumorpatienten erhöht**

Die Analyse von tumorassoziierten Faktoren erfolgte über den Konzentrationsnachweis von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen in Blutplasma und Primärtumor von Kopf-Hals-Tumorpatienten anhand von ELISA Tests. Die Untersuchung des systemischen und lokalen Zytokinmilieus einer Kohorte von 65 Patienten umfasste bekannte Immunmediatoren, wie TGF- $\beta$ 1, IL-17, IL-12, IL-10 und IFN- $\alpha$ . Es wurde in dieser Arbeit hauptsächlich auf das lokale Zytokinprofil des Primärtumors fokussiert. Kontrolllysate stammten aus gesundem Gewebe des Kopf-Hals-Bereiches.

Die meisten der hier analysierten Zytokine sind bei Kopf-Hals-Tumoren nachgewiesen worden (Pries *and* Wollenberg, 2006). Bei diesen Studien handelte es sich um Zytokinfreisetzung kultivierter Primär- oder etablierter Tumorzelllinien in Kulturüberständen (Kacani *et al.*, 2003; Mann *et al.*, 1992) oder um immunhistochemische Analysen (Karcher *et al.*, 1999), die teilweise mit polyklonalen Antikörpern durchgeführt wurden (Paleri *et al.*, 2001). In den hiesigen Untersuchungen wurden die Zytokinkonzentrationen mit Hilfe von hochsensitiven ELISA Tests bestimmt, die teilweise biologisch aktive Proteine detektieren konnten (zum Beispiel TGF- $\beta$ 1 oder IL-12). Es wurden homogene Lysate analysiert, die aus Tumor- und Stromagewebe gewonnen wurden und somit die Tumorumgebung mit erfassten. Um die Rolle der Zytokine im Krankheitsverlauf und in der Antitumor-Immunantwort erörtern zu können, wurden die Zytokinkonzentrationen mit klinischen Daten und Tumorreaktivität im IFN- $\gamma$  ELISpot entsprechender Patienten miteinander verglichen. Dabei wurde die Gesamtumorreaktivität berücksichtigt. Es konnte zwischen peripher und lymphatisch tumorspezifischen Immunantworten, aufgrund von niedrigen Patientenzahlen in den entsprechenden Gruppen, nicht unterschieden werden.

#### TGF- $\beta$ 1

Bezüglich des immunsupprimierenden Zytokins TGF- $\beta$ 1 in der Tumormikroumgebung bei Kopf-Hals-Tumorpatienten wurden sehr interessante Befunde erhalten. Biologisch aktives TGF- $\beta$ 1 war in Plasma und Tumorgewebe von Kopf-Hals-Tumorpatienten im Vergleich zu gesunden Donoren signifikant erhöht. Höhere TGF- $\beta$ 1 Werte waren bei Patienten in den Stadien I-III zu beachten. Patienten mit 3-Jahres-Rezidivbildung zeigten signifikant erhöhte

TGF- $\beta$ 1 Konzentrationen im Tumorgewebe im Vergleich zu Patienten ohne Rezidivmanifestation. Bezüglich der Th1 Immunreaktivität konnte beobachtet werden, dass bei Tumorerkrankten ohne IFN- $\gamma$  produzierende, tumorspezifische Gedächtnis T-Zellen signifikant erhöhte TGF- $\beta$ 1 Konzentrationen im Tumorlysat vorkamen. Die Analyse primärer Kopf-Hals-Tumorzelllinien bestätigte letzteren Befund: die TGF- $\beta$ 1 Freisetzung in Kulturüberständen korrelierte mit der IFN- $\gamma$  Tumorreaktivität bei korrespondierenden Patienten. Die Hauptproduktionsstätte von TGF- $\beta$ 1 scheinen die Tumorzellen zu sein. Somit ist es denkbar, dass der vom Tumor sezernierte, immunsuppressive Mediator TGF- $\beta$ 1 bis zum Zeitpunkt der Entfernung der Tumormasse die Generierung tumorspezifischer Gedächtniszellen verhinderte. Weiterhin konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass Tumorkonzentrationen von TGF- $\beta$ 1 und IFN- $\alpha$  negativ korrelieren.

Sämtliche TGF- $\beta$ 1 Beobachtungen und Korrelationen dieser Arbeit stehen im Einklang zu Befunden anderer Forschungsgruppen. Hohe Serumkonzentrationen von TGF- $\beta$ 1, die mit Tumorprogression korrelierten, wurden bei Patienten mit Kolonkarzinom gefunden (Shim *et al.*, 1999). Beim fortgeschrittenen Magenkarzinom waren hohe TGF- $\beta$ 1 mRNA Werte mit verringertem Überleben der Tumorpatienten assoziiert (Nakamura *et al.*, 1998). *In vitro* war TGF- $\beta$ 1 Freisetzung bei der Mehrheit getesteter Tumorzelllinien detektierbar (Mocellin *et al.*, 2001) und konnte mit metastatischem Potential korreliert werden (Janji *et al.*, 1999; Blanckaert *et al.*, 1993). Erhöhte Invasion und Metastasierung von Tumorzellen kann durch TGF- $\beta$ 1 polarisierte Tumorumgebung begünstigt sein. Sie kommt durch Stimulation von Angiogenese und Zellmotilität (Hojo *et al.*, 1999; Burrows *et al.*, 1995), Suppression des Immunsystems (Gorelik and Flavell, 2002) und erhöhte Interaktion von Tumorzellen mit der extrazellulären Matrix (Blobe *et al.*, 2000; Massague, 1990) zustande.

Neueste Untersuchungen könnten den Befund erklären, dass bei Kopf-Hals-Tumorpatienten mit hohem TGF- $\beta$ 1 Tumormilieu die Rezidivrate erhöht und die IFN- $\gamma$  Tumorreaktivität erniedrigt war. Analysen von tumordrainierenden, nicht metastasierten Lymphknoten und deren TGF- $\beta$ 1 Profil zeigten beim nichtkleinzelligen Lungenkarzinom, dass TGF- $\beta$ 1 über die Apoptose von dendritischen Zellen Immunsuppression in Lymphknoten induziert. Die Immunsuppression begünstigt die Metastasierung von Tumorzellen (Ito *et al.*, 2006). Studien an einem murinen Mammakarzinommodell ergaben, dass eine TGF- $\beta$ 1 Behandlung die antigenpräsentierende, stimulatorische und migratorische Eigenschaft der dendritischen Zellen *in vivo* inhibierte (Kobie *et al.*, 2003).

Die TGF- $\beta$ 1 vermittelte Immunsuppression kann auch über die Blockade von IFN- $\gamma$  und dessen positiven Regulator T-bet (über die SMAD Mediatoren) erfolgen (Yu *et al.*, 2006). TGF- $\beta$ 1 kann die T-Zellproliferation über einen Arrest in der G1 Phase (Ravitz and Wenner, 1997) und Supprimierung der IL-2 Transkription blockieren (Kehrl *et al.*, 1986). TGF- $\beta$ 1 konnte als starker Kostimulator eine Umkehrung der Polarität in Richtung Th2 in aktivierten

Ratten T-Zellen bewirken (Schiott *et al.*, 1999). Naive Vorläufer entwickelten sich unter dem Einfluss von TGF- $\beta$ 1 zu Foxp3 positiven, regulatorischen T-Zellen, die suppressive Funktionen ausübten (Fantini *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2003). Nach den Analysen von Albers, *et al.*, 2005 an Kopf-Hals-Tumoren ist davon auszugehen, dass solche T-Zellen auch in der vorliegenden Arbeit verstärkt vorkommen.

Arbeiten unserer Gruppe zeigten beim Mammakarzinom die Existenz zweier Hauptgruppen von Patienten mit unterschiedlichen, pathobiologischen Charakteristika (Domschke *et al.*, *submitted*). Diese konnten über inverses TGF- $\beta$ 1 und IFN- $\alpha$  Tumorsekretionsprofil identifiziert werden. *In vitro* wurde gezeigt, dass TGF- $\beta$ 1 und IFN- $\alpha$  die Restimulierbarkeit von Th1 polarisierten Gedächtnis T-Zellen beeinflussten (Domschke *et al.*, *submitted*). In einem Inflammationsmodell konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  die Expression von MHC Klasse II und kostimulatorischen Molekülen bei plasmazytoiden dendritischen Zellen beeinflussen kann (Vasilijic *et al.*, 2005). Letztgenannte Moleküle, sowie die Produktion von IL-12 und TNF- $\alpha$  werden auch bei myeloiden dendritischen Zellen in Anwesenheit von TGF- $\beta$ 1 herunterreguliert (Li *et al.*, 2006).

In den hiesigen Zytokinanalysen scheint das immunsupprimierende TGF- $\beta$ 1 den prominentesten Einfluss auf Kopf-Hals-Tumorprogression und Anti-Tumorimmunität zu besitzen. Die Daten unterstützen die These, dass TGF- $\beta$ 1 einer der bedeutsamsten Faktoren in der Tumormikroumgebung sein könnte (Mocellin *et al.*, 2001). Es muss natürlich berücksichtigt werden, dass mehr als 150 verschiedene Zytokine bekannt sind (Thomson, 1998) und dass in dieser Studie lediglich fünf untersucht wurden. Neueste Versuchsanordnungen, zum Beispiel mittels Zytokinarray, könnten bei geringem Ausgangsmaterial mehr und genauere Daten liefern. Auf jeden Fall weisen die Untersuchungen dieser Arbeit darauf hin, dass sowohl Prognose als auch Tumorimmunität bei niedrigem TGF- $\beta$ 1-Vorkommen in der Tumormikroumgebung begünstigt werden.

### IL-17

Die Analyse von IL-17 in Kopf-Hals-Tumorgewebe wurde erst gegen Ende dieser Versuchsreihen einbezogen, deswegen konnten nur 30 Patienten untersucht werden. Ausgangspunkt für diese Analysen war, dass kürzlich eine neue, IL-17 produzierende CD4 T-Zellsubpopulation (Th17) entdeckt wurde (Harrington *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005). Dieser Zelltyp scheint bei Krankheiten, die mit chronischer Inflammation assoziiert sind, wie zum Beispiel rheumatoide Arthritis und multiple Sklerose, eine wesentliche Rolle zu spielen (Iwakura and Ishigame, 2006). Th17-Zellen sollen auch bei der Protektion gegen extrazelluläre Bakterien, wie *Klebsiella pneumoniae* und *Bordetella pertussis*, involviert sein (Fedele *et al.*, 2005; Happel *et al.*, 2005).

Die hiesigen Untersuchungen zeigten eine signifikante Reduktion von freigesetztem IL-17 bei Tumoren von Kopf-Hals-Tumorpatienten im Vergleich zu Gewebe gesunder Spender.

Patienten mit IFN- $\gamma$  produzierenden, tumorspezifischen Gedächtnis T-Zellen exhibierten erhöhte IL-17 Konzentrationen im Tumorgewebe.

Nur wenige Studien untersuchten bisher die Beteiligung von Th17-Zellen bei humanen Tumorerkrankungen. Beim kutanen T-Zellymphom wurde erstmalig die IL-17 Produktion von Tumorzellen demonstriert (Ciree *et al.*, 2004). Langowski *et al.*, 2006 konnten bei 39 Patienten mit Adenokarzinom des Kolons signifikant erhöhte IL-17 mRNA Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum benachbarten, normalen Gewebe detektieren. In murinen SCID-Tumormodellen des nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms korrelierte die hohe IL-17 Expression infiltrierender Zellen mit erhöhter Angiogenese und Tumorwachstum (Numasaki *et al.*, 2005). Im Hinblick auf die hiesigen Daten kann die Rolle von IL-17 bei Tumorerkrankungen nicht abschließend geklärt werden.

Dessen ungeachtet sprechen für die Befunde dieser Arbeit Untersuchungen zur Th17 Differenzierung. Drei unabhängige Studien konnten belegen, dass Th17-Zellen im Kontext von TGF- $\beta$ 1 und IL-6 entstehen (Bettelli *et al.*, 2006; Mangan *et al.*, 2006; Veldhoen *et al.*, 2006). TGF- $\beta$ 1 ist bei den hier untersuchten Kopf-Hals-Tumorgeweben signifikant erhöht (siehe oben), über das inflammatorische, akute Phase Protein IL-6 liegt hier jedoch kein Konzentrationsnachweis vor. Es ist bekannt, dass Kopf-Hals-Tumorlinien IL-6 produzieren (Pries *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 1999), dass murine Kopf-Hals-Tumorgewebe dieses Zytokin exprimieren (Smith *et al.*, 1998) und dass Kopf-Hals-Tumorpatienten erhöhte Serum IL-6 Konzentrationen aufweisen (Sparano *et al.*, 2004). Informationen über die Rolle von IL-6 bei Krebspatienten sind nicht umfangreich, es scheint jedoch die Tumorprogression direkt und indirekt zu fördern (Sparano *et al.*, 2004). Die Tatsache, dass IL-6 die TGF- $\beta$ 1 induzierte Treg Differenzierung blockieren kann (Bettelli *et al.*, 2006; Weaver *et al.*, 2006) und die Annahme, dass bei Kopf-Hals-Tumoren regulatorische T-Zellen anwesend sind und Immunsuppression ausüben, lassen hier keine Th17 Induktion schlussfolgern. Letztere Annahme wird durch Studien von Albers, *et al.*, 2005 und Curiel, *et al.*, 2004 und durch das ausgeprägte TGF- $\beta$ 1 Tumormilieu gestützt.

Aufgrund dieser Befunde, waren die Erkenntnisse nach der Korrelation zwischen IL-17 im Tumor mit der Immunreaktivität im IFN- $\gamma$  ELISpot Test überraschend. Bei dem gegenwärtigen Stand der Erkenntnisse ist diese Korrelation nicht leicht zu erklären. Th1- und Th17-Zellen differenzieren sich nach einigen Befunden von unterschiedlichen Vorläufern (Weaver *et al.*, 2006; Harrington *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005). Nach anderen Befunden differenzieren sich Th1- und Th17-Zellen aus einem gemeinsamen, naiven CD4 Vorläuferzelltyp (McKenzie *et al.*, 2006; Bettelli and Kuchroo, 2005). Es ist gezeigt worden, dass IL-17 in Stroma-, Epithel- und Endothelzellen die Freisetzung inflammatorischer Zytokine induziert und Neutrophile aktiviert und rekrutiert (McKenzie *et al.*, 2006; Kolls and Linden, 2004). Neutrophile sind polymorphonukleare Leukozyten, die extrazelluläre

Bakterien phagozytieren können. Genauso wie Makrophagen, besitzen Neutrophile eine duale Rolle in der Tumorprogression (McKenzie *et al.*, 2006; Mantovani *et al.*, 2002).

Es muss an dieser Stelle bemerkt werden, dass sich IL-17 in Mausmodellen sowohl tumorinhibitorisch als auch tumorfördernd manifestieren konnte (Benchetrit *et al.*, 2002; Tartour *et al.*, 1999). Neben der Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-1 in Fibroblasten, Makrophagen und Epithelzellen (Kolls *and* Linden, 2004; Nakae *et al.*, 2003), fördert dieses Zytokin die Angiogenese (Wahl *et al.*, 2006). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass sich Th17-Zellen und regulatorische T-Zellen antagonistisch differenzieren (Bettelli *et al.*, 2006). Der Test auf Korrelation zwischen IL-17 und TGF- $\beta$ 1 bei 30 Patienten ergab keine Aufschlüsse. Analysen von IL-17 sekretierenden, tumorspezifischen T-Zellen und vom IL-6 Tumormilieu könnten weitere Einsichten in Tumor-Immuninteraktionen von Th17-Zellen liefern.

### IL-12

Das aus reifen myeloiden dendritischen Zellen sekretierte IL-12 kann Th1 spezifische Immunität induzieren und Resistenz gegen experimentelle Tumorsysteme *in vivo* generieren (zusammengefasst in Steinman *and* Dhodapkar, 2001). Bei den hier untersuchten Patienten lag IL-12 in Plasma und Tumor im Vergleich zu gesunden Donoren signifikant erniedrigt vor. Dieser Befund war zu erwarten, nachdem andere Forschungsgruppen bei Kopf-Hals-Tumoren belegen konnten, dass Tumorzellkulturüberstände kein IL-12 enthalten (Kacani *et al.*, 2003), und dass dieses Zytokin im Plasma verringert nachweisbar ist (Sparano *et al.*, 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnte Neuartiges und zur bisherigen allgemeinen Funktion von IL-12 Gegensätzliches bezüglich der IFN- $\gamma$  Immunantworten beobachtet werden. Patienten ohne nachweisbare Tumorreaktivität im IFN- $\gamma$  ELISpot wiesen erhöhte IL-12 Konzentrationen im Tumor auf. Es ist bekannt, dass IL-12 die IFN- $\gamma$  Produktion von T-Zellen anschalten kann (Watford *et al.*, 2004; Zhang *and* Kaplan, 2000). IFN- $\gamma$  wiederum kann bei Kopf-Hals-Tumoren die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 herunterregulieren, wodurch Tumorzellmigration und Metastasierung benachteiligt werden (Katayama *et al.*, 2005; Samara *et al.*, 2004). Metastatische Lesionen wurden bei Melanompatienten nach systemischer IL-12 Immuntherapie von tumorspezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten infiltriert und es konnte histologische Nekrose demonstriert werden (Mortarini *et al.*, 2000). In Mausmodellen sind die antitumoralen Eigenschaften von IL-12 belegt worden: die Abstoßung von hochimmunogenen Tumoren nach Therapie mit IL-12 Antikörpern konnte verhindert werden (Fallarino *et al.*, 1996).

Es ist seit langem für die Funktion von Zytokinen bekannt, dass eine Dichotomie vorliegen kann. Nach diesem Konzept übt ein Zytokin abhängig vom Stimulus oder beeinflusst von der Mikroumgebung gegensätzliche Funktionen aus. Für IL-10 wurde gezeigt, dass es

immunstimulierende und antitumorale Eigenschaften besitzt (Mocellin *et al.*, 2001). In einer Studie an IL-10 sekretierenden murinen Tumorzellen wurde Immunogenität und unerwarteterweise keine IFN- $\gamma$  Inhibition beobachtet (Barth *et al.*, 1996). Ähnliche Analysen an Tumormodellen liegen für IL-12 nicht vor. Zwei Studien konnten allerdings beweisen, dass IL-12 (Skok *et al.*, 1999) wie IFN- $\gamma$  (Feuerer *et al.*, 2006) *feedback* Regulatorfunktionen besitzen. Diese proinflammatorischen Moleküle können Th1 Immunität kontrollieren, gar blockieren, um Immunpathologien, wie die Crohn'sche Krankheit oder Sepsis, zu verhindern. Für eine derartige Immunregulation sprechen auch Befunde aus älteren Studien. Die *in vivo* IL-12 Administration führte in Wildtypmäusen zur IL-10 Produktion (Morris *et al.*, 1994). In IFN- $\gamma$  *knock-out* Mäusen wurde die IL-4 Freisetzung nach einer *Leishmania major* Infektion und IL-12 Behandlung begünstigt (Wang *et al.*, 1994).

### IL-10

Für das immunsupprimierende Zytokin IL-10 konnten zwischen den hier untersuchten Kopf-Hals-Tumorpatienten und gesunden Donoren keine größeren Unterschiede beobachtet werden. Lediglich die Plasmawerte waren bei Tumorerkrankten erhöht. Dennoch scheint IL-10 bei diesem Malignom eine Rolle zu spielen. Es konnten signifikant erhöhte Werte bei T1-T2 großen Tumoren beobachtet werden. Dieser Befund weist auf eine Rolle von IL-10 zu Beginn der Tumorprogression hin.

Antiinflammatorische Funktionen von IL-10 wurden hier nicht beobachtet: die IFN- $\gamma$  Immunreaktivität im ELISpot Test wies keine IL-10 spezifischen Korrelationen auf. Interessanterweise exhibierten sämtliche im IL-10 ELISpot reaktiven Patienten deutlich erhöhte IL-10 Konzentrationen im Tumorgewebe (Daten nicht gezeigt), wodurch eine allgemeine Th2 Polarisierung bei Kopf-Hals-Tumorerkrankten nahegelegt wird.

Ähnlich negative Korrelationen zwischen IL-10 Serumkonzentrationen und Prognose wurden für Patienten mit Lymphom beschrieben (Bohlen *et al.*, 2000). Dem IL-10 wird ein wesentlicher Beitrag in der Suppression der Tumor-Immunreaktionen wie auch bei *tumor escape* Mechanismen zugeschrieben. Es kann als Tumorwachstumsfaktor agieren (Yue *et al.*, 1997), die Expression von Adhäsions-, HLA- und TAP-Molekülen herunterregulieren (Petersson *et al.*, 1998; Yue *et al.*, 1997) und die Funktion von dendritischen Zellen beeinflussen (Faulkner *et al.*, 2000; Koch *et al.*, 1996).

Dass keine Korrelation zwischen IL-10 und IFN- $\gamma$  Gedächtnis steht im Einklang mit Analysen am Zervixkarzinom. Tumorzellen konnten in diesem Malignom tumorinfiltrierende Lymphozyten über IL-10 Produktion Th2 polarisieren (Sheu *et al.*, 2001).

### IFN- $\alpha$

In Plasma und Tumorgewebe von Kopf-Hals-Tumorpatienten war signifikant weniger IFN- $\alpha$  als im Kontrollgewebe vorhanden. Es wurden aber keine Korrelationen zwischen IFN- $\alpha$  Menge und klinischen Daten bzw. IFN- $\gamma$  Immunreaktivität gefunden. IFN- $\alpha$ , dessen

Hauptproduktionsstätte die plasmazytoiden dendritischen Zellen sind (Cella *et al.*, 1999), kann als Signal 3 bei der T-Zellaktivierung und Proliferation wirken (Haring *et al.*, 2006). Bei Kopf-Hals-Tumoren ist gezeigt worden, dass plasmazytoide dendritische Zellen durch die Herunterregulation des Toll-like Rezeptors 9 wenig IFN- $\alpha$  produzieren (Hartmann *et al.*, 2003).

### **5.6 Nicht IFN- $\gamma$ tumorreaktive Kopf-Hals-Tumorpatienten zeigen verstärkte CD4 Tumorinfiltration, die mit erhöhtem TGF- $\beta$ 1 Vorkommen und kleiner TumorgroÙe korreliert.**

Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit sollten die Auswirkungen der oben detektierten IFN- $\gamma$  spezifischen Tumor-Immuninteraktionen und des Tumorzytokinprofils auf die Tumorinfiltration von CD3, CD4, CD8 und CD45RA positiven T-Zellen bei 68 Kopf-Hals-Tumorpatienten untersucht werden. Die Präsenz von tumorinfiltrierenden Lymphozyten in der Tumormikroumgebung wird als Anzeichen der patienteneigenen Immunantwort gegenüber Tumorantigenen angesehen (Nakano *et al.*, 2001; Schumacher *et al.*, 2001; Naito *et al.*, 1998). Gleichzeitig beeinflusst dies Geschehen den dynamischen Prozess des *cancer immunoediting* (Dunn *et al.*, 2004).

Die Tumorgewebe waren hochgradig von Immunzellen infiltriert und es waren signifikant mehr CD8 als CD4 T-Zellen anwesend. Dies ist eine unerwartete Beobachtung, weil die hiesigen Patienten im Blut prozentuell weniger CD8 T-Zellen im Vergleich zu gesunden Donoren besaÙen. Kuss *et al.*, 2003 und Tsukishiro *et al.*, 2003 konnten vermehrte Apoptose von CD8 T-Zellen im Blut von Kopf-Hals-Tumorpatienten verzeichnen. Eine massive Einwanderung von zytotoxischen Lymphozyten ins Tumorgewebe scheint zunächst denkbar. Die Tatsache, dass in der hiesigen Korrelationsanalyse die zytotoxischen T-Lymphozyten keinerlei Einfluss auf die Prognose ausübten, lassen hier immunsupprimierende Mechanismen vermuten. In der Studie von Badoual *et al.*, 2006 scheinen CD8 T-Zellen bei 84 Kopf-Hals-Tumorpatienten keine Effektorfunktionen zu besitzen. Die Prognose von Patienten mit nichtkleinzelligem Lungenkarzinom wird von der CD8 Infiltration nicht beeinflusst (Wakabayashi *et al.*, 2003).

Immuninfiltrate waren am stärksten zu beobachten, wenn die Tumore kleine Größe besaÙen und geringe Differenzierung exhibierten. CD45RA positive T-Zellen waren signifikant in Tumorgewebe niedriger Malignität eingewandert. Dies steht im Einklang mit der Annahme, dass erst bei steigendem Differenzierungsgrad des Tumors, die Menge an präsentierten Tumorantigenen zunimmt (Wakabayashi *et al.*, 2003). Ist dies nicht der Fall, so können T-

Zellaktivierung und -proliferation nicht stattfinden und das Malignom wird hauptsächlich von naiven Lymphozyten besiedelt.

Ein weiterer Befund, nämlich, dass CD3 positive T-Zellen verstärkt in Tumorgewebe von Patienten mit nachweisbarer Lymphknotenmetastasierung migrierten, legt noch einmal nahe, dass lymphogene, metastatische Ausbreitung von Kopf-Hals-Tumorzellen Voraussetzung für die Präsenz tumorspezifischer T-Zellen im Blut ist (siehe 5.2).

In diesem Zusammenhang konnte dem CD45RA/CD3 Verhältnis zufolge festgestellt werden, dass IFN- $\gamma$  tumorreaktive Patienten den kleinsten Anteil naiver T-Zellen im Vergleich zu nicht reaktiven und supprimierten Patienten aufwiesen. Interessanterweise demonstrierte erstere Patientenkohorte, mit tumorreaktiven Gedächtnis T-Zellen in Blut und Lymphknoten und wenig naiven CD3 T-Zellen im Tumorgewebe, die kleinste Stadium IV Zuordnung: 58% im Vergleich zu 72 bzw. 100% bei den anderen Patientengruppen.

Den größten Einfluss auf Gesamttumorreaktivität und Tumorstadieneinteilung scheinen die CD4 T-Zellen zu besitzen. Kopf-Hals-Tumorpatienten ohne nachweisbare IFN- $\gamma$  Tumorimmunität offenbarten signifikant erhöhte CD4 Tumordinfiltration und erhöhte Stadium IV Zuordnung (81%) im Vergleich zu IFN- $\gamma$  tumorreaktiven Patienten (58%). Bei den CD4 T-Zellen könnten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen einen Großteil ausmachen. Dies wird durch Beobachtungen von zwei Studien bekräftigt: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen sind die prominenteste CD4 T-Zellsubpopulation, die Kopf-Hals-Tumore infiltriert (Badoual *et al.*, 2006); solche Zellen kommen in der Zirkulation von Kopf-Hals-Tumorpatienten, im Vergleich zu gesunden Donoren, angereichert vor (Schaefer *et al.*, 2005). In diesem Zusammenhang und im Hinblick auf die Studie von Curiel *et al.*, 2004 (siehe 5.1) sind die Korrelationen ersterer Studie umso überraschender: Badoual *et al.*, 2006 konnten bei 84 Kopf-Hals-Tumorpatienten beobachten, dass regulatorische Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einer besseren lokoregionären Kontrolle korrelierten. Die Forscher erklärten diese Beobachtung unter anderem dadurch, dass die regulatorische T-Zellfunktion von der Stadieneinteilung der Patienten beeinflusst sein könnte. Ein Vergleich beider Patientenkohorten, zeigte jedoch keine Unterschiede in der Verteilung klinischer Daten bei den hiesigen Patienten. Möglicherweise liegt die oben genannte Diskrepanz in der Rolle von CD4 T-Zellen bei der Prognose von Kopf-Hals-Tumorpatienten darin, dass Korrelationen der CD4 Infiltration mit der IFN- $\gamma$  Tumorreaktivität bei 38 Patienten vorliegen. Die Mehrheit aktueller Studien deutet beim Mamma-, Ovarial- und Nierenzellkarzinom darauf hin, dass CD4 T-Zellen die Tumorprogression negativ beeinflussen (Macchetti *et al.*, 2006; Yu and Fu, 2006; Sato *et al.*, 2005; Bromwich *et al.*, 2003).

Bezüglich der vorgestellten CD4 Analyse konnten hier noch einmal Unterschiede zwischen peripherer und lymphatischer Tumorimmunität festgestellt werden. Oben genannter Befund für die Gesamtimmunreaktivität lässt sich bei nicht tumorreaktiven Patienten des peripheren

Blutes wieder finden: in dieser Patientenkohorte kommen signifikant mehr CD4 T-Zellen vor. Im lymphatischen Organ bestehen keine Unterschiede. Im Hinblick auf die multiparametrischen ELISpot Analysen (siehe 5.4), in denen periphere Gedächtnis CD4 T-Zellen ausschließlich Th2 Polarisierung zeigten, während lymphatische sowohl Th1 als auch Th2 polarisiert waren, stellt sich nun die Frage, ob aus Blut und Lymphknoten verschiedene CD4 Fraktionen in die Tumorgewebe migrieren. Bei den zirkulierenden Lymphozyten handelt es sich wahrscheinlich hauptsächlich um Th2-Zellen bzw. Treg, wohingegen bei den lymphatisch residenten T-Zellen möglicherweise auch Th1-Zellen beteiligt sind.

Unterschiede zwischen Blut- und Lymphknotenimmunität wurden auch im CD4/CD8 Verhältnis der Immuninfiltrate, sowie in der Verteilung dieser im Tumorgewebe sichtbar. Tumore von Patienten mit IFN- $\gamma$  tumorreaktiven, zirkulierenden T-Zellen waren verstärkt von CD8 Lymphozyten infiltriert, wodurch ein sehr niedriges CD4/CD8 Verhältnis festzustellen war. Vorherige Analysen (siehe 5.3) haben ergeben, dass zytotoxische Lymphozyten des Blutes ausgeprägtes IFN- $\gamma$  spezifisches Anti-Tumorgedächtnis exhibieren. Es liegt also die Vermutung nahe, dass diese tumorspezifischen CD8 T-Zellen aus dem Blut in die Tumore gewandert sind. In Tumoren von Patienten mit Immunantwort der Lymphknoten T-Zellen migrierten gleichmäßig viele CD4 und CD8 T-Zellen und entsprechend war die IFN- $\gamma$  Tumorreaktivität in der zytotoxischen und Helferfraktion gleich stark. Hier blieb ein Gleichgewicht in der peri- und intratumoralen Verteilung dieser T-Zellpopulationen bestehen. Die starke CD8 Infiltration bei tumorreaktiven Patienten des Blutes konzentrierte sich peritumoral. CD4 T-Zellen waren intratumoral bei nicht tumorreaktiven Patienten erhöht. Interessanterweise war in diesen Korrelationsuntersuchungen die Stadium IV Zuordnung peripher tumorreaktiver Patienten (75%) deutlich höher als jene lymphatisch tumorreaktiver (50%). Verbesserte Prognose war bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Ösophagus mit einer Erhöhung der intratumoralen CD4 und CD8 Infiltration assoziiert (Cho *et al.*, 2003). Beim Zervixkarzinom war ein niedriges CD4/CD8 Verhältnis von tumorinfiltrierenden Lymphozyten mit Tumorprogression korreliert (Sheu *et al.*, 1999). Ähnliche Analysen gibt es beim Melanom, Lungen- und Harnblasenkarzinom (Hernberg *et al.*, 1997; Yoshino *et al.*, 1993; Igarashi *et al.*, 1992).

Nicht nur die unterschiedliche Funktionalität von Blut- und Lymphknotenzellen wird hier noch einmal verdeutlicht, sondern auch die Rolle von TGF- $\beta$ 1 in der Tumorerkrankung. Ergänzend zu den oben aufgeführten Analysen bezüglich der Präsenz von regulatorischen T-Zellen bei nicht tumorreaktiven Patienten, korrelierte das Vorkommen von CD4 T-Zellen direkt mit dem TGF- $\beta$ 1 Tumormilieu. Patienten mit Anti-Tumorgedächtnis exhibierten niedrige CD4 Infiltration und/oder wenig TGF- $\beta$ 1 Produktion. Kopf-Hals-Tumorpatienten mit größeren Tumoren zeigten erhöhte CD4 Infiltration und/oder erhöhte TGF- $\beta$ 1 Produktion. Die TGF- $\beta$ 1

geprägte Tumormikroumgebung scheint also entweder CD4 T-Zellen zu Suppressorzellen zu konvertieren oder natürlich vorkommende, regulatorische T-Zellen zu expandieren. Dass tumorspezifische CD4 T-Zellen während der Tumorprogression ihren Phänotyp von Effektor zu Suppressor ändern können, ist bereits gezeigt worden (Zhou *et al.*, 2004).

Die hiesigen Befunde stehen im Einklang zu Untersuchungen an einem murinen Fibrosarkommodell, die demonstrieren konnten, dass sich tumorinfiltrierende Lymphozyten während der Tumormanifestation und -progression anstelle von Helfer CD4 T-Zellen zu regulatorischen CD4 T-Zellen entwickeln (Yu *et al.*, 2005). Es wurde angenommen, dass CD4 T-Zellen zu Beginn der Tumorerkrankung eine Helferfunktion ausüben. Sobald der Tumor chronisch persistiert, würde die erhöhte Akkumulation von regulatorischen CD4 T-Zellen die zytotoxischen T-Lymphozyten inhibieren. So könnte die Immunogenität des Malignoms maskiert werden. Nach den hier vorgelegten Ergebnissen würde ein ähnlicher Mechanismus, der TGF- $\beta$ 1 abhängig ist, für Kopf-Hals-Tumorpatienten gelten.

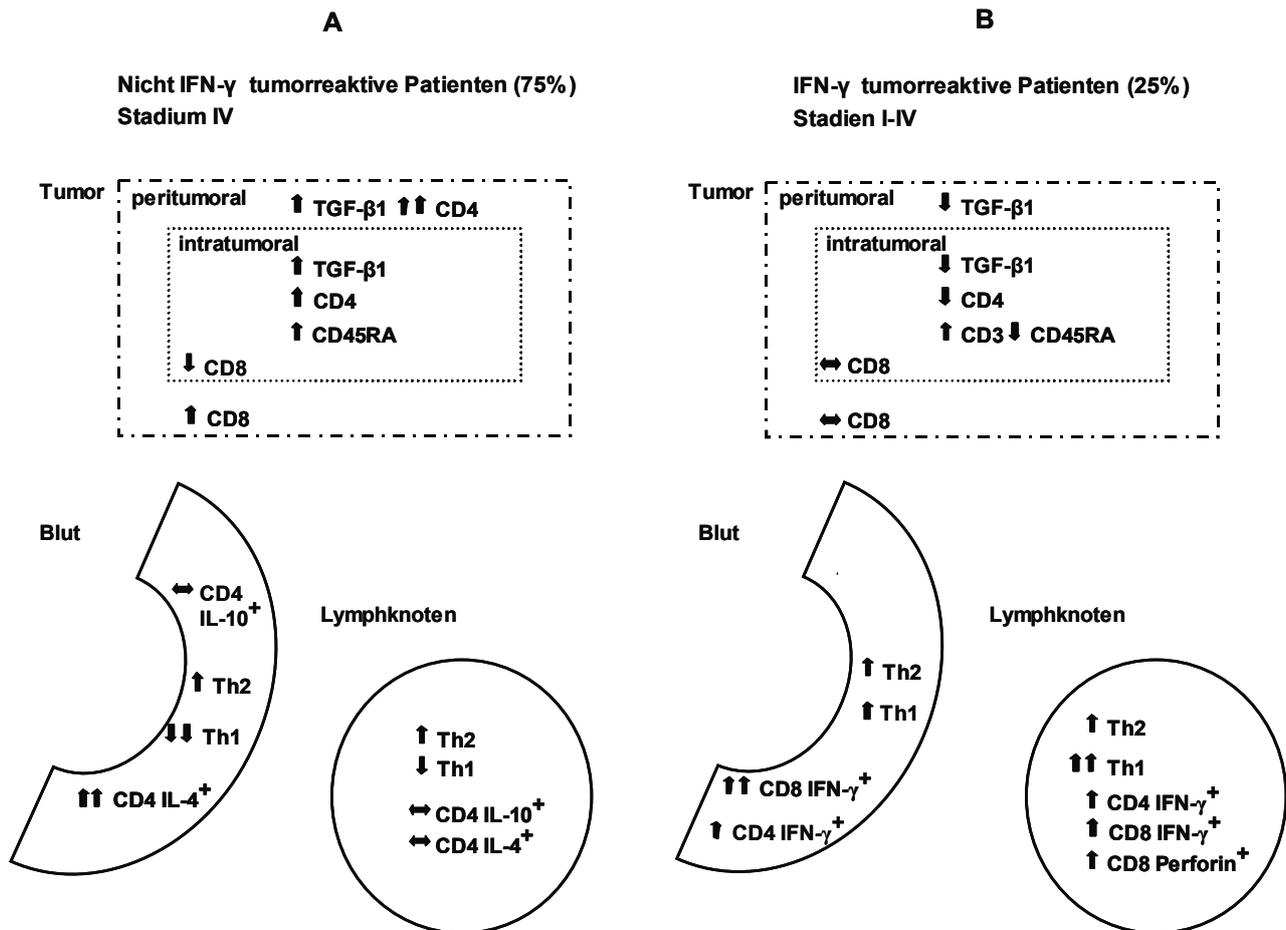
Aus diesen und oben genannten Befunden ist es möglich und wahrscheinlich, dass erhöhte TGF- $\beta$ 1 Produktion eines Tumors zu einer starken Infiltration von regulatorischen CD4 T-Zellen führt (Yu *and* Fu, 2006). Beide Mechanismen zusammen beschleunigen Immunsuppression wie auch Tumorprogression. Diese Annahme wird von einer kürzlich veröffentlichten Studie bekräftigt, in der mit Hilfe der intravitalen Mikroskopie gezeigt wurde, dass die *in vivo* Exozytose lytischer Granula bei zytotoxischen T-Lymphozyten durch die Präsenz von regulatorischen T-Zellen inhibiert wird (Mempel *et al.*, 2006). Diese selektive Regulation war von der TGF- $\beta$ 1 Signaltransduktion in T-Zellen abhängig. Die Tatsache, dass in der hiesigen Korrelationsanalyse die zytotoxischen T-Lymphozyten keinerlei Einfluss auf die Prognose ausübten, steht im Einklang mit einem solchen möglichen Mechanismus.

Trotz der direkten Korrelation zwischen TGF- $\beta$ 1 und CD4 Infiltration wird in der vorliegenden Arbeit davon ausgegangen, dass hauptsächlich Tumorzellen und nicht T-Zellen TGF- $\beta$ 1 sezernieren. Das konnte durch Analysen der TGF- $\beta$ 1 Freisetzung kultivierter, primärer Kopf-Hals-Tumorzellen belegt werden (siehe 5.5). Zudem ist gezeigt worden, dass regulatorische T-Zellen relativ wenig TGF- $\beta$ 1 produzieren. Stattdessen induzieren sie - TGF- $\beta$ 1 vermittelt - die TGF- $\beta$ 1 Freisetzung anderer Zellen (Kullberg *et al.*, 2005).

## 5.7 Implikationen auf die Immuntherapie von Kopf-Hals-Tumoren

Die vorliegende Arbeit stellt die erste umfassende Analyse der peripheren und lymphatischen Immunantworten bei primär operierten Kopf-Hals-Tumorpatienten dar. Die Befunde (Abb. 5.1) sprechen für die Notwendigkeit, bei immuntherapeutischen Studien mehrere Komponenten des Immunsystems von Tumorpatienten zu berücksichtigen, um effizient tumorspezifische T-Zellen am Tumor zu induzieren und gleichzeitig die Amplifikation

regulatorischer T-Zellen bzw. Resistenzmechanismen des Tumors zu blockieren. Multimodale, immuntherapeutische Tumorbehandlungen sollten nicht nur die Erhöhung der Frequenz tumorspezifischer T-Zellen zum Ziel haben, sondern auch die Beseitigung immunsupprimierender Faktoren. Bei Kopf-Hals-Tumorpatienten würde dies eine lokale Neutralisation des TGF- $\beta$ 1 Tumormilieus, sowie Reaktivierung und Expansion tumorspezifischer T-Zellen des Lymphknotens bedeuten.



**Abb. 5.1: Schema zu zellulären Immunantworten in Blut und Lymphknoten bei Kopf-Hals-Tumorpatienten und mögliche Resistenzmechanismen des Tumors, basierend auf Daten dieser Arbeit.**

(A) Kopf-Hals-Tumore des fortgeschrittenen Stadiums induzieren über ihre starke TGF- $\beta$ 1 Produktion die intratumorale Akkumulation und Expansion von CD4 T-Zellen. Diese wirken möglicherweise regulatorisch/suppressorisch, da solche Krebspatienten große Tumorgöße und hohe Rezidivrate demonstrieren. Zudem sind die meisten tumorinfiltrierenden Lymphozyten naiven Phänotyps. Gleichzeitig kann sich bei der Mehrheit der Patienten keine IFN- $\gamma$  Tumorreaktivität von Gedächtnis Gesamt T-Zellen im peripheren und lymphatischen Immunsystem manifestieren. Im Blut sind die CD4 T-Lymphozyten stark Th2 polarisiert und demonstrieren stark supprimierte Th1 Immunität. Auch im Lymphknoten sind Th2 Immunantworten vorhanden, die IL-4 Sekretion ist hier jedoch nicht so ausgeprägt.

**(B)** Kopf-Hals-Tumore aller Stadien, die keine erhöhte TGF- $\beta$ 1 Sekretion aufzeigen, rekrutieren weniger CD4 T-Zellen und weniger naive CD3 T-Zellen. Die Krebspatienten haben kleinere Tumore und Rezidive manifestieren sich seltener. IFN- $\gamma$  Tumorreaktivität ist in Gedächtnis Gesamt T-Zellen bei 25% der Patienten nachweisbar. Diese Anti-Tumorreaktivität ist in T-Zellen drainierender Lymphknoten auffällig öfter als in peripheren Lymphozyten manifestiert. Zudem zirkulieren tumorspezifische T-Zellen hauptsächlich bei Patienten mit Lymphknotenmetastasierung. Hier sind auch starke IFN- $\gamma$  Immunantworten der CD8 T-Zellen zu beobachten. Die CD8 positiven T-Zellen sind in der Tumormasse peritumoral angereichert. Tumorreaktive Gedächtnis CD8 T-Zellen, die denen des Lymphknotens ähneln, sind in der gesamten Tumormasse verteilt und offenbaren nach *in vitro* Restimulation starke Perforin Freisetzung.

Insgesamt sind Th1 polarisierte Immunantworten im Lymphknoten doppelt so häufig wie in der Blutzirkulation. Beide Zellkompartimente enthalten Zellen mit gleich starker Th2 Polarisierung.

## 6. Literaturverzeichnis

- Agarwal, A., Rani, M., Saha, G.K., Valarmathi, T.M., Bahadur, S., Mohanti, B.K. and Das, S.N. (2003) Disregulated expression of the Th2 cytokine gene in patients with intraoral squamous cell carcinoma. *Immunol Invest.* **32**: 17-30.
- Aggarwal, S. and Gurney, A.L. (2002) IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol.* **71**: 1-8.
- Albers, A.E., Ferris, R.L., Kim, G.G., Chikamatsu, K., DeLeo, A.B. and Whiteside, T.L. (2005) 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.
- Albers, A.E., Visus, C., Tsukishiro, T., Ferris, R.L., Gooding, W., Whiteside, T.L. and De Leo, A.B. (2006) Alterations in the T-cell receptor variable beta gene-restricted profile of CD8+ T lymphocytes in the peripheral circulation of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res.* **12**: 2394-2403.
- Albert, M.L., Sauter, B. and Bhardwaj, N. (1998) Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature.* **392**: 86-89.
- Anichini, A., Scarito, A., Molla, A., Parmiani, G. and Mortarini, R. (2003) Differentiation of CD8+ T cells from tumor-invaded and tumor-free lymph nodes of melanoma patients: role of common gamma-chain cytokines. *J Immunol.* **171**: 2134-2141.
- Annacker, O., Pimenta-Araujo, R., Burlen-Defranoux, O., Barbosa, T.C., Cumano, A. and Bandeira, A. (2001) CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol.* **166**: 3008-3018.
- Ansel, K.M., Djuretic, I., Tanasa, B. and Rao, A. (2006) Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu Rev Immunol.* **24**: 607-656.
- Antia, R., Ganusov, V.V. and Ahmed, R. (2005) The role of models in understanding CD8+ T-cell memory. *Nat Rev Immunol.* **5**: 101-111.
- Apostolou, I. and von Boehmer, H. (2004) In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med.* **199**: 1401-1408.
- Arstila, T.P., Casrouge, A., Baron, V., Even, J., Kanellopoulos, J. and Kourilsky, P. (1999) A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science.* **286**: 958-961.
- Asai, T., Storkus, W.J. and Whiteside, T.L. (2000) Evaluation of the modified ELISPOT assay for gamma interferon production in cancer patients receiving antitumor vaccines. *Clin Diagn Lab Immunol.* **7**: 145-154.
- Bachmann, M.F., Barner, M., Viola, A. and Kopf, M. (1999) Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection. *Eur J Immunol.* **29**: 291-299.
- Badoual, C., Hans, S., Rodriguez, J., Peyrard, S., Klein, C., Agueznay Nel, H., *et al* (2006) Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res.* **12**: 465-472.
- Bai, L., Beckhove, P., Feuerer, M., Umansky, V., Choi, C., Solomayer, F.S., *et al* (2003) Cognate interactions between memory T cells and tumor antigen-presenting dendritic cells from bone marrow of breast cancer patients: bidirectional cell stimulation, survival and antitumor activity in vivo. *Int J Cancer.* **103**: 73-83.
- Baldwin, T.A., Hogquist, K.A. and Jameson, S.C. (2004) The fourth way? Harnessing aggressive tendencies in the thymus. *J Immunol.* **173**: 6515-6520.
- Banchereau, J. and Steinman, R.M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* **392**: 245-252.
- Banchereau, J., Briere, F., Galizzi, J.P., Miossec, P. and Rousset, F. (1994) Human interleukin 4. *J Lipid Mediat Cell Signal.* **9**: 43-53.
- Barry, M., Heibein, J.A., Pinkoski, M.J., Lee, S.F., Moyer, R.W., Green, D.R. and Bleackley, R.C. (2000) Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol Cell Biol.* **20**: 3781-3794.
- Barth, R.J., Jr., Coppola, M.A. and Green, W.R. (1996) In vivo effects of locally secreted IL-10 on the murine antitumor immune response. *Ann Surg Oncol.* **3**: 381-386.

- Barton, C., Davies, D., Balkwill, F. and Burke, F. (2005) Involvement of both intrinsic and extrinsic pathways in IFN-gamma-induced apoptosis that are enhanced with cisplatin. *Eur J Cancer*. **41**: 1474-1486.
- Basham, T.Y., Bourgeade, M.F., Creasey, A.A. and Merigan, T.C. (1982) Interferon increases HLA synthesis in melanoma cells: interferon-resistant and -sensitive cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **79**: 3265-3269.
- Beatty, G. and Paterson, Y. (2001) IFN-gamma-dependent inhibition of tumor angiogenesis by tumor-infiltrating CD4+ T cells requires tumor responsiveness to IFN-gamma. *J Immunol*. **166**: 2276-2282.
- Becker, T.C., Wherry, E.J., Boone, D., Murali-Krishna, K., Antia, R., Ma, A. and Ahmed, R. (2002) Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med*. **195**: 1541-1548.
- Benchetrit, F., Ciree, A., Vives, V., Warnier, G., Gey, A., Sautes-Fridman, C., *et al* (2002) Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood*. **99**: 2114-2121.
- Bettelli, E. and Kuchroo, V.K. (2005) IL-12- and IL-23-induced T helper cell subsets: birds of the same feather flock together. *J Exp Med*. **201**: 169-171.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., *et al* (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. **441**: 235-238.
- Biron, C.A. (2001) Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look. *Immunity*. **14**: 661-664.
- Blachere, N.E., Morris, H.K., Braun, D., Saklani, H., Di Santo, J.P., Darnell, R.B. and Albert, M.L. (2006) IL-2 is required for the activation of memory CD8+ T cells via antigen cross-presentation. *J Immunol*. **176**: 7288-7300.
- Blanckaert, V.D., Schelling, M.E., Elstad, C.A. and Meadows, G.G. (1993) Differential growth factor production, secretion, and response by high and low metastatic variants of B16BL6 melanoma. *Cancer Res*. **53**: 4075-4081.
- Blobel, G.C., Schiemann, W.P. and Lodish, H.F. (2000) Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med*. **342**: 1350-1358.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. and Howard, J.C. (1997) Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*. **15**: 749-795.
- Bohlen, H., Kessler, M., Sextro, M., Diehl, V. and Tesch, H. (2000) Poor clinical outcome of patients with Hodgkin's disease and elevated interleukin-10 serum levels. Clinical significance of interleukin-10 serum levels for Hodgkin's disease. *Ann Hematol*. **79**: 110-113.
- Boon, T., Coulie, P.G. and Van den Eynde, B. (1997) Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol Today*. **18**: 267-268.
- Bousoo, P., Bhakta, N.R., Lewis, R.S. and Robey, E. (2002) Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science*. **296**: 1876-1880.
- Bradford, C.R., Wolf, G.T., Carey, T.E., Zhu, S., Beals, T.F., Truelson, J.M., *et al* (1999) Predictive markers for response to chemotherapy, organ preservation, and survival in patients with advanced laryngeal carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*. **121**: 534-538.
- Bradford, C.R., Zhu, S., Poore, J., Fisher, S.G., Beals, T.F., Thoraval, D., *et al* (1997) p53 mutation as a prognostic marker in advanced laryngeal carcinoma. Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Cooperative Study Group. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. **123**: 605-609.
- Brinkmann, V., Geiger, T., Alkan, S. and Heusser, C.H. (1993) Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T cells. *J Exp Med*. **178**: 1655-1663.
- Bromwich, E.J., McArdle, P.A., Canna, K., McMillan, D.C., McNicol, A.M., Brown, M. and Aitchison, M. (2003) The relationship between T-lymphocyte infiltration, stage, tumour grade and survival in patients undergoing curative surgery for renal cell cancer. *Br J Cancer*. **89**: 1906-1908.
- Buelens, C., Verhasselt, V., De Groote, D., Thielemans, K., Goldman, M. and Willems, F. (1997) Interleukin-10 prevents the generation of dendritic cells from human peripheral blood mononuclear cells cultured with interleukin-4 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor. *Eur J Immunol*. **27**: 756-762.
- Bueter, M., Gasser, M., Schramm, N., Lebedeva, T., Tocco, G., Gerstlauer, C., *et al* (2006) T-cell response to p53 tumor-associated antigen in patients with colorectal carcinoma. *Int J Oncol*. **28**: 431-438.
- Burrows, F.J., Derbyshire, E.J., Tazzari, P.L., Amlot, P., Gazdar, A.F., King, S.W., *et al* (1995) Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res*. **1**: 1623-1634.

- Callan, M.F., Fazou, C., Yang, H., Rostron, T., Poon, K., Hatton, C. and McMichael, A.J. (2000) CD8(+) T-cell selection, function, and death in the primary immune response in vivo. *J Clin Invest.* **106**: 1251-1261.
- Castellino, F. and Germain, R.N. (2006) Cooperation between CD4+ and CD8+ T cells: when, where, and how. *Annu Rev Immunol.* **24**: 519-540.
- Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A. and Alber, G. (1996) Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med.* **184**: 747-752.
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A. and Colonna, M. (1999) Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med.* **5**: 919-923.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., et al (2003) 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.
- Chen, Z., Malhotra, P.S., Thomas, G.R., Ondrey, F.G., Duffey, D.C., Smith, C.W., et al (1999) Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* **5**: 1369-1379.
- Cho, Y., Miyamoto, M., Kato, K., Fukunaga, A., Shichinohe, T., Kawarada, Y., et al (2003) CD4+ and CD8+ T cells cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* **63**: 1555-1559.
- Choi, C., Witzens, M., Bucur, M., Feuerer, M., Sommerfeldt, N., Trojan, A., et al (2005) Enrichment of functional CD8 memory T cells specific for MUC1 in bone marrow of patients with multiple myeloma. *Blood.* **105**: 2132-2134.
- Choi, C. (2004) Phänotypische und funktionale Charakterisierung tumor-spezifischer Gedächtnis T-Zellen bei malignen Erkrankungen. Dissertation.
- Ciree, A., Michel, L., Camilleri-Broet, S., Jean Louis, F., Oster, M., Flageul, B., et al (2004) Expression and activity of IL-17 in cutaneous T-cell lymphomas (mycosis fungoides and Sezary syndrome). *Int J Cancer.* **112**: 113-120.
- Coccia, E.M., Severa, M., Giacomini, E., Monneron, D., Remoli, M.E., Julkunen, I., et al (2004) Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol.* **34**: 796-805.
- Coley, W.B. (1911) The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop Relat Res*: 3-11.
- Combadiere, B., Boissonnas, A., Carcelain, G., Lefranc, E., Samri, A., Bricaire, F., et al (2004) Distinct time effects of vaccination on long-term proliferative and IFN-gamma-producing T cell memory to smallpox in humans. *J Exp Med.* **199**: 1585-1593.
- Cousens, L.P., Orange, J.S. and Biron, C.A. (1995) Endogenous IL-2 contributes to T cell expansion and IFN-gamma production during lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol.* **155**: 5690-5699.
- Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., et al (2004) Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* **10**: 942-949.
- D'Andrea, A., Rengaraju, M., Valiante, N.M., Chehimi, J., Kubin, M., Aste, M., et al (1992) Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med.* **176**: 1387-1398.
- Davenport, M.P., Ribeiro, R.M. and Perelson, A.S. (2004) Kinetics of virus-specific CD8+ T cells and the control of human immunodeficiency virus infection. *J Virol.* **78**: 10096-10103.
- Davis, M.M. and Bjorkman, P.J. (1988) T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature.* **334**: 395-402.
- Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B. and Klein, L. (2001) Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol.* **2**: 1032-1039.
- Dhodapkar, M.V., Krasovskiy, J. and Olson, K. (2002) T cells from the tumor microenvironment of patients with progressive myeloma can generate strong, tumor-specific cytolytic responses to autologous, tumor-loaded dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**: 13009-13013.
- Dighe, A.S., Richards, E., Old, L.J. and Schreiber, R.D. (1994) Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity.* **1**: 447-456.
- Domschke, C., Schutz, F., Ge, Y., Seibel, T., Sommerfeldt, N., Ehlert, K., Specht, S., Choi, C., Bucur, M., Sinn, P., Kühnle, M.-C., Momburg, F., Moldenhauer, G., Kastner, S., Schneeweis, A., Sohn, C., Schirmacher, V. and Beckhove, P. (2006) Systemic anti-tumor immune responses in

- primary breast cancer are shaped by local interferon-alpha and transforming growth factor-beta and correlate with prognosis. Submitted.
- Dong, C. (2006) Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat Rev Immunol.* **6**: 329-333.
  - Dudley, M.E. and Rosenberg, S.A. (2003) Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat Rev Cancer.* **3**: 666-675.
  - Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Yang, J.C., Hwu, P., Schwartzentruber, D.J., Topalian, S.L., *et al* (2002) A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *J Immunother.* **25**: 243-251.
  - Dunn, G.P., Old, L.J. and Schreiber, R.D. (2004) The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* **21**: 137-148.
  - Ehlert, K. (2005) Tumor-reaktive T-Zellen des Knochenmarks - neue Perspektiven für die adoptive Immuntherapie des metastasierten Mammakarzinoms. Dissertation.
  - Fallarino, F., Uyttenhove, C., Boon, T. and Gajewski, T.F. (1996) Endogenous IL-12 is necessary for rejection of P815 tumor variants in vivo. *J Immunol.* **156**: 1095-1100.
  - Fantini, M.C., Becker, C., Monteleone, G., Pallone, F., Galle, P.R. and Neurath, M.F. (2004) Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol.* **172**: 5149-5153.
  - Farrar, M.A. and Schreiber, R.D. (1993) The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol.* **11**: 571-611.
  - Faulkner, L., Buchan, G. and Baird, M. (2000) Interleukin-10 does not affect phagocytosis of particulate antigen by bone marrow-derived dendritic cells but does impair antigen presentation. *Immunology.* **99**: 523-531.
  - Fedele, G., Stefanelli, P., Spensieri, F., Fazio, C., Mastrantonio, P. and Ausiello, C.M. (2005) Bordetella pertussis-infected human monocyte-derived dendritic cells undergo maturation and induce Th1 polarization and interleukin-23 expression. *Infect Immun.* **73**: 1590-1597.
  - Feuerer, M., Eulenburg, K., Loddenkemper, C., Hamann, A. and Huehn, J. (2006) Self-limitation of Th1-mediated inflammation by IFN-gamma. *J Immunol.* **176**: 2857-2863.
  - Feuerer, M., Beckhove, P., Bai, L., Solomayer, E.F., Bastert, G., Diel, I.J., *et al* (2001) Therapy of human tumors in NOD/SCID mice with patient-derived reactivated memory T cells from bone marrow. *Nat Med.* **7**: 452-458.
  - Fiorentino, D.F., Bond, M.W. and Mosmann, T.R. (1989) Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med.* **170**: 2081-2095.
  - Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M. and O'Garra, A. (1991a) IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol.* **147**: 3815-3822.
  - Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T.R., Howard, M., Moore, K.W. and O'Garra, A. (1991b) IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol.* **146**: 3444-3451.
  - Fontenot, J.D., Gavin, M.A. and Rudensky, A.Y. (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* **4**: 330-336.
  - Fransen, L., Van der Heyden, J., Ruyschaert, R. and Fiers, W. (1986) Recombinant tumor necrosis factor: its effect and its synergism with interferon-gamma on a variety of normal and transformed human cell lines. *Eur J Cancer Clin Oncol.* **22**: 419-426.
  - Friedl, P. and Störöm, J. (2004) Diversity in immune-cell interactions: states and functions of the immunological synapse. *Trends Cell Biol.* **14**: 557-567.
  - Friedl, P., den Boer, A.T. and Gunzer, M. (2005) Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat Rev Immunol.* **5**: 532-545.
  - Gallegos, A.M. and Bevan, M.J. (2004) Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J Exp Med.* **200**: 1039-1049.
  - Gastman, B.R., Atarshi, Y., Reichert, T.E., Saito, T., Balkir, L., Rabinowich, H. and Whiteside, T.L. (1999) Fas ligand is expressed on human squamous cell carcinomas of the head and neck, and it promotes apoptosis of T lymphocytes. *Cancer Res.* **59**: 5356-5364.
  - Gazzinelli, R.T., Oswald, I.P., James, S.L. and Sher, A. (1992) IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J Immunol.* **148**: 1792-1796.
  - Geginat, J., Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (2001) Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. *J Exp Med.* **194**: 1711-1719.
  - Genestier, L., Kasibhatla, S., Brunner, T. and Green, D.R. (1999) Transforming growth factor beta1 inhibits Fas ligand expression and subsequent activation-induced cell death in T cells via downregulation of c-Myc. *J Exp Med.* **189**: 231-239.

- Gerber, J.S. and Mosser, D.M. (2001) Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc gamma receptors. *J Immunol.* **166**: 6861-6868.
- Glimcher, L.H. and Murphy, K.M. (2000) Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev.* **14**: 1693-1711.
- Goldman, S.A., Baker, E., Weyant, R.J., Clarke, M.R., Myers, J.N. and Lotze, M.T. (1998) Peritumoral CD1a-positive dendritic cells are associated with improved survival in patients with tongue carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* **124**: 641-646.
- Goldrath, A.W. and Bevan, M.J. (1999) Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature.* **402**: 255-262.
- Gong, J., Nikrui, N., Chen, D., Koido, S., Wu, Z., Tanaka, Y., *et al* (2000) Fusions of human ovarian carcinoma cells with autologous or allogeneic dendritic cells induce antitumor immunity. *J Immunol.* **165**: 1705-1711.
- Gorelik, L. and Flavell, R.A. (2000) Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity.* **12**: 171-181.
- Gorelik, L. and Flavell, R.A. (2002) Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol.* **2**: 46-53.
- Govinden, R. and Bhoola, K.D. (2003) Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther.* **98**: 257-265.
- Green, E.A., Gorelik, L., McGregor, C.M., Tran, E.H. and Flavell, R.A. (2003) CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**: 10878-10883.
- Gretz, J.E., Anderson, A.O. and Shaw, S. (1997) Cords, channels, corridors and conduits: critical architectural elements facilitating cell interactions in the lymph node cortex. *Immunol Rev.* **156**: 11-24.
- Gretz, J.E., Kaldjian, E.P., Anderson, A.O. and Shaw, S. (1996) Sophisticated strategies for information encounter in the lymph node: the reticular network as a conduit of soluble information and a highway for cell traffic. *J Immunol.* **157**: 495-499.
- Grunig, G., Corry, D.B., Leach, M.W., Seymour, B.W., Kurup, V.P. and Rennick, D.M. (1997) Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Exp Med.* **185**: 1089-1099.
- Guidotti, L.G. and Chisari, F.V. (2000) Cytokine-mediated control of viral infections. *Virology.* **273**: 221-227.
- Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L.E., *et al* (1996) Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science.* **274**: 1363-1366.
- Hammarlund, E., Lewis, M.W., Hansen, S.G., Strelow, L.I., Nelson, J.A., Sexton, G.J., *et al* (2003) Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat Med.* **9**: 1131-1137.
- Hammerling, G.J., Schonrich, G., Momburg, F., Auphan, N., Malissen, M., Malissen, B., *et al* (1991) Non-deletional mechanisms of peripheral and central tolerance: studies with transgenic mice with tissue-specific expression of a foreign MHC class I antigen. *Immunol Rev.* **122**: 47-67.
- Hansson, L., Rabbani, H., Fagerberg, J., Osterborg, A. and Mellstedt, H. (2003) T-cell epitopes within the complementarity-determining and framework regions of the tumor-derived immunoglobulin heavy chain in multiple myeloma. *Blood.* **101**: 4930-4936.
- Happel, K.I., Dubin, P.J., Zheng, M., Ghilardi, N., Lockhart, C., Quinton, L.J., *et al* (2005) Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J Exp Med.* **202**: 761-769.
- Haring, J.S., Badovinac, V.P. and Harty, J.T. (2006) Inflaming the CD8+ T cell response. *Immunity.* **25**: 19-29.
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M. and Weaver, C.T. (2005) Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. In *Nat Immunol*, pp. 1123-1132.
- Hartmann, E., Wollenberg, B., Rothenfusser, S., Wagner, M., Wellisch, D., Mack, B., *et al* (2003) Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res.* **63**: 6478-6487.
- Heimdal, J.H., Aarstad, H.J., Klementsens, B. and Olofsson, J. (1999) Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) responsiveness in patients with head and neck cancer in relation to tumour stage and prognosis. *Acta Otolaryngol.* **119**: 281-284.
- Hernberg, M., Turunen, J.P., Muhonen, T. and Pyrhonen, S. (1997) Tumor-infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma receiving chemoimmunotherapy. *J Immunother.* **20**: 488-495.

- Hernberg, M., Muhonen, T., Turunen, J.P., Hahka-Kemppinen, M. and Pyrhonen, S. (1996) The CD4+/CD8+ ratio as a prognostic factor in patients with metastatic melanoma receiving chemoimmunotherapy. *J Clin Oncol.* **14**: 1690-1696.
- Hoffmann, T.K., Dworacki, G., Tsukihira, T., Meidenbauer, N., Gooding, W., Johnson, J.T. and Whiteside, T.L. (2002) Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. *Clin Cancer Res.* **8**: 2553-2562.
- Hoffmann, T.K., Arsov, C., Schirlau, K., Bas, M., Friebe-Hoffmann, U., Klusmann, J.P., *et al* (2006) T cells specific for HPV16 E7 epitopes in patients with squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Int J Cancer.* **118**: 1984-1991.
- Hogquist, K.A., Baldwin, T.A. and Jameson, S.C. (2005) Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol.* **5**: 772-782.
- Hojo, M., Morimoto, T., Maluccio, M., Asano, T., Morimoto, K., Lagman, M., *et al* (1999) Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature.* **397**: 530-534.
- Homann, D., Teyton, L. and Oldstone, M.B. (2001) Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8+ but declining CD4+ T-cell memory. *Nat Med.* **7**: 913-919.
- Hortobagyi, G.N. and Perez, E.A. (2001) Integration of trastuzumab into adjuvant systemic therapy of breast cancer: ongoing and planned clinical trials. *Semin Oncol.* **28**: 41-46.
- Hunig, T. and Bevan, M.J. (1980) Specificity of cytotoxic T cells from athymic mice. *J Exp Med.* **152**: 688-702.
- Igarashi, T., Murakami, S., Takahashi, H., Matsuzaki, O. and Shimazaki, J. (1992) Changes on distribution of CD4+/CD45RA- and CD8+/CD11- cells in tumor-infiltrating lymphocytes of renal cell carcinoma associated with tumor progression. *Eur Urol.* **22**: 323-328.
- Inge, T.H., Hoover, S.K., Susskind, B.M., Barrett, S.K. and Bear, H.D. (1992) Inhibition of tumor-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by transforming growth factor beta 1. *Cancer Res.* **52**: 1386-1392.
- Ito, M., Shichijo, S., Tsuda, N., Ochi, M., Harashima, N., Saito, N. and Itoh, K. (2001) Molecular basis of T cell-mediated recognition of pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* **61**: 2038-2046.
- Ito, M., Minamiya, Y., Kawai, H., Saito, S., Saito, H., Nakagawa, T., *et al* (2006) Tumor-derived TGFbeta-1 induces dendritic cell apoptosis in the sentinel lymph node. *J Immunol.* **176**: 5637-5643.
- Iwakura, Y. and Ishigame, H. (2006) The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest.* **116**: 1218-1222.
- Jameson, S.C. (2002) Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol.* **2**: 547-556.
- Janji, B., Melchior, C., Gouon, V., Vallar, L. and Kieffer, N. (1999) Autocrine TGF-beta-regulated expression of adhesion receptors and integrin-linked kinase in HT-144 melanoma cells correlates with their metastatic phenotype. *Int J Cancer.* **83**: 255-262.
- Janssen, E.M., Lemmens, E.E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M.G. and Schoenberger, S.P. (2003) CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature.* **421**: 852-856.
- Judge, A.D., Zhang, X., Fujii, H., Surh, C.D. and Sprent, J. (2002) Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8(+) T cells. *J Exp Med.* **196**: 935-946.
- Kacani, L., Wurm, M., Schennach, H., Braun, I., Andrie, J. and Sprinzl, G.M. (2003) Immunosuppressive effects of soluble factors secreted by head and neck squamous cell carcinoma on dendritic cells and T lymphocytes. *Oral Oncol.* **39**: 672-679.
- Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K.J., *et al* (1994) Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature.* **369**: 31-37.
- Kalinski, P. and Moser, M. (2005) Consensual immunity: success-driven development of T-helper-1 and T-helper-2 responses. *Nat Rev Immunol.* **5**: 251-260.
- Kalinski, P., Hilkens, C.M., Wierenga, E.A. and Kapsenberg, M.L. (1999) T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today.* **20**: 561-567.
- Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J. and Schreiber, R.D. (1998) Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**: 7556-7561.
- Kapsenberg, M.L. (2003) Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol.* **3**: 984-993.
- Karcher, J., Reisser, C., Daniel, V. and Herold-Mende, C. (1999) [Cytokine expression of transforming growth factor-beta2 and interleukin-10 in squamous cell carcinomas of the head and neck. Comparison of tissue expression and serum levels]. *Hno.* **47**: 879-884.

- Karcher, J., Dyckhoff, G., Beckhove, P., Reisser, C., Brysch, M., Ziouta, Y., *et al* (2004) Antitumor vaccination in patients with head and neck squamous cell carcinomas with autologous virus-modified tumor cells. *Cancer Res.* **64**: 8057-8061.
- Katayama, A., Ogino, T., Bandoh, N., Nonaka, S. and Harabuchi, Y. (2005) Expression of CXCR4 and its down-regulation by IFN-gamma in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* **11**: 2937-2946.
- Kehrl, J.H., Wakefield, L.M., Roberts, A.B., Jakowlew, S., Alvarez-Mon, M., Derynck, R., *et al* (1986) Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med.* **163**: 1037-1050.
- Keilholz, U., Martus, P. and Scheibenbogen, C. (2006) Immune monitoring of T-cell responses in cancer vaccine development. *Clin Cancer Res.* **12**: 2346s-2352s.
- Khong, H.T. and Restifo, N.P. (2002) Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol.* **3**: 999-1005.
- Kiener, P.A., Moran-Davis, P., Rankin, B.M., Wahl, A.F., Aruffo, A. and Hollenbaugh, D. (1995) Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. *J Immunol.* **155**: 4917-4925.
- Kim, J.W., Ferris, R.L. and Whiteside, T.L. (2005a) Chemokine C receptor 7 expression and protection of circulating CD8+ T lymphocytes from apoptosis. *Clin Cancer Res.* **11**: 7901-7910.
- Kim, J.W., Wieckowski, E., Taylor, D.D., Reichert, T.E., Watkins, S. and Whiteside, T.L. (2005b) Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin Cancer Res.* **11**: 1010-1020.
- Kirkwood, J.M. and Tarhini, A.A. (2003) Adjuvant high-dose interferon-alpha therapy for high-risk melanoma. *Forum (Genova).* **13**: 127-140; quiz 187-128.
- Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R.M., Clark, S.C., Chan, S., *et al* (1989) Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med.* **170**: 827-845.
- Kobie, J.J., Wu, R.S., Kurt, R.A., Lou, S., Adelman, M.K., Whitesell, L.J., *et al* (2003) Transforming growth factor beta inhibits the antigen-presenting functions and antitumor activity of dendritic cell vaccines. *Cancer Res.* **63**: 1860-1864.
- Koch, F., Stanzl, U., Jennewein, P., Janke, K., Heufler, C., Kampgen, E., *et al* (1996) High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J Exp Med.* **184**: 741-746.
- Kolls, J.K. and Linden, A. (2004) Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* **21**: 467-476.
- Kullberg, M.C., Hay, V., Cheever, A.W., Mamura, M., Sher, A., Letterio, J.J., *et al* (2005) TGF-beta1 production by CD4+ CD25+ regulatory T cells is not essential for suppression of intestinal inflammation. *Eur J Immunol.* **35**: 2886-2895.
- Kuss, I., Donnenberg, A.D., Gooding, W. and Whiteside, T.L. (2003) Effector CD8+CD45RO-CD27-T cells have signalling defects in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer.* **88**: 223-230.
- Kuss, I., Hathaway, B., Ferris, R.L., Gooding, W. and Whiteside, T.L. (2004) 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.
- Kuss, I., Schaefer, C., Godfrey, T.E., Ferris, R.L., Harris, J.M., Gooding, W. and Whiteside, T.L. (2005) Recent thymic emigrants and subsets of naive and memory T cells in the circulation of patients with head and neck cancer. *Clin Immunol.* **116**: 27-36.
- Langowski, J.L., Zhang, X., Wu, L., Mattson, J.D., Chen, T., Smith, K., *et al* (2006) IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature.* **442**: 461-465.
- Langrish, C.L., McKenzie, B.S., Wilson, N.J., de Waal Malefyt, R., Kastelein, R.A. and Cua, D.J. (2004) IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol Rev.* **202**: 96-105.
- Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., *et al* (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* **201**: 233-240.
- Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2000) From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. *Curr Opin Immunol.* **12**: 92-98.
- Letsch, A., Keilholz, U., Assfalg, G., Mailander, V., Thiel, E. and Scheibenbogen, C. (2003) Bone marrow contains melanoma-reactive CD8+ effector T cells and, compared with peripheral blood, enriched numbers of melanoma-reactive CD8+ memory T cells. *Cancer Res.* **63**: 5582-5586.
- Letsch, A., Keilholz, U., Schadendorf, D., Nagorsen, D., Schmittel, A., Thiel, E. and Scheibenbogen, C. (2000) High frequencies of circulating melanoma-reactive CD8+ T cells in patients with advanced melanoma. *Int J Cancer.* **87**: 659-664.

- Levings, M.K. and Roncarolo, M.G. (2000) T-regulatory 1 cells: a novel subset of CD4 T cells with immunoregulatory properties. *J Allergy Clin Immunol.* **106**: S109-112.
- Li, M.O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.K. and Flavell, R.A. (2006) Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol.* **24**: 99-146.
- Lin, C.T., Chang, T.C., Shaw, S.W., Cheng, P.J., Huang, C.T., Chao, A., *et al* (2006) Maintenance of CD8 effector T cells by CD4 helper T cells eradicates growing tumors and promotes long-term tumor immunity. *Vaccine.* **24**: 6199-6207.
- Linnemeyer, P.A. and Pollack, S.B. (1993) Prostaglandin E2-induced changes in the phenotype, morphology, and lytic activity of IL-2-activated natural killer cells. *J Immunol.* **150**: 3747-3754.
- Liu, Y.J., Kanzler, H., Soumelis, V. and Gilliet, M. (2001) Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol.* **2**: 585-589.
- Liyanage, U.K., Moore, T.T., Joo, H.G., Tanaka, Y., Herrmann, V., Doherty, G., *et al* (2002) Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreatic or breast adenocarcinoma. *J Immunol.* **169**: 2756-2761.
- Macchetti, A.H., Marana, H.R., Silva, J.S., de Andrade, J.M., Ribeiro-Silva, A. and Bighetti, S. (2006) Tumor-infiltrating CD4+ T lymphocytes in early breast cancer reflect lymph node involvement. *Clinics.* **61**: 203-208.
- MacDonald, T.T. (1999) Effector and regulatory lymphoid cells and cytokines in mucosal sites. *Curr Top Microbiol Immunol.* **236**: 113-135.
- Maleckar, J.R. and Sherman, L.A. (1987) The composition of the T cell receptor repertoire in nude mice. *J Immunol.* **138**: 3873-3876.
- Maloy, K.J., Salaun, L., Cahill, R., Dougan, G., Saunders, N.J. and Powrie, F. (2003) CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med.* **197**: 111-119.
- Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., *et al* (2006) Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature.* **441**: 231-234.
- Mann, E.A., Spiro, J.D., Chen, L.L. and Kreutzer, D.L. (1992) Cytokine expression by head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Surg.* **164**: 567-573.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. and Sica, A. (2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* **23**: 549-555.
- Marincola, F.M., Jaffee, E.M., Hicklin, D.J. and Ferrone, S. (2000) Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol.* **74**: 181-273.
- Marzo, A.L., Kinnear, B.F., Lake, R.A., Frelinger, J.J., Collins, E.J., Robinson, B.W. and Scott, B. (2000) Tumor-specific CD4+ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity. *J Immunol.* **165**: 6047-6055.
- Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A.L. and Lefrancois, L. (2001) Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science.* **291**: 2413-2417.
- Massague, J. (1990) The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol.* **6**: 597-641.
- McCoy, J.L., Rucker, R. and Petros, J.A. (2000) Cell-mediated immunity to tumor-associated antigens is a better predictor of survival in early stage breast cancer than stage, grade or lymph node status. *Breast Cancer Res Treat.* **60**: 227-234.
- McGuirk, P., McCann, C. and Mills, K.H. (2002) Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by Bordetella pertussis. *J Exp Med.* **195**: 221-231.
- McKenzie, B.S., Kastelein, R.A. and Cua, D.J. (2006) Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol.* **27**: 17-23.
- McLean, A.R. and Michie, C.A. (1995) In vivo estimates of division and death rates of human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**: 3707-3711.
- Meissner, M., Reichert, T.E., Kunkel, M., Gooding, W., Whiteside, T.L., Ferrone, S. and Seliger, B. (2005) 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.
- Mempel, T.R., Pittet, M.J., Khazaie, K., Weninger, W., Weissleder, R., von Boehmer, H. and von Andrian, U.H. (2006) Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation. *Immunity.* **25**: 129-141.
- Michie, C.A., McLean, A., Alcock, C. and Beverley, P.C. (1992) Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature.* **360**: 264-265.

- Miller, M.J., Hejazi, A.S., Wei, S.H., Cahalan, M.D. and Parker, I. (2004) T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**: 998-1003.
- Mire-Sluis, A.R. and Thorpe, R. (1998) Laboratory protocols for the quantitation of cytokines by bioassay using cytokine responsive cell lines. *J Immunol Methods*. **211**: 199-210.
- Mocellin, S., Wang, E. and Marincola, F.M. (2001) Cytokines and immune response in the tumor microenvironment. *J Immunother*. **24**: 392-407.
- Montoya, M., Schiavoni, G., Mattei, F., Gresser, I., Belardelli, F., Borrow, P. and Tough, D.F. (2002) Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood*. **99**: 3263-3271.
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L. and O'Garra, A. (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. **19**: 683-765.
- Moore, M.A. (1991) The clinical use of colony stimulating factors. *Annu Rev Immunol*. **9**: 159-191.
- Morris, S.C., Madden, K.B., Adamovicz, J.J., Gause, W.C., Hubbard, B.R., Gately, M.K. and Finkelman, F.D. (1994) Effects of IL-12 on in vivo cytokine gene expression and Ig isotype selection. *J Immunol*. **152**: 1047-1056.
- Mortarini, R., Borri, A., Tragni, G., Bersani, I., Vegetti, C., Bajetta, E., *et al* (2000) Peripheral burst of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes and infiltration of metastatic lesions by memory CD8+ T cells in melanoma patients receiving interleukin 12. *Cancer Res*. **60**: 3559-3568.
- Mortarini, R., Piris, A., Maurichi, A., Molla, A., Bersani, I., Bono, A., *et al* (2003) Lack of terminally differentiated tumor-specific CD8+ T cells at tumor site in spite of antitumor immunity to self-antigens in human metastatic melanoma. *Cancer Res*. **63**: 2535-2545.
- Moser, M. and Murphy, K.M. (2000) Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol*. **1**: 199-205.
- Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. **7**: 145-173.
- Mosmann, T.R. and Sad, S. (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*. **17**: 138-146.
- Muller-Berghaus, J., Ehler, K., Ugurel, S., Umansky, V., Bucur, M., Schirmacher, V., *et al* (2006) Melanoma-reactive T cells in the bone marrow of melanoma patients: association with disease stage and disease duration. *Cancer Res*. **66**: 5997-6001.
- Mumberg, D., Monach, P.A., Wanderling, S., Philip, M., Toledano, A.Y., Schreiber, R.D. and Schreiber, H. (1999) CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**: 8633-8638.
- Murali-Krishna, K., Lau, L.L., Sambhara, S., Lemonnier, F., Altman, J. and Ahmed, R. (1999) Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science*. **286**: 1377-1381.
- Murali-Krishna, K., Altman, J.D., Suresh, M., Sourdive, D.J., Zajac, A.J., Miller, J.D., *et al* (1998) Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity*. **8**: 177-187.
- Murray, H.W., Spitalny, G.L. and Nathan, C.F. (1985) Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma. *J Immunol*. **134**: 1619-1622.
- Nagorsen, D., Keilholz, U., Rivoltini, L., Schmittel, A., Letsch, A., Asemisen, A.M., *et al* (2000) Natural T-cell response against MHC class I epitopes of epithelial cell adhesion molecule, her-2/neu, and carcinoembryonic antigen in patients with colorectal cancer. *Cancer Res*. **60**: 4850-4854.
- Naito, Y., Saito, K., Shiiba, K., Ohuchi, A., Saigenji, K., Nagura, H. and Ohtani, H. (1998) CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res*. **58**: 3491-3494.
- Nakae, S., Saijo, S., Horai, R., Sudo, K., Mori, S. and Iwakura, Y. (2003) IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**: 5986-5990.
- Nakamura, M., Katano, M., Kuwahara, A., Fujimoto, K., Miyazaki, K., Morisaki, T. and Mori, M. (1998) Transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) is a preoperative prognostic indicator in advanced gastric carcinoma. *Br J Cancer*. **78**: 1373-1378.
- Nakano, O., Sato, M., Naito, Y., Suzuki, K., Orikasa, S., Aizawa, M., *et al* (2001) Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res*. **61**: 5132-5136.
- Numasaki, M., Watanabe, M., Suzuki, T., Takahashi, H., Nakamura, A., McAllister, F., *et al* (2005) IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *J Immunol*. **175**: 6177-6189.

- O'Connell, J., Bennett, M.W., Nally, K., O'Sullivan, G.C., Collins, J.K. and Shanahan, F. (2000) Interferon-gamma sensitizes colonic epithelial cell lines to physiological and therapeutic inducers of colonocyte apoptosis. *J Cell Physiol.* **185**: 331-338.
- O'Garra, A. and Arai, N. (2000) The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol.* **10**: 542-550.
- O'Garra, A., Vieira, P.L., Vieira, P. and Goldfeld, A.E. (2004) IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *J Clin Invest.* **114**: 1372-1378.
- Old, L.J. and Chen, Y.T. (1998) New paths in human cancer serology. *J Exp Med.* **187**: 1163-1167.
- Onishi, T., Ohishi, Y., Goto, H., Tomita, M. and Abe, K. (2001) An assessment of the immunological status of patients with renal cell carcinoma based on the relative abundance of T-helper 1- and -2 cytokine-producing CD4+ cells in peripheral blood. *BJU Int.* **87**: 755-759.
- Ormandy, L.A., Hillemann, T., Wedemeyer, H., Manns, M.P., Greten, T.F. and Korangy, F. (2005) Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **65**: 2457-2464.
- Ossina, N.K., Cannas, A., Powers, V.C., Fitzpatrick, P.A., Knight, J.D., Gilbert, J.R., *et al* (1997) Interferon-gamma modulates a p53-independent apoptotic pathway and apoptosis-related gene expression. *J Biol Chem.* **272**: 16351-16357.
- Ostrand-Rosenberg, S. (2005) CD4+ T lymphocytes: a critical component of antitumor immunity. *Cancer Invest.* **23**: 413-419.
- Ostrand-Rosenberg, S., Grusby, M.J. and Clements, V.K. (2000) Cutting edge: STAT6-deficient mice have enhanced tumor immunity to primary and metastatic mammary carcinoma. *J Immunol.* **165**: 6015-6019.
- Pak, A.S., Wright, M.A., Matthews, J.P., Collins, S.L., Petruzzelli, G.J. and Young, M.R. (1995) Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34(+) cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res.* **1**: 95-103.
- Paleri, V., Pulimood, A., Davies, G.R. and Birchall, M.A. (2001) Interleukins 7 and 12 are expressed in head and neck squamous cancer. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* **26**: 302-306.
- Palmer, E. (2003) Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol.* **3**: 383-391.
- Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., *et al* (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* **6**: 1133-1141.
- Parkhurst, M.R., Salgaller, M.L., Southwood, S., Robbins, P.F., Sette, A., Rosenberg, S.A. and Kawakami, Y. (1996) Improved induction of melanoma-reactive CTL with peptides from the melanoma antigen gp100 modified at HLA-A\*0201-binding residues. *J Immunol.* **157**: 2539-2548.
- Peguet-Navarro, J., Dalbiez-Gauthier, C., Rattis, F.M., Van Kooten, C., Banchereau, J. and Schmitt, D. (1995) Functional expression of CD40 antigen on human epidermal Langerhans cells. *J Immunol.* **155**: 4241-4247.
- Peiper, M., Sato, T., Streichert, T., Eisenberger, C.F., Knoefel, W.T. and Izbicki, J.R. (2002) Cytotoxic T lymphocyte mediated recognition of human pancreatic cancer cells. *Int J Cancer.* **99**: 88-92.
- Peng, Y., Laouar, Y., Li, M.O., Green, E.A. and Flavell, R.A. (2004) TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**: 4572-4577.
- Peng, Y., Gorelik, L., Laouar, Y., Li, M.O. and Flavell, R.A. (2006) TGFbeta-mediated immunoregulation. *Ernst Schering Res Found Workshop*: 155-160.
- Petersson, M., Charo, J., Salazar-Onfray, F., Noffz, G., Mohaupt, M., Qin, Z., *et al* (1998) Constitutive IL-10 production accounts for the high NK sensitivity, low MHC class I expression, and poor transporter associated with antigen processing (TAP)-1/2 function in the prototype NK target YAC-1. *J Immunol.* **161**: 2099-2105.
- Pries, R. and Wollenberg, B. (2006) Cytokines in head and neck cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **17**: 141-146.
- Pries, R., Thiel, A., Brocks, C. and Wollenberg, B. (2006) Secretion of tumor-promoting and immune suppressive cytokines by cell lines of head and neck squamous cell carcinoma. *In Vivo.* **20**: 45-48.
- Propper, D.J., Chao, D., Braybrooke, J.P., Bahl, P., Thavasu, P., Balkwill, F., *et al* (2003) Low-dose IFN-gamma induces tumor MHC expression in metastatic malignant melanoma. *Clin Cancer Res.* **9**: 84-92.
- Pulendran, B., Palucka, K. and Banchereau, J. (2001) Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science.* **293**: 253-256.

- Pulendran, B., Smith, J.L., Caspary, G., Brasel, K., Pettit, D., Maraskovsky, E. and Maliszewski, C.R. (1999) Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**: 1036-1041.
- Qin, Z. and Blankenstein, T. (2000) CD4<sup>+</sup> T cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity*. **12**: 677-686.
- Qin, Z., Richter, G., Schuler, T., Ibe, S., Cao, X. and Blankenstein, T. (1998) B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. *Nat Med*. **4**: 627-630.
- Radoja, S. and Frey, A.B. (2000) Cancer-induced defective cytotoxic T lymphocyte effector function: another mechanism how antigenic tumors escape immune-mediated killing. *Mol Med*. **6**: 465-479.
- Radoja, S., Saio, M., Schaer, D., Koneru, M., Vukmanovic, S. and Frey, A.B. (2001) CD8(+) tumor-infiltrating T cells are deficient in perforin-mediated cytolytic activity due to defective microtubule-organizing center mobilization and lytic granule exocytosis. *J Immunol*. **167**: 5042-5051.
- Ranges, G.E., Figari, I.S., Espevik, T. and Palladino, M.A., Jr. (1987) Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. **166**: 991-998.
- Ravitz, M.J. and Wenner, C.E. (1997) Cyclin-dependent kinase regulation during G1 phase and cell cycle regulation by TGF-beta. *Adv Cancer Res*. **71**: 165-207.
- Read, S., Malmstrom, V. and Powrie, F. (2000) Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med*. **192**: 295-302.
- Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., Thery, C., Rescigno, M., et al (1999) Fc gamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med*. **189**: 371-380.
- Reichert, T.E., Rabinowich, H., Johnson, J.T. and Whiteside, T.L. (1998) Mechanisms responsible for signaling and functional defects. *J Immunother*. **21**: 295-306.
- Reichert, T.E., Scheuer, C., Day, R., Wagner, W. and Whiteside, T.L. (2001) The number of intratumoral dendritic cells and zeta-chain expression in T cells as prognostic and survival biomarkers in patients with oral carcinoma. *Cancer*. **91**: 2136-2147.
- Reinhardt, R.L., Khoruts, A., Merica, R., Zell, T. and Jenkins, M.K. (2001) Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature*. **410**: 101-105.
- Restifo, N.P., Ying, H., Hwang, L. and Leitner, W.W. (2000) The promise of nucleic acid vaccines. *Gene Ther*. **7**: 89-92.
- Rissoan, M.C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R. and Liu, Y.J. (1999) Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science*. **283**: 1183-1186.
- Romagnani, S. (1999) Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis*. **5**: 285-294.
- Rosenberg, S.A. (2001) Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature*. **411**: 380-384.
- Rosenberg, S.A., Zhai, Y., Yang, J.C., Schwartzentruber, D.J., Hwu, P., Marincola, F.M., et al (1998) Immunizing patients with metastatic melanoma using recombinant adenoviruses encoding MART-1 or gp100 melanoma antigens. *J Natl Cancer Inst*. **90**: 1894-1900.
- Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Schwartzentruber, D.J., Hwu, P., Marincola, F.M., Topalian, S.L., et al (1999) Impact of cytokine administration on the generation of antitumor reactivity in patients with metastatic melanoma receiving a peptide vaccine. *J Immunol*. **163**: 1690-1695.
- Rudolph, M.G. and Wilson, I.A. (2002) The specificity of TCR/pMHC interaction. *Curr Opin Immunol*. **14**: 52-65.
- Sakaguchi, S. (2000) Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*. **101**: 455-458.
- Sakaguchi, S. (2004) Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. **22**: 531-562.
- Sakaguchi, S. (2005) Naturally arising Foxp3-expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*. **6**: 345-352.
- Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (1994) Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. **179**: 1109-1118.
- Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. and Lanzavecchia, A. (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. **401**: 708-712.

- Samara, G.J., Lawrence, D.M., Chiarelli, C.J., Valentino, M.D., Lyubsky, S., Zucker, S. and Vaday, G.G. (2004) CXCR4-mediated adhesion and MMP-9 secretion in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* **214**: 231-241.
- Sato, E., Olson, S.H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., *et al* (2005) 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.
- Schaefer, C., Kim, G.G., Albers, A., Hoermann, K., Myers, E.N. and Whiteside, T.L. (2005) Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *Br J Cancer.* **92**: 913-920.
- Schiott, A., Widegren, B., Sjogren, H.O. and Lindvall, M. (1999) Transforming growth factor-beta1, a strong costimulator of rat T-cell activation promoting a shift towards a Th2-like cytokine profile. *Immunol Lett.* **67**: 131-139.
- Schirmacher, V., Schild, H.J., Guckel, B. and von Hoegen, P. (1993) Tumour-specific CTL response requiring interactions of four different cell types and recognition of MHC class I and class II restricted tumour antigens. *Immunol Cell Biol.* **71 ( Pt 4)**: 311-326.
- Schirmacher, V., Feuerer, M., Fournier, P., Ahlert, T., Umansky, V. and Beckhove, P. (2003) T-cell priming in bone marrow: the potential for long-lasting protective anti-tumor immunity. *Trends Mol Med.* **9**: 526-534.
- Schlienger, K., Craighead, N., Lee, K.P., Levine, B.L. and June, C.H. (2000) Efficient priming of protein antigen-specific human CD4(+) T cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* **96**: 3490-3498.
- Schmitz-Winnenthal, F.H., Volk, C., Z'Graggen, K., Galindo, L., Nummer, D., Ziouta, Y., *et al* (2005) High frequencies of functional tumor-reactive T cells in bone marrow and blood of pancreatic cancer patients. *Cancer Res.* **65**: 10079-10087.
- Schumacher, K., Haensch, W., Roefzaad, C. and Schlag, P.M. (2001) Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res.* **61**: 3932-3936.
- Seddon, B., Tomlinson, P. and Zamoyska, R. (2003) Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat Immunol.* **4**: 680-686.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J. and Schreiber, R.D. (2001) IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* **410**: 1107-1111.
- Shen, F., Ruddy, M.J., Plamondon, P. and Gaffen, S.L. (2005) Cytokines link osteoblasts and inflammation: microarray analysis of interleukin-17- and TNF-alpha-induced genes in bone cells. *J Leukoc Biol.* **77**: 388-399.
- Sheu, B.C., Hsu, S.M., Ho, H.N., Lin, R.H., Torng, P.L. and Huang, S.C. (1999) Reversed CD4/CD8 ratios of tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with the progression of human cervical carcinoma. *Cancer.* **86**: 1537-1543.
- Sheu, B.C., Lin, R.H., Lien, H.C., Ho, H.N., Hsu, S.M. and Huang, S.C. (2001) Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. *J Immunol.* **167**: 2972-2978.
- Shevach, E.M. (2002) CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol.* **2**: 389-400.
- Shevach, E.M. (2004) Fatal attraction: tumors beckon regulatory T cells. *Nat Med.* **10**: 900-901.
- Shim, K.S., Kim, K.H., Han, W.S. and Park, E.B. (1999) Elevated serum levels of transforming growth factor-beta1 in patients with colorectal carcinoma: its association with tumor progression and its significant decrease after curative surgical resection. *Cancer.* **85**: 554-561.
- Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y. and Sakaguchi, S. (2002) Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol.* **3**: 135-142.
- Shurin, M.R., Lu, L., Kalinski, P., Stewart-Akers, A.M. and Lotze, M.T. (1999) Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy. *Springer Semin Immunopathol.* **21**: 339-359.
- Skok, J., Poudrier, J. and Gray, D. (1999) Dendritic cell-derived IL-12 promotes B cell induction of Th2 differentiation: a feedback regulation of Th1 development. *J Immunol.* **163**: 4284-4291.
- Smith, C.W., Chen, Z., Dong, G., Loukinova, E., Pegram, M.Y., Nicholas-Figueroa, L. and Van Waes, C. (1998) The host environment promotes the development of primary and metastatic squamous cell carcinomas that constitutively express proinflammatory cytokines IL-1 $\alpha$ , IL-6, GM-CSF, and KC. *Clin Exp Metastasis.* **16**: 655-664.
- Smith, K.A. (1988) Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science.* **240**: 1169-1176.
- Smyth, M.J., Dunn, G.P. and Schreiber, R.D. (2006) Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol.* **90**: 1-50.

- Smyth, M.J., Strobl, S.L., Young, H.A., Ortaldo, J.R. and Ochoa, A.C. (1991) Regulation of lymphokine-activated killer activity and pore-forming protein gene expression in human peripheral blood CD8+ T lymphocytes. Inhibition by transforming growth factor-beta. *J Immunol.* **146**: 3289-3297.
- Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E., MacGregor, D., Godfrey, D.I. and Trapani, J.A. (2000a) Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med.* **192**: 755-760.
- Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E., Cretney, E., Trapani, J.A., Taniguchi, M., *et al* (2000b) Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med.* **191**: 661-668.
- Sommerfeldt, N., Schutz, F., Sohn, C., Forster, J., Schirmacher, V. and Beckhove, P. (2006) The shaping of a polyvalent and highly individual T-cell repertoire in the bone marrow of breast cancer patients. *Cancer Res.* **66**: 8258-8265.
- Sparano, A., Lathers, D.M., Achille, N., Petruzzelli, G.J. and Young, M.R. (2004) Modulation of Th1 and Th2 cytokine profiles and their association with advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* **131**: 573-576.
- Sprent, J. (2003) Turnover of memory-phenotype CD8+ T cells. *Microbes Infect.* **5**: 227-231.
- Steiner, H.H., Bonsanto, M.M., Beckhove, P., Brysch, M., Geletneky, K., Ahmadi, R., *et al* (2004) Antitumor vaccination of patients with glioblastoma multiforme: a pilot study to assess feasibility, safety, and clinical benefit. *J Clin Oncol.* **22**: 4272-4281.
- Steinman, R.M. and Dhodapkar, M. (2001) Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future. *Int J Cancer.* **94**: 459-473.
- Stetson, D.B., Voehringer, D., Grogan, J.L., Xu, M., Reinhardt, R.L., Scheu, S., *et al* (2004) Th2 cells: orchestrating barrier immunity. *Adv Immunol.* **83**: 163-189.
- Stutman, O. (1974) Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science.* **183**: 534-536.
- Stutman, O. (1979a) Chemical carcinogenesis in nude mice: comparison between nude mice from homozygous matings and heterozygous matings and effect of age and carcinogen dose. *J Natl Cancer Inst.* **62**: 353-358.
- Stutman, O. (1979b) Spontaneous tumors in nude mice: effect of the viable yellow gene. *Exp Cell Biol.* **47**: 129-135.
- Suto, R. and Srivastava, P.K. (1995) A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science.* **269**: 1585-1588.
- Suzuki, N., Maeda, Y., Tanaka, S., Hida, N., Mine, T., Yamamoto, K., *et al* (2002) Detection of peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte precursors used for specific immunotherapy of pancreatic cancer. *Int J Cancer.* **98**: 45-50.
- Swain, S.L., Hu, H. and Huston, G. (1999) Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science.* **286**: 1381-1383.
- Szabo, S.J., Sullivan, B.M., Peng, S.L. and Glimcher, L.H. (2003) Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol.* **21**: 713-758.
- Tan, J.T., Ernst, B., Kieper, W.C., LeRoy, E., Sprent, J. and Surh, C.D. (2002) Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells. *J Exp Med.* **195**: 1523-1532.
- Tartour, E., Fossiez, F., Joyeux, I., Galinha, A., Gey, A., Claret, E., *et al* (1999) Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer Res.* **59**: 3698-3704.
- Tatsumi, T., Kierstead, L.S., Ranieri, E., Gesualdo, L., Schena, F.P., Finke, J.H., *et al* (2002) Disease-associated bias in T helper type 1 (Th1)/Th2 CD4(+) T cell responses against MAGE-6 in HLA-DRB10401(+) patients with renal cell carcinoma or melanoma. *J Exp Med.* **196**: 619-628.
- Terabe, M., Matsui, S., Noben-Trauth, N., Chen, H., Watson, C., Donaldson, D.D., *et al* (2000) NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol.* **1**: 515-520.
- Theofilopoulos, A.N., Baccala, R., Beutler, B. and Kono, D.H. (2005) Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol.* **23**: 307-336.
- Thery, C. and Amigorena, S. (2001) The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* **13**: 45-51.
- Thomas, D.A. and Massague, J. (2005) TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell.* **8**: 369-380.
- Tisch, M., Heimlich, F., Daniel, V., Opelz, G. and Maier, H. (1998) Cellular immune defect caused by postsurgical radiation therapy in patients with head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* **119**: 412-417.
- Trautmann, A. and Valitutti, S. (2003) The diversity of immunological synapses. *Curr Opin Immunol.* **15**: 249-254.

- Trinchieri, G. (2001) Regulatory role of T cells producing both interferon gamma and interleukin 10 in persistent infection. *J Exp Med.* **194**: F53-57.
- Trinchieri, G. (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* **3**: 133-146.
- Trinchieri, G., Wysocka, M., D'Andrea, A., Rengaraju, M., Aste-Amezaga, M., Kubin, M., *et al* (1992) Natural killer cell stimulatory factor (NKSF) or interleukin-12 is a key regulator of immune response and inflammation. *Prog Growth Factor Res.* **4**: 355-368.
- Truelson, J.M., Fisher, S.G., Beals, T.E., McClatchey, K.D. and Wolf, G.T. (1992) DNA content and histologic growth pattern correlate with prognosis in patients with advanced squamous cell carcinoma of the larynx. The Department of Veterans Affairs Cooperative Laryngeal Cancer Study Group. *Cancer.* **70**: 56-62.
- Tsukishiro, T., Donnenberg, A.D. and Whiteside, T.L. (2003) Rapid turnover of the CD8(+)CD28(-) T-cell subset of effector cells in the circulation of patients with head and neck cancer. *Cancer Immunol Immunother.* **52**: 599-607.
- Tuma, R.A. and Pamer, E.G. (2002) Homeostasis of naive, effector and memory CD8 T cells. *Curr Opin Immunol.* **14**: 348-353.
- Ueno, T., Saito, F., Gray, D.H., Kuse, S., Hieshima, K., Nakano, H., *et al* (2004) CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med.* **200**: 493-505.
- van den Broek, M.E., Kagi, D., Ossendorp, F., Toes, R., Vamvakas, S., Lutz, W.K., *et al* (1996) Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med.* **184**: 1781-1790.
- Van Parijs, L. and Abbas, A.K. (1998) Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science.* **280**: 243-248.
- Vasilijic, S., Savic, D., Vasilev, S., Vucevic, D., Gasic, S., Majstorovic, I., *et al* (2005) Dendritic cells acquire tolerogenic properties at the site of sterile granulomatous inflammation. *Cell Immunol.* **233**: 148-157.
- Veiga-Fernandes, H., Walter, U., Bourgeois, C., McLean, A. and Rocha, B. (2000) Response of naive and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nat Immunol.* **1**: 47-53.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M. and Stockinger, B. (2006) TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* **24**: 179-189.
- von Andrian, U.H. and Mackay, C.R. (2000) T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med.* **343**: 1020-1034.
- Wahl, S.M., Wen, J. and Moutsopoulos, N. (2006) TGF-beta: a mobile purveyor of immune privilege. *Immunol Rev.* **213**: 213-227.
- Wakabayashi, O., Yamazaki, K., Oizumi, S., Hommura, F., Kinoshita, I., Ogura, S., *et al* (2003) CD4+ T cells in cancer stroma, not CD8+ T cells in cancer cell nests, are associated with favorable prognosis in human non-small cell lung cancers. *Cancer Sci.* **94**: 1003-1009.
- Wang, H.Y., Lee, D.A., Peng, G., Guo, Z., Li, Y., Kiniwa, Y., *et al* (2004) Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy. *Immunity.* **20**: 107-118.
- Wang, R.F. (2003) Identification of MHC class II-restricted tumor antigens recognized by CD4+ T cells. *Methods.* **29**: 227-235.
- Wang, Z.E., Zheng, S., Corry, D.B., Dalton, D.K., Seder, R.A., Reiner, S.L. and Locksley, R.M. (1994) Interferon gamma-independent effects of interleukin 12 administered during acute or established infection due to *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**: 12932-12936.
- Watanabe, N., Wang, Y.H., Lee, H.K., Ito, T., Wang, Y.H., Cao, W. and Liu, Y.J. (2005) Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature.* **436**: 1181-1185.
- Watford, W.T., Hissong, B.D., Bream, J.H., Kanno, Y., Muul, L. and O'Shea, J.J. (2004) Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunol Rev.* **202**: 139-156.
- Weaver, C.T., Harrington, L.E., Mangan, P.R., Gavioli, M. and Murphy, K.M. (2006) Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity.* **24**: 677-688.
- Westermann, J., Ehlers, E.M., Exton, M.S., Kaiser, M. and Bode, U. (2001) Migration of naive, effector and memory T cells: implications for the regulation of immune responses. *Immunol Rev.* **184**: 20-37.
- Whiteside, T.L. (2002) Apoptosis of immune cells in the tumor microenvironment and peripheral circulation of patients with cancer: implications for immunotherapy. *Vaccine.* **20 Suppl 4**: A46-51.
- Whiteside, T.L. (2005) Immunobiology of head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **24**: 95-105.
- Windbichler, G.H., Hausmaninger, H., Stummvoll, W., Graf, A.H., Kainz, C., Lahodny, J., *et al* (2000) Interferon-gamma in the first-line therapy of ovarian cancer: a randomized phase III trial. *Br J Cancer.* **82**: 1138-1144.

- Wodarz, D., May, R.M. and Nowak, M.A. (2000) The role of antigen-independent persistence of memory cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol.* **12**: 467-477.
- Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Thery, C., Masurier, C., *et al* (2001) Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med.* **7**: 297-303.
- Woo, E.Y., Chu, C.S., Goletz, T.J., Schlienger, K., Yeh, H., Coukos, G., *et al* (2001) Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res.* **61**: 4766-4772.
- Yao, Z., Fanslow, W.C., Seldin, M.F., Rousseau, A.M., Painter, S.L., Comeau, M.R., *et al* (1995) Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity.* **3**: 811-821.
- Yee, C., Thompson, J.A., Byrd, D., Riddell, S.R., Roche, P., Celis, E. and Greenberg, P.D. (2002) Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**: 16168-16173.
- Yoshino, I., Yano, T., Murata, M., Miyamoto, M., Ishida, T., Sugimachi, K., *et al* (1993) Phenotypes of lymphocytes infiltrating non-small cell lung cancer tissues and its variation with histological types of cancer. *Lung Cancer.* **10**: 13-19.
- Yu, J., Wei, M., Becknell, B., Trotta, R., Liu, S., Boyd, Z., *et al* (2006) Pro- and antiinflammatory cytokine signaling: reciprocal antagonism regulates interferon-gamma production by human natural killer cells. *Immunity.* **24**: 575-590.
- Yu, P. and Fu, Y.X. (2006) Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Lab Invest.* **86**: 231-245.
- Yu, P., Spiotto, M.T., Lee, Y., Schreiber, H. and Fu, Y.X. (2003) Complementary role of CD4+ T cells and secondary lymphoid tissues for cross-presentation of tumor antigen to CD8+ T cells. *J Exp Med.* **197**: 985-995.
- Yu, P., Lee, Y., Liu, W., Krausz, T., Chong, A., Schreiber, H. and Fu, Y.X. (2005) Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *J Exp Med.* **201**: 779-791.
- Yue, F.Y., Dummer, R., Geertsen, R., Hofbauer, G., Laine, E., Manolio, S. and Burg, G. (1997) Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *Int J Cancer.* **71**: 630-637.
- Zanussi, S., Vaccher, E., Caffau, C., Pratesi, C., Crepaldi, C., Bortolin, M.T., *et al* (2003) Interferon-gamma secretion and perforin expression are impaired in CD8+ T lymphocytes from patients with undifferentiated carcinoma of nasopharyngeal type. *Cancer Immunol Immunother.* **52**: 28-32.
- Zhan, Y., Purton, J.F., Godfrey, D.I., Cole, T.J., Heath, W.R. and Lew, A.M. (2003) Without peripheral interference, thymic deletion is mediated in a cohort of double-positive cells without classical activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**: 1197-1202.
- Zhang, S. and Kaplan, M.H. (2000) The p38 mitogen-activated protein kinase is required for IL-12-induced IFN-gamma expression. *J Immunol.* **165**: 1374-1380.
- Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D.F. and Sprent, J. (1998) Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity.* **8**: 591-599.
- Zhou, G., Lu, Z., McCadden, J.D., Levitsky, H.I. and Marson, A.L. (2004) Reciprocal changes in tumor antigenicity and antigen-specific T cell function during tumor progression. *J Exp Med.* **200**: 1581-1592.
- Ziouta, Y. (2003) Untersuchungen zum tumorspezifischen immunologischen Gedächtnis bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren. Diplomarbeit.
- Zinkernagel, R.M. (2002) On differences between immunity and immunological memory. *Curr Opin Immunol.* **14**: 523-536.
- Zinkernagel, R.M., Bachmann, M.F., Kundig, T.M., Oehen, S., Pirchet, H. and Hengartner, H. (1996) On immunological memory. *Annu Rev Immunol.* **14**: 333-367.
- Zippelius, A., Batard, P., Rubio-Godoy, V., Bioley, G., Lienard, D., Lejeune, F., *et al* (2004) Effector function of human tumor-specific CD8 T cells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance. *Cancer Res.* **64**: 2865-2873.

## 7. Anhang

### 7.1 Klinische Charakteristika der untersuchten Kopf-Hals-Tumorpatienten

Patienten-identifikation	IFN-γ Tumor-reaktivität	Alter September '06	Geschlecht	Lokalisation	Stadium	TNM Klassifizierung	Differenzierungsgrad	Rezidiv	Progression-freies Intervall September '06	Überleben September '06
225	nein	53	m	HYP	IVA	T4N2bM0	3	ja	5	16
226	nein	57	m	ORO	IVA	T4N2bM0	3	nein	63	63
228	nein	57	m	ORO/HYP	IVA	T3N2cM0	3	ja	26	31
230	nein	40	m	NAS	IVA	T4N0M0	2	ja	19	18
231	nein	66	m	ORO	IVA	T4N2bM0	1	nein	61	61
235	ja	66	m	ORO	IVA	T4N2bM0	3	nein	58	58
236	nein	48	m	CUP	IVA	TxN2bM0	3			
238	nein	72	m	LAR	IVA	T4N0M0	3	nein	55	55
239	ja	66	m	LAR	II	T2N0M0	3		8	8
240	nein	60	m	ORO	IVA	T3N2cM0	2	ja	32	40
241	nein	56	m	LAR	IVA	T4N0M0	3	nein	54	54
242	nein	41	m	ORO	I	T1N0Mx	2	nein	54	54
244	nein	58	m	HYP	IVA	T4N2bM0	3	ja	10	10
253	nein	56	m	LAR	IVA	T4N2bM0	3	ja	6	6
256	ja	70	m	LAR	IVA	T4N2cMx	3	nein	10	10
267	nein	47	w	ORO	IVA	T2N2bM0	2	nein	47	47
268	nein	63	w	ORO	II	T2N0M0	2	ja	32	34
269	nein	68	w	CUP	IVA	TxN2bM0	3	nein	46	46
271	ja	65	m	ORO	IVA	T1N2bM0	2	nein	46	46
272	ja	68	m	ORO	IVA	T2N2bM0	3	nein	44	44
273	ja	61	m	HYP	III	T2N1M0	2	ja	13	17
274	nein	54	m	ORO	IVA	T2N2bM0	2	nein	44	44
275	nein	55		ORO		T4N2cM0				
276	ja	55	w	HYP	IVA	T1N2aM0	3	nein	43	43
277	ja	64	m	LAR	IVA	T4aN2cM0	3	ja	3	8
278	ja	58	w	ORO	III	T3N0M0	3	nein	42	42
279	nein	45	m	HYP	IVA	T1aN2b	2	nein	42	42
280	ja	63	w	HYP	III	T3N0M0	3	ja	14	41
281	nein	59	m	ORO	IVA	T1N2aM0	2	nein	42	42
282	nein	61	m	MUH	I	T1N0M0	2	ja	9	39
284	ja	50	m	LAR	III	T3pN0M0	3	nein	38	38
286	nein	41	m	HYP	IVA	T3N2bM0	3	ja	3	
289	nein	72	m	LAR	III	T3N0M0	3	ja	20	36
290	nein	73	m	LAR	III	T3N0M0	3	nein	36	36
291	nein	57	w	LAR	IVA	T4aN2cM0	2	nein	36	36
293	nein	44	m	MUH	III	T2N1M0	3	nein	36	36
294	nein	49	m	HYP	IVA	T4aN2bM0	3	ja	10	
295	nein	42	m	HYP	IVA	T4aN2bM0	3	ja	19	23
298	ja	53	m	HYP	IVB	T1N3M0	3	ja	6	32
301	nein	53	m	ORO	IVB	T2N3M0	3	nein	8	8
304	nein	59	m	ORO	IVA	T1N2bM0	3	nein	30	30
305	nein	62	m	ORO/HYP	IVA	T2N2cM0	3	nein	29	29
306	nein									
307	nein	70	m	HYP	IVA	T2N2bM0		ja	11	28
308	nein	53	m	ORO	IVA	T1N1M0		nein	26	26
309	nein	54	w	CUP	IVA	TxN2bMx	3	nein	26	26
315	nein									
317	nein	43	m	ORO	II	T2N0M0	2	nein	8	8
320	nein	57	m	Parotis	IVA	TxN2bMx	3	ja	11	25
322	ja	46	m	NNH	IV	T4N0M0	3	ja	4	21
323	nein	73	m	MUH	II	T2N0M0	2	nein	21	21
330	nein	56	m	ORO	III	T2N1M0	3	ja	5	13
331	ja	58	m	ORO	IVB	T4bN2bM0	3	ja	13	20
333	ja	63	w	ORO	III	T2N2a	2	nein	20	20
335	nein	64	m	LAR	III	T3N0M0	2	nein	19	19
336	nein	81	w	Parotis	IV	T3N2bM0	?	ja	2	2
338	nein	83	w	LK Metastase	IVA	TxN2bMx	?	ja	8	18
340	ja	66	m	ORO	IVA	T3N2bM0	2		1	1
341	nein	65	m	HYP/LAR	II	T2N0M0	3	ja	4	10
342	nein	71	m	ORO/MUH	IVA	TxN2bM0	2	ja	6	17
343	ja	60	w	NAS	I	T1N0M0	2	nein	17	17
344	nein	57	m	ORO	IVA	T3N2bM0	2	ja	8	17
345	nein	62	m	LAR	I	T1N0Mx	1	ja	2	17
346	nein	42	m	HYP	IVA	T0N2bMx		ja	3	3
347	nein	71	w	LAR				ja	8	17
347a	nein	63	m	HYP	IVA	T0N3M0		ja	10	10
348	nein	65	m	ORO	IVC	T4N3M1	3	ja	3	4
349	nein	73	m	Speicheldrüse	IVA	T2N2bM0		ja	5	17
350	ja	76	m	LAR	II	T2N0M0	3	nein	16	16
351	ja							nein	7	16
355	nein	62	m	HYP	IVA	T1N2bM0	2	nein	15	15
356	ja	55	m	ORO	III	T3N0M0	2	nein	14	14
357	nein	51	m	ORO	IVA	T3N2bM0	3		1	
358	nein	63	m	NAS	II	T2N0M0	2	nein	14	14
362	nein	62	w	LAR	IVA	T1N2bM0	3	nein	14	14
366	ja	56	m	MUH	III	T1N1M0		nein	13	13
367	nein	45	w	ORO	IV	T4N0M0	2	nein	13	13
368	nein	58	m	CUP	IVB	TxN2bM0	4	ja	7	13

(w: weiblich; m: männlich; T: Tumorgroße; N: Lymphknotenmetastasierung; M: Fernmetastasen; CUP: *cancer unknown primary*; HYP: Hypopharynx; LAR: Larynx; LK: Lymphknoten; MUH: Mundhöhle; NAS: Nasopharynx; ORO: Oropharynx)

## 7.2 Zusammenfassung der klinischen Charakteristika untersuchter Kopf-Hals-Tumorpatienten

Kriterium	Spezifizierung	Mittelwert	Anzahl	in %
Anzahl der Patienten			88	
Männliche Patienten			67	82
Weibliche Patienten			15	18
Alter (Jahre)		59		
Tumorlokalisation	CUP/ HYP/ LAR/ LKmet/ MUH/ NAS/ ORO/ Rest	ORO	5/ 15/ 21/ 1/ 4/ 3/ 30/ 4	6/ 18/ 25/ 1/ 5/ 4/ 36/ 5
Tumorstadium	I/ II/ III/ IV	IV	1/ 7/ 16/ 54	4/ 8/ 20/ 68
Tumorgroße T	x/ 0/ 1/ 2/ 3/ 4	II und IV	8/ 2/ 16/ 20/ 16/ 20	10/ 2/ 20/ 24/ 20/ 24
Lymphknotenstatus N	0/ 1/ 2/ 3	2	24/ 7/ 46/ 4	29/ 9/ 57/ 5
Fernmetastasenstatus M	x / 0/ 1	0	8 / 71/ 1	10 / 89/ 1
Differenzierungsgrad G	1/ 2/ 3/ 4	3	2/ 26/ 42/ 1	3/ 37/ 59/ 1

(CUP: *cancer unknown primary*; HYP: Hypopharynx; LAR: Larynx; LKmet: Lymphknotenmetastasierung; MUH: Mundhöhle; NAS: Nasopharynx; ORO: Oropharynx)

