Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Universität zu Lübeck
Direktorin: Prof. Dr. med. Barbara Wollenberg

vertreten in der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
durch das Institut für Virologie und Zellbiologie der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Norbert Tautz

Immunstimulation RNA-bindender Rezeptoren regulatorischer und zytotoxischer NK-Zellen bei malignen Kopf-Hals-Karzinomen

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -

vorgelegt von
Sandra Wulff
aus Buchholz in der Nordheide
Lübeck 2009

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Rohwedel

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

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Dezember 2009

zum Druck genehmigt: Lübeck, den 10. Dezember 2009

gez. Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Prestin

- Dekan der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -

Meiner Familie und Michael Minge

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **1**

1.1 HNSCC - Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich . . . 1

1.2 Das Immunsystem . . . 2

1.3 NK-Zellen . . . 3

1.3.1 Entstehung und Entwicklung . . . 3

1.3.2 Effektor-Mechanismen von NK-Zellen . . . 4

1.3.3 NK-Zell-Rezeptoren . . . 6

1.3.4 Die Subpopulationen $CD56^{dim}$ und $CD56^{bright}$ . . . 7

1.4 Toll-like Rezeptoren . . . 10

1.4.1 Überblick . . . 10

1.4.2 TLR3 . . . 13

1.4.3 TLR7 . . . 14

1.5 RIG-I-like Rezeptoren . . . 15

1.6 PRR-vermittelte Immunmodulation . . . 16

1.6.1 Poly I:C . . . 16

1.6.2 immunstimulatorische RNA . . . 16

1.6.3 weitere immunstimulatorische Agenzien . . . 17

1.7 Tumor-*Escape*-Mechanismen . . . 18

1.8 Der Einfluss von HNSCC auf Immunzellen . . . 19

1.9 Immuntherapien in HNSCC . . . 20

1.10 Ziel dieser Arbeit . . . 21

2 Material und Methoden **23**

2.1 Verwendete Materialien . . . 23

2.1.1 Geräte . . . 23

2.1.2 Software . . . 23

2.1.3 Chemikalien . . . 24

2.1.4 Puffer und Lösungen . . . 24
2.1.5 Medien und Zusätze . . . 25
2.1.6 *Kits* . . . 26
2.1.7 Zelllinien . . . 26
2.1.8 Antikörper . . . 26
2.1.9 Blut- und Gewebeproben . . . 28
2.2 Angewandte Methoden . . . 31
2.2.1 Zellkultur . . . 31
2.2.2 Zellisolierung . . . 32
2.2.3 Stimulation der isolierten Zellen . . . 33
2.2.4 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) . . . 34
2.2.5 Immunhistochemie . . . 35
2.2.6 In Vivo Fluoreszenzmikroskopie . . . 36
2.2.7 Messung der Zytokinsekretion von Zellen . . . 36
2.2.8 Zytotoxizitätstest . . . 38
2.2.9 MTT Zell-Proliferationstest . . . 38

3 Ergebnisse **40**
3.1 Identifizierung von NK-Zellen und den *Toll-like* Rezeptoren . . . 40
3.1.1 Isolierung und Identifizierung humaner NK-Zellen . . . 40
3.1.2 TLR-Expression bei Natürlichen Killerzellen . . . 41
3.2 Die NK-Zell-Subpopulationen $CD56^{dim}$ und $CD56^{bright}$ . . . 45
3.2.1 Identifizierung von NK-Zellen im Tumorgewebe . . . 48
3.2.2 Abnahme der zirkulierenden regulatorischen NK-Zellen bei Patienten mit HNSCC 48
3.3 Der Einfluss von Poly I:C und HNSCC-Milieu auf NK-Zellen . . . 50
3.3.1 Aktivierung von NK-Zellen durch Poly I:C . . . 50
3.3.2 Internalisierung von TLR3 . . . 52
3.3.3 Poly I:C wird über MDA5 erkannt . . . 55
3.3.4 Poly I:C steigert die Zytokinsekretion durch NK-Zellen . . . 60
3.4 ss-isRNA aktiviert NK-Zell-Funktionen über TLR7 . . . 64

4 Diskussion **73**
4.1 Toll-like Rezeptoren . . . 73
4.1.1 Toll-like Rezeptoren in HNSCC . . . 73
4.1.2 Toll-like Rezeptoren in Immunzellen . . . 74

4.2 Die NK-Zell-Subpopulationen 75
4.2.1 Abnahme der CD56^{bright}-Level bei HNSCC-Patienten 76
4.3 Poly I:C als potentieller Stimulus von NK-Zellen 78
4.4 ss-isRNA als immunstimulatorisches Werkzeug gegen HNSCC 83
4.5 Der Einfluss von HNSCC auf NK-Zellen 85
4.5.1 Tumor-Escape 85
4.5.2 NK-Zellen und RNA in Immuntherapien gegen HNSCC 86
4.6 Ausblick 88

5 Zusammenfassung **91**

6 Abstract **93**

7 Literaturverzeichnis **94**

8 Abbildungsverzeichnis **112**

9 Tabellenverzeichnis **114**

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	*Antibody - dependent cellular cytotoxicity*
AJCC	*American Joint Commitee on Cancer*
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
BSA	bovines Serumalbumin
CD	*Cluster of differentiation*: Oberflächenantigen
DC	Dendritische Zelle
DMEM	*Dulbecco´s modified eagle medium*: Nährmedium
DMSO	Dimethylsulfonsäureoxid
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DNA	*Desoxyribonucleic acid*
dsRNA	doppelsträngige RNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	*Fluorescence activated cell sorter*
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FSC	*Forward scatter*
g	Erdbeschleunigung
GFP	*Green fluorescent protein*
HNSCC	*Head and neck squamous cell carcinoma*
IFN	Interferon
IL	Interleukin
Ig	Immunglobulin
KIR	*Killer immunglobulin - like receptor*
LDH	Lactatdehydrogenase
MACS	*Magnetic cell sorting*
MDA-5	*Melanoma differentiation-associated protein 5*

MHC	*Major histocompatibility complex*
MFI	*mean fluorescence intensity*: durchschnittliche Fluoreszenz-Intensität
NCR	*Natural cytotoxicity receptor*
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
PAMPs	*Pathogen-associated molecular patterns*
PBMCs	*Peripheral blood mononuclear cells*
PBS	*Phosphate-buffered Saline*
PE	Phycoerythrin
PerCP	*Peridinin chlorophyll protein*
Poly I:C	*Polyinosinic - polycytidylic acid*
PRR	*Pattern Recognition Receptor*
RIG-1	*Retinoic acid reducable gene 1*
RNA	*Ribonucleic acid*
SDS	*Sodium-Dodecylsulfate*
siRNA	*short interference RNA*
ss-isRNA	*single stranded immunostimmulatory RNA*: immunstimulatorische RNA
SSC	*Sideward scatter*
TBS	*Tris-buffered Saline*
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
Th1	*T helper type 1*
TLR	Toll-*like* Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
UICC	“Union International Contre Cancer“

Allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Maßeinheiten sind nicht gesondert aufgeführt.

1 Einleitung

1.1 HNSCC - Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich

HNSCC (*head and neck squamous cell carcinoma*) liegt an sechster Stelle der am häufigsten auftretenden Neoplasien weltweit. Mehr als 500.000 Neuerkrankungen von HNSCC werden jährlich weltweit diagnostiziert (Bernier, 2006). Die Inzidenz ist abhängig von der Region und beträgt zwischen 20 und 30 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner im Jahr. HNSCC tritt vor allem in der sechsten, siebten oder achten Lebensdekade auf (Chin *et al.*, 2006) und ist bei Männern wesentlich häufiger als bei Frauen (Verhältnis 5:1) (Hoffman *et al.*, 1998). Über 90 % aller Tumorerkrankungen im Kopf-Hals-Bereich sind Plattenepithelkarzinome (Hardisson, 2003); diese kommen in der Mundhöhle, im Rachen (Oro-, Hypo- und Nasopharynx), im Kehlkopf und den Nasenhaupt- und Nebenhöhlen vor (Chin *et al.*, 2004). Zu den Hauptrisikofaktoren dieser Erkrankungen zählen Tabak- und Alkoholkonsum und virale Erkrankungen wie das Epstein-Barr-Virus (EBV) oder das humane Papillomavirus (Chin *et al.*, 2006). Die Krebsentstehung umfasst Veränderungen wie zum Beispiel Mutationen des p53-Suppressorgens, die Inaktivierung des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors p16 und eine Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR) (Chin *et al.*, 2004). HNSCC ist eine sehr heterogene Erkrankung, mehr als 50 % dieser Krebserkrankungen treten im Oropharynx auf (Forastiere *et al.*, 2001). Die Fünf-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit HNSCC liegt bei durchschnittlich 50 % und hat sich trotz vielseitiger Therapieansätze in den letzten 30 Jahren kaum verbessert (Chin *et al.*, 2006; Greene *et al.*, 2002).
Die Einteilung von HNSCC in Tumorstadien erfolgt nach dem international anerkannten TNM-System der UICC („Union International Contre Cancer“, Greene *et al.* (2002)). Bei diesem Einteilungssystem wird die Größe des Primärtumors (T), das Ausmaß der regionalen Lymphknoten-Metastasen (N) und das Auftreten entfernter Metastasen (M) berücksichtigt. Die prognostische Einteilung der Kopf-Hals-Karzinome erfolgt in vier Schweregrade zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in Abhängigkeit der TNM-Stadien (Tabelle 1).

Tabelle 1: UICC- Einteilung der HNSCC-Stadien
T0: kein Beweis für einen Primärtumor, T1-4: Ansteigende Tumorgröße, jedes T: T1-4, N0: keine regionalen Lymphknotenmetastasen, N1-3: regionale Lymphknoten-Metastasen, jedes N: N0-3, M0: keine entfernten Metastasen, M1-3: entfernte Metastasen

Stadium	Primärtumor	regionale Metastasen	entfernte Metastasen
0	T0	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
	T3	N1	M0
IV	T4	jedes N	M0
	jedes T	jedes N	M1-3

Die Behandlung von Patienten mit HNSCC ist sehr komplex. Unter Berücksichtigung des spezifischen Ortes der Erkrankung, dem Ausmaß der Erkrankung und dem pathologischen Befund wird über eine angemessene Behandlung (Operationen, Strahlungsfelder und Chemotherapie-Dosen und -Indikationen) entschieden (Forastiere *et al.*, 2008). HNSCC wird in der Regel aufgrund spät auftretender Symptome erst in den Tumorstadien III oder IV erkannt. Zur Standardtherapie der HNSCC-Patienten gehört die chirurgische Entfernung des Tumors. Abhängig vom Gesundheitszustand des Patienten und dem Tumorstadium wird eine Chemo- oder/und Strahlentherapie angewendet. Die Heilungschancen sinken mit steigender Tumorgröße und Metastasenbildung (Forastiere *et al.*, 2008).
Es gibt neue alternative Therapieansätze, die teilweise unterstützend zur Chemotherapie oder Strahlentherapie angewendet werden. Agada *et al.* (2009) beschrieb verschiedene Immuntherapie-Ansätze, die T-Zell-spezifische Immuntherapie, die DC-spezifische Immuntherapie, DNA-Impfstoffe, p53-Impfstoffe, monoklonale Antikörper und Zytokine. Da HNSCC eine sehr heterogene Erkrankung darstellt, ist die Entwicklung geeigneter Therapien sehr kompliziert.

1.2 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist eine Organisation von Zellen und Molekülen, die verschiedene Rollen und Funktionen bei der körpereigenen Immunabwehr besitzen. Zwei unterschiedliche Arten von Immunantworten können unterschieden werden, die des angeborenen Immunsystems und die des erworbenen Immunsystems (Delves und Roitt, 2000).
Das angeborene Immunsystem wird sofort nach einer Infektion aktiviert und benötigt keinen vorherigen Kontakt mit pathogen-infizierten oder transformierten Zellen. Das angeborene Immunsystem bietet somit einen sofortigen Schutz gegen Viren, Bakterien und Tumorzellen.

Zur angeborenen Immunantwort gehören phagozytierende Zellen (Dendritische Zellen, Neutrophile, Monozyten und Makrophagen), Zellen, die inflammatorische Mediatoren frei geben (Basophile, Mast-Zellen und Eosinophile) und Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) (Delves und Roitt, 2000; Medzhitov und Janeway, 2000).

Das angeborene Immunsystem erkennt nicht jedes mögliche Antigen, sondern einige hoch konservierte Strukturen, die in einer Vielzahl von Mikroorganismen vorkommen. Diese Muster werden als PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) bezeichnet und die diese Muster erkennenden Rezeptoren als PRRs (*pattern-recognition receptor*) (Janeway, 1989; Medzhitov und Janeway, 2000).

Das erworbene (adaptive) Immunsystem besteht aus zwei Klassen spezialisierter Lymphozyten, T-Zellen und B-Zellen, die nach Kontakt mit spezifischen Antigenen proliferieren. B- und T-Zellen besitzen ein großes Repertoire von Antigen-Rezeptoren, das sich bei jeder Zelle unterscheidet. Die Vielfältigkeit und Größe des Repertoires erhöht die Möglichkeit, dass individuelle Lymphozyten ein Antigen zu ihrem Rezeptor binden können und somit die Aktivierung und die Proliferation dieser Zellen auslösen. Dieser Prozess wird als klonale Selektion bezeichnet. Diese klonale Ausbreitung ist notwendig für eine effektive Immunantwort, diese dauert allerdings drei bis fünf Tage (Medzhitov und Janeway, 2000).

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem sind die Komponenten des erworbenen Immunsystems in der Lage, bei einer folgenden identischen Infektion schneller und stärker zu reagieren als beim ersten Kontakt. Die Reaktionen des angeborenen Immunsystems verändern sich nicht (Delves und Roitt, 2000).

Die Komponenten des angeborenen und des erworbenen Immunsystems interagieren miteinander. Zur Erkennung und Reaktion betreffender Antigene durch Zellen des erworbenen Immunsystems werden „Antigenpräsentierende Zellen“ (APCs) zur Sensibilisierung benötigt. APCs sind Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (DCs), die körperfremde Organismen und Proteine phagozytieren und die einzelnen Bestandteile den T- und B-Zellen präsentieren (Delves und Roitt, 2000).

1.3 NK-Zellen

1.3.1 Entstehung und Entwicklung

Natürliche Killer-Zellen sind große granuläre Lymphozyten des angeborenen Immunsytems und machen 10 - 15 % der Lymphozyten im peripheren Blut aus. Sie besitzen sowohl Eigenschaften von Lymphozyten als auch von Monozyten (Robertson und Ritz, 1990).

Die Entwicklung von NK-Zellen aus hämatopoetischen $CD34^+$-Vorläuferzellen findet im Knochenmark statt. NK-Zellen und T-Zellen entwickeln sich aus denselben Vorläufer-Zellen. NK-Zellen weichen aber bereits in der frühen Entwicklung von anderen Lymphozyten ab (Colucci *et al.*, 2003; Spits *et al.*, 1995).

Sie benötigen c-KIT, FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT-3) und Interleukin-15 (IL-15) und erwerben spezifische Zelloberflächenmarker beim Durchlaufen der unterschiedlichen Entwicklungsstadien (Perussia *et al.*, 2005).

NK-Zellen werden durch die Expression des Oberflächenantigens CD56, einer Isoform des *neuronal cell adhesion molecule* (NCAM), und dem Fehlen von CD3 charakterisiert (Robertson und Ritz, 1990). Über die Funktion von NCAM ist bis zu diesem Zeitpunkt wenig bekannt (Wilk *et al.*, 2008).

Takasugi *et al.* (1973) wurden bei Untersuchungen von Abwehrzellen gegen Tumorzellen auf NK-Zellen aufmerksam. Da Lymphozyten gesunder Spender Tumorzellen ohne vorherige Immunisierung antikörperunabhängig abtöten konnten, wurden sie für die Forschung interessant.

1.3.2 Effektor-Mechanismen von NK-Zellen

NK-Zellen besitzen die Fähigkeit Zielzellen direkt zu lysieren und bilden somit die erste Abwehr gegen virusinfizierte Zellen und Tumorzellen. Aufgrund dieser Funktion nannte man sie Natürliche Killer-Zellen (Trinchieri, 1989). Außerdem sind NK-Zellen in der Lage über die Bindung ihrer Fc-Rezeptoren (FcγR), wie beispielsweise CD16 (FcγIII), an IgG-Antikörper Zielzellen, ohne vorherigen Kontakt zu diesen, zu zerstören. Diese antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität wird als ADCC (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*) bezeichnet. Sowohl die natürliche Zytotoxizität als auch ADCC unterliegen den gleichen zytolytischen Mechanismen (Delves und Roitt, 2000; Young und Cohn, 1987). Nach der Bindung an die Ziel-Zellen wird zytotoxisches Granulat in den intrazellulären Raum zwischen der NK-Zelle und der Ziel-Zelle gegeben. Dieser Schritt ist calciumabhängig. Das Granulat der NK-Zellen enthält Proteine wie Perforin, ein Poren bildendes Protein und Granzyme, eine Familie von Serin-Proteinasen. Das Granulat wird durch Mikro-Vesikel zur Zielzelle transportiert und induziert bei Eintritt in die Ziel-Zelle den Zelltod in Form von Zelllyse (Andoniou *et al.*, 2006; Bradley und Bonavida, 1982; Warren und Smyth, 1999). Granzym B scheint den endogenen Zelltod durch die Aktivierung von Schlüssel-Ziel-Zell-Caspasen auszulösen (Warren und Smyth, 1999).

Neben der Funktion der Zytotoxizität können NK-Zellen Chemokine und inflammatorische Zytokine wie Interferon-γ (IFN-γ) und Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α) produzieren und sind dadurch in der Lage, mit anderen Immunzellen, wie beispielsweise DCs, zu interagieren. Diese Interaktion mit DCs ist wichtig für NK-Zell- und T-Zell-Antworten (Raulet, 2004). Darüber hinaus ist die IFN-γ-Sekretion von NK-Zellen dafür bekannt, eine Th1- (*T helper type 1*-) Antwort auszubilden und zur Aktivierung von APCs und von Makrophagen zu führen. Außerdem hat IFN-γ einen anti-proliferativen Effekt auf virale und bösartig-transformierte Zellen (Caligiuri, 2008).

NK-Zellen können Tumorzellen oder virus-infizierte Zellen auf unterschiedliche Weisen erkennen. Kaerre *et al.* (1986) erkannten, dass die NK-Zell-Zytotoxizität mit der MHC-(*Major histocompatibility com-*

plex-) Klasse-I-Expression korrelierte und formulierten die „*Missing-self*-Hypothese“. Durch diese Hypothese wurden zahlreiche inhibitorische Rezeptoren entdeckt, die aktivierende Signale blockieren. Zum jetzigen Zeitpunkt sind drei verschiedene Erkennungs-Strategien von NK-Zellen bekannt, die direkte Erkennung von transformierten Zellen durch pathogen-kodierte Proteine, die Erkennung von eigenen Proteinen, deren Expression auf infizierten oder transformierten Zellen hochreguliert ist (*induced-self recognition*) oder deren Expression auf infizierten oder transformierten Zellen herunter reguliert ist (*missing-self recognition*) (Raulet, 2004). NK-Zellen sind aufgrund zahlreicher inhibitorischer und aktivierender Rezeptoren in der Lage zwischen Zielzellen und Zellen des eigenen Körpers zu unterscheiden (Cerwenka und Lanier, 2001). Bei der *induced-self*-Strategie erkennt die NK-Zelle über spezifische Rezeptoren Proteine, die auf der Oberfläche von infizierten oder transformierten Zellen im Vergleich zu normalen Zellen verstärkt exprimiert werden. Diese Erkennung führt zur Aktivierung der NK-Zellen (Orange und Ballas, 2006; Raulet, 2004). Bei der *missing-self*-Strategie werden durch die Erkennung von Proteinen auf der Zelloberfläche normaler Zellen die NK-Zell-Funktionen inhibiert. Hierbei erfolgt die Inhibierung von NK-Zellen überwiegend durch die Erkennung von MHC-Klasse-I-Molekülen (Abbildung 1 A). Bei infizierten oder transfizierten Zellen enden die inhibitorischen Signale durch eine Herunterregulierung der MHC-Klasse-I-Expression. Durch die fehlenden inhibitorischen Signale und damit verbunden, das Überwiegen aktivierender Signale, wird die NK-Zelle aktiviert (Abbildung 1 B) (Ljunggren und Kaerre, 1990; Orange und Ballas, 2006).

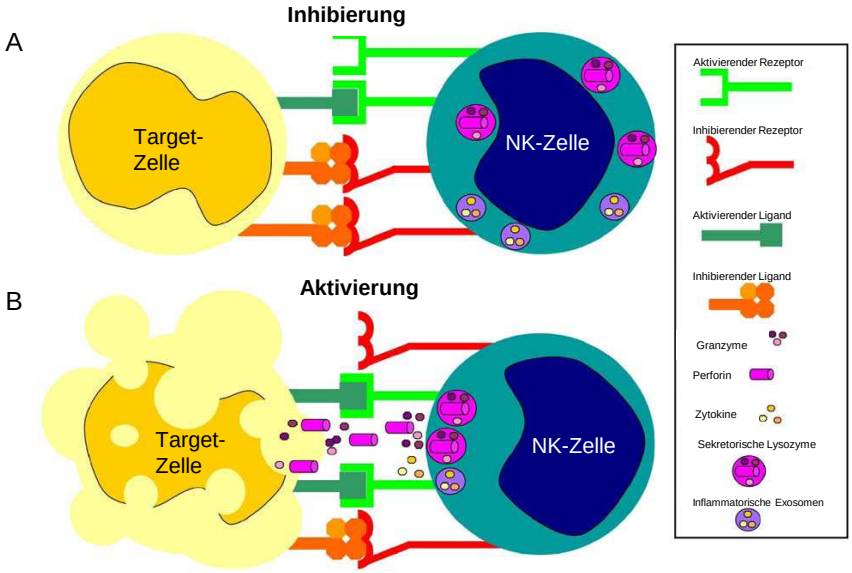

Abbildung 1: Modell - Aktivierung und Inhibierung von NK-Zellen
Dieses Modell von Orange und Ballas (2006) stellt die Interaktion von NK-Zellen mit möglichen Targetzellen dar. Überwiegen inhibitorische Liganden wie beispielsweise MHC-Klasse-I-Moleküle, wird die NK-Zelle inhibiert (A). Fehlen oder verringern sich diese inhibitorischen Liganden und sind darüber hinaus mehr aktivierende Liganden vorhanden, wird die NK-Zelle aktiviert und entlässt Perforine und Granzyme beziehungsweise Zytokine (B).

1.3.3 NK-Zell-Rezeptoren

NK-Zellen besitzen ein Repertoire an inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren (Lanier, 2008). Die Regulation der NK-Zell-Aktivierung erfolgt durch die Balance zwischen inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren (Raulet *et al.*, 2001). Überwiegen Liganden für inhibitorische Rezeptoren auf der Ziel-Zelle, bleibt die Zelle inhibiert und wird nicht aktiviert. Fehlen diese inhibitorischen Signale und überwiegen Liganden für aktivierende Rezeptoren, werden die NK-Zellen aktiviert und leiten die Zelllyse der Ziel-Zellen ein (Abbildung 1).

Im Menschen gibt es sowohl HLA- (humane Leukozytenantigen-) spezifische als auch HLA-unspezifische inhibierende und aktivierende Rezeptoren (Moretta *et al.*, 2001; Raulet *et al.*, 2001). In NK-Zellen kommen Rezeptoren unterschiedlicher Rezeptorfamilien vor, die Ig- (*immunoglobulin-like receptor*) Superfamilie, zu denen die *killer immunoglobulin-like*-Rezeptoren (KIR) und die *leukocyte Ig-like*-Rezeptoren (LILR) gehören, die Superfamilie der C-Typ Lektine und die Rezeptoren der natürlichen Zytotoxizität (NCR - *natural cytotoxicity receptors*) (Biassoni, 2009; Bottino *et al.*, 2004; Raulet *et al.*, 2001). Zur KIR-Familie gehören paarweise inhibierende und aktivierende Rezeptoren, die HLA-ABC-Moleküle erkennen. KIRs erkennen verschiedene Gruppen von HLA-A-, HLA-B- oder HLA-C-Allelen, KIR2DL4 ist jedoch spezifisch für HLA-G (Biassoni *et al.*, 2001). Die LILRs werden durch ihre breite HLA-Reaktivität charakterisiert. Die zweite Hauptgruppe der C-Typ-Lektin-Rezeptoren besteht aus einem Heterodimer von CD94 und einem Mitglied der NKG2-Familie (CD94/NKG2). Es gibt sowohl aktivierende wie NKG2C als auch inhibitorische Rezeptoren wie NKG2A. Die Funktion des Rezeptors hängt von dem NKG2-Molekül ab (O'Connor *et al.*, 2006). NK-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche entweder aktivierende oder inhibierende CD94/NKG2-Rezeptoren und erkennen MHC-Klasse-I-Moleküle (Raulet *et al.*, 2001).

Inhibitorische Rezeptoren werden durch ITIMs (*immune tyrosine-based inhibitory motivs*) am zytoplasmatischen Ende charakterisiert. Diese Rezeptoren binden an HLA-Klasse-I-Moleküle. Die Bindung der HLA-Liganden durch inhibitorische KIRs auf gesunden Zellen führt, wie bereits beschrieben, zu einer Inhibierung der NK-Zell-Aktivität (O'Connor *et al.*, 2006). Es gibt eine Vielzahl aktivierender Rezeptoren in NK-Zellen, viele haben kurze zytoplasmatische Domänen, die als ITAMS (*immune tyrosine-based activating motives*) bezeichnet werden, diese interagieren mit transmembranen Adapter-Molekülen, um NK-Zell-Funktionen zu aktivieren (Andoniou *et al.*, 2006).

Die Familie der NCR-Rezeptoren besteht ausschließlich aus aktivierenden Rezeptoren (Bottino *et al.*, 2005). Die NCR-Rezeptoren gehören zu den ersten entdeckten nicht HLA-spezifischen Rezeptoren. Sie spielen bei der natürlichen Zytotoxizität eine Rolle. Drei NCRs sind beschrieben worden, NKp30, NKp44 und NKp46 (Bottino *et al.*, 2004).

In Tabelle 2 werden sowohl inhibitorische als auch aktivierende NK-Zell-Rezeptoren mit ihren spezifischen Liganden dargestellt.

Tabelle 2: Rezeptoren von Natürlichen Killer-Zellen nach O'Connor *et al.* (2006)

Receptor	Ligand	Function
Immunoglobulin-like Rezeptoren		
KIR2DL1,	HLA-C, C2	inhibierend
KIR2DS1	HLA-C, C2	aktivierend
KIR2DL2/3	HLA-C, C1	inhibierend
KIR2DS2	HLA-C, C1	aktivierend
KIR3DL1	HLA-B Bw4	inhibierend
KIR3DS1	HLA-B Bw4?	aktivierend?
KIR2DL4	HLA-G	aktivierend?
KIR3DL2	HLA-A A3, A11	inhibierend
LILR-Familie (ILT)	HLA	einige inhibierend, einige aktivierend
Lectin-like Rezeptoren		
CD94/NKG2A	HLA-E	inhibierend
CD94/NKG2C	HLA-E	aktivierend
Rezeptoren der Zytotoxizität		
NKG2D	MICA, MICB, ULPB	aktivierend
NKp30	unbekannt	aktivierend
NKp44	unbekannter zellulärer Ligand, virales HA [1]	aktivierend
NKp46	unbekannter zellulärer Ligand, virales HA	aktivierend
CD16	IgG	aktivierend
DNAM-1	PVR (CD155), nectin-2 (CD112)	aktivierend
NKp80	unbekannt	aktivierend, Co-Rezeptor
CD59	unbekannt	aktivierend, Co-Rezeptor
NTB-A	NTB-A	aktivierend, Co-Rezeptor
2B4 (CD244)	CD48	aktivierend, Co-Rezeptor
CD2	LFA-2	aktivierend, Co-Rezeptor
LFA-1	ICAM	aktivierend
TLR	PAMPs, e.g. dsRNA	aktivierend

1.3.4 Die Subpopulationen $CD56^{dim}$ und $CD56^{bright}$

NK-Zellen können in zwei funktionelle Subpopulationen unterteilt werden (Caligiuri *et al.*, 1990). Die Subpopulationen unterscheiden sich aufgrund der unterschiedlich ausgeprägten CD56-Expression. Un-

[1] HA, Hemagglutinin

gefähr 90 % der NK-Zellen exprimieren CD56 in geringer Dichte auf der Zelloberfläche und werden als CD56^{dim} bezeichnet. Etwa 10 % der NK-Zellen gehören zu der CD56^{bright}-Subpopulation und exprimieren CD56 stärker. Ein weiterer Unterschied existiert in der Expression von CD16 (FCγ-Rezeptor III). Während die CD56^{dim}-NK-Zellen eine hohe CD16-Expression aufweisen, fehlen den meisten CD56^{bright}-NK-Zellen CD16 (50-70 %) (Cooper *et al.*, 2001a; Lanier *et al.*, 1986). Diese NK-Zell-Subpopulationen weisen Unterschiede in ihrem zytotoxischen Potential, ihrer Zytokinsekretion und ihren Antworten auf die Aktivierung durch Zytokine auf (Farag und Caligiuri, 2006). Die gereinigten CD56^{bright}-NK-Zellen produzieren nach der Aktivierung mit Monokinen (*monozyte derived cytokines*) signifikante Mengen von IFN-γ, TNF-α, GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), IL-10 und IL-13. Die CD56^{dim}-NK-Zellen sekretieren als Antwort auf die Stimulation mit Monokinen nur geringe Mengen dieser Zytokine (Cooper *et al.*, 2001b). Die Zytokinsekretion ist allerdings von den Stimulationsbedingungen abhängig. Durch die Kombination von IL-12 mit IL-18 wurde die stärkste IFN-γ-Sekretion in CD56^{bright}-NK-Zellen ausgelöst, die 20 - 30 Mal stärker war als in CD56^{dim}-NK-Zellen (Fehniger *et al.*, 1999). Die CD56^{bright}-NK-Zell-Subpopulation kann sowohl natürliche Zytotoxizität als auch ADCC (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*) nur in geringem Maß induzieren. Die CD56^{dim}-NK-Zellen hingegen zeigen eine hohe natürliche Zytotoxizität gegenüber Zielzellen sowie auch eine wesentlich höhere ADCC als CD56^{bright}-NK-Zellen (Farag und Caligiuri, 2006; Nagler *et al.*, 1989). Die CD56^{dim}-NK-Zellen enthalten deutlich mehr Perforin und Granzyme im zytolytischen Granulat (Jacobs *et al.*, 2001). Die funktionellen Unterschiede der beiden Subpopulationen sind in Abbildung 2 dargestellt.

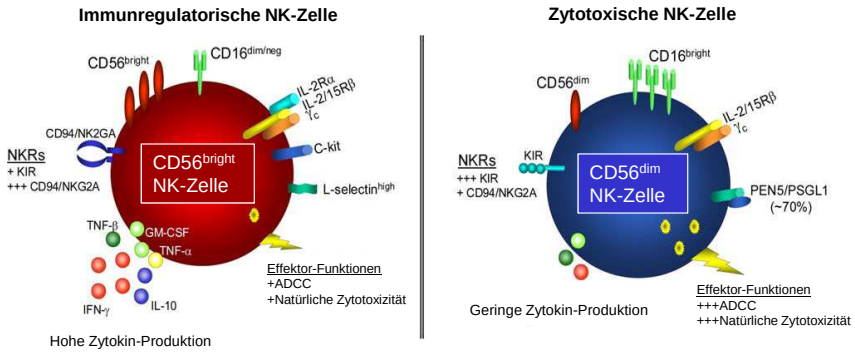

Abbildung 2: Humane NK-Zell-Subpopulationen
Modell der unterschiedlichen Funktionen und Rezeptorprofile der zytotoxischen CD56^{dim}- und der immunregulatorischen CD56^{bright}-Subpopulation von Farag und Caligiuri (2006). Während die CD56^{bright}-NK-Zellen eine hohe Zytokinsekretion aufweisen, produziert die CD56^{dim}-Subpopulation geringe Level an Zytokinen, besitzt jedoch eine höhere ADCC und natürliche Zytotoxizität als die andere.

Die NK-Zell-Subpopulationen unterscheiden sich nicht nur in Hinblick auf ihre CD16-Expression, sondern weisen auch unterschiedliche Rezeptorprofile auf. Diese phänotypischen Unterschiede sind in Tabelle 3 von Poli *et al.* (2009) aufgelistet.

Die inhibitorischen Rezeptoren KIR (*killer cell immunoglobulin-like receptor*) und ILT2 (*immunoglobulin-like transcript 2*) werden auf CD56^{dim}-NK-Zellen exprimiert, auf CD56^{bright}-NK-Zellen hingegen nicht.

CD94/NKG2A wird auf den immunregulatorischen NK-Zellen zu höheren Leveln exprimiert als bei den zytotoxischen. Der CCR7-Rezeptor beispielsweise wird bei der $CD56^{bright}$-Subpopulation deutlich exprimiert, bei der anderen jedoch nicht. Die weiteren Rezeptorunterschiede sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Rezeptor-Unterschiede bei den NK-Zell-Subpopulationen nach Poli *et al.* (2009)
$++$, starke Expression (bright); $+$, schwache Expression (dim); $\pm$, Expression nur auf einem Teil der Subpopulation; $-$, keine Expression.

	$CD56^{bright}$	$CD56^{dim}$
CD56	$++$	$+$
CD16	$\pm$	$++$
Inhibitorische Rezeptoren		
KIR	$-$	$+$
ILT2	$-$	$+$
CD94/NKG2A	$++$	$\pm$
Aktivierende Rezeptoren		
NKp46	$++$	$+$
CD117(c-kit)	$++$	$-$
Zytokin-Rezeptoren		
IL2Rα, β, γ	$+$	$-$
IL2Rβ, γ	$++$	$+$
IL1RI	$++$	$+$
IL18R	$++$	$+$
Chemokin-Rezeptoren		
CCR7	$++$	$-$
CXCR3	$++$	$\pm$
CXCR1	$-$	$++$
CX3CR1	$-$	$++$
Adhäsionsmoleküle		
CD2	$++$	$\pm$
CD11c	$++$	$\pm$
CD44	$++$	$+$
CD49e	$++$	$+$
CD54	$++$	$\pm$
CD62L	$++$	$\pm$
CD11a	$+$	$++$
Andere Moleküle		
CD57	$-$	$+$
CD160	$-$	$++$
CD55	$++$	$+$
CD59	$++$	$+$
HLA-DR	$+$	$-$

NK-Zell-Vorläufer-Zellen verlassen laut Poli *et al.* (2009) das Knochenmark und durchqueren das periphere Blut, um in den Lymphknoten zu $CD56^{bright}$-NK-Zellen unter dem Einfluss von Zytokinen von DCs und Stroma-Zellen zu differenzieren. Es gibt einige Hypothesen zur Entstehung von $CD56^{dim}$- und $CD56^{bright}$-NK-Zellen. Die $CD56^{bright}$-NK-Zellen werden hierbei als unreife Vorläuferzellen und die

$CD56^{dim}$-NK-Zellen als differenzierte NK-Zellen angesehen. Die Reifung wird durch die Herunterregulierung von CD56, den Erwerb von CD16 und von KIRs und der höheren Zytotoxizität erklärt (Nagler *et al.*, 1989; Poli *et al.*, 2009).

1.4 Toll-like Rezeptoren

1.4.1 Überblick

Toll-like Rezeptoren (TLRs) gehören zu den PRRs, die von Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert werden und molekulare Muster (PAMPs) von Mikroorganismen und Viren erkennen. Die erste Antwort auf Pathogene durch das angeborene Immunsystem wird durch PRRs ausgelöst (Arancibia *et al.*, 2007). Die Entdeckung der TLR-Familie begann mit „Toll“, einem Rezeptor, der in *Drosophila melanogaster* identifiziert wurde und bei der Embryogenese für die Entwicklung der dorso-ventralen Polarität wichtig ist (Hashimoto *et al.* 1988, Medzhitov *et al.* 1997).TLRs gehören zur Interleukin-1-Rezeptor-/*Toll-like*-Rezeptor- Superfamilie, das gemeinsame Merkmal ist die zytoplasmatische Toll/IL-1-Domäne (TIR-Domäne) (Takeda und Akira, 2005). Sie unterscheiden sich anhand ihrer extrazellulären Bereiche, TLRs besitzen Leucin-reiche Motive, während der extrazelluläre Bereich des IL-1-Rezeptors aus drei Immunoglobulin-ähnlichen Domänen besteht (Akira und Takeda, 2004). Bei Säugetieren konnten bisher elf TLRs identifiziert werden. Die Liganden der *Toll-like* Rezeptoren sind sehr vielfältig, denn TLRs erkennen nicht nur PAMPs, sondern auch endogene Liganden, die bei der Zerstörung von eigenen Geweben, beispielsweise bei Verletzungen, entstehen. Endogene TLR-Liganden schließen extrazelluläre Matrix-Proteine (Fibronektin, Fibrinogen und Hyaloronsäure) und andere Mediatoren von proinflammatorischen Antworten (Heparin-Sulphat, Beta-Defensin und *heat-shock*-Proteine) ein (Hopkins und Sriskandan, 2005). Einige TLRs können mehrere Liganden erkennen, mittlerweile sind auch synthetisch hergestellte Liganden für TLRs bekannt. In Tabelle 4 werden die TLRs mit ihren spezifischen Liganden zusammengefasst.

Tabelle 4: *Toll-like* Rezeptoren und ihre Liganden nach Ishii *et al.* (2005)

TLR	Ligand		Organismus	Referenz
	exogen	endogen		
TLR1 & TLR2	Triacyl-Lipopeptide		Bakterien	Takeuchi *et al.* (2002)
	Lipoarabinomannan		Mykobakterien	Tapping und Tobias (2003)
TLR2	Lipopeptide/Lipoproteine		Bakterien	Aliprantis *et al.* (1999)
	Peptidoglykan		Bakterien	Schwandner *et al.* (1999)
	Lipoteichonsäure		gram-positive Bakterien	Schroeder *et al.* (2003)
	LPS		P.gingivales L.interrogans	Hirschfeld *et al.* (2001); Werts *et al.* (2001)

Fortsetzung

TLR	Ligand		Organismus	Referenz
	exogen	endogen		
	GPI		T. cruzi, P. falciparum	Campos *et al.* (2001); Krishnegowda *et al.* (2005)
	Zymosan		Pilze	Underhill *et al.* (1999)
TLR2 & TLR6	Diacyl-Lipopeptide		Mycoplasma	Takeuchi *et al.* (2001)
TLR3	dsRNA		Westnil Virus, murines Cytomegalovirus	Alexopoulou *et al.* (2001); Tabeta *et al.* (2004); Wang *et al.* (2004)
	siRNA		synthetisch	Kariko *et al.* (2004a)
		mRNA	Wirt	Kariko *et al.* (2004b)
TLR4	LPS		gram-negative Bakterien	Hoshino *et al.* (1999); Poltorak *et al.* (1998)
	Taxol		Pflanzen	Byrd-Leifer *et al.* (2001)
	Peptidoglykan		Mykobakterien	Uehori *et al.* (2005)
	RSV Fusionprotein		RSV	Kurt-Jones *et al.* (2000)
	Hüllprotein		murines Brustkrebsvirus (MMTV)	Rassa *et al.* (2002)
	Hsp60		Clamydia pneumoniae	Bulut *et al.* (2002)
		Hsp60	Wirt	Johnson *et al.* (2002)
		Hsp70	Wirt	Weatherill *et al.* (2005)
		Fibrinogen	Wirt	Smiley *et al.* (2001)
		Fibronektin	Wirt	Okamura *et al.* (2001)
	OK-432 (Picibanil)		synthetisch	Okamoto *et al.* (2003)
TLR5	Flagellin		Bakterien	Hayashi *et al.* (2001)
TLR7	ssRNA		Influenza, HIV-1, synthetisch	Diebold *et al.* (2004); Heil *et al.* (2004)
	Imidazoquinoline		synthetisch	Hemmi *et al.* (2002)
	Loxoribine		synthetisch	Heil *et al.* (2003)
	siRNA		synthetisch	Hornung *et al.* (2005)
TLR8	Imidazoquinoline		synthetisch	Jurk *et al.* (2002)
	ssRNA		Viren	Heil *et al.* (2004)
TLR9	CpG-DNA		Bakterien, synthetische ODN	Bauer *et al.* (2001); Hemmi *et al.* (2000); Takeshita *et al.* (2001)
			DNA Viren	Krug *et al.* (2004)
	Hemazoin		P.falciparum	Coban *et al.* (2005)
TLR10	unbekannt			
TLR11	Profilin-ähnliche Moleküle		Toxoplasma gondii	Yarovinsky *et al.* (2005)

Die TLRs sind in der Zelle unterschiedlich lokalisiert. Die *Toll-like* Rezeptoren TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 werden in intrazellulären Kompartimenten exprimiert, hingegen gelten die *Toll-like* Rezeptoren TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 als Oberflächenrezeptoren (Kawai und Akira, 2008). Die TLR-Expression unterscheidet sich jedoch innerhalb der Immunzellen in Bezug auf die intrazelluläre und

die Oberflächen-Expression (Iwasaki und Medzhitov, 2004). Die TLR-Expression unterscheidet sich auch in unterschiedlichen Zelltypen. Beispielsweise exprimieren B-Zellen TLR7, TLR9 und TLR10, Makrophagen weisen eine Expression von TLR2, TLR3, TLR4 und TLR8 auf. Humane Blut-Monozyten exprimieren TLR1, TLR2, TLR4 und TLR5, wenn sie zu unreifen DCs differenzieren verlieren sie diese Rezeptoren. Unreife DCs hingegen exprimieren TLR3. Die TLR-Expression unterscheidet sich ebenfalls zwischen PDCs (Plasmazytoide Dendritische Zellen) und MDCs (Myeloide Dendritische Zellen). PDCs exprimieren TLR6, TLR7 und TLR9, MDCs jedoch TLR1, TLR2, TLR3, TLR6 und TLR8 (Ishii *et al.*, 2005; Iwasaki und Medzhitov, 2004). Die intrazellulären TLRs TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 erkennen virale Nukleinsäuren RNA und DNA und können Typ-I-Interferone induzieren (Kawai und Akira, 2007). TLR2 erkennt Lipopeptide und Lipoproteine, die Hauptbestandteile der Außenmembranen von Bakterien sind. Flagellin, eine Proteinkomponente von Bakterien-Flagellen, wird von TLR5 erkannt. TLR4 erkennt Lipopolisaccharide (LPS), eine Glykolipid-Komponente der Außenmembran gram-negativer Bakterien. TLR1 beziehungsweise TLR6 kooperiert mit TLR2 bei der Erkennung von Triacal-Lipopeptiden (TLR1+TLR2) oder Diacyl-Lipopeptiden (TLR2+TLR6) (Heine und Lien, 2003; Ishii *et al.*, 2005). Die unterschiedliche Ligandenerkennung und die Lokalisation in der Zelle wird in Abbildung 3 bildlich dargestellt.

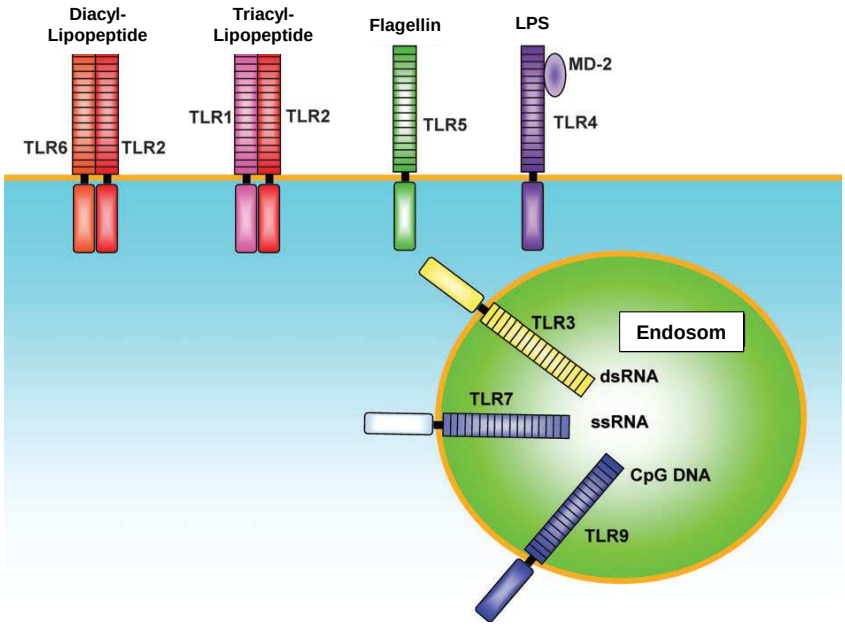

Abbildung 3: TLRs und ihre Liganden aus Takeda und Akira (2005)
TLR1 und TLR6 kooperieren mit TLR2 bei der Erkennung von Diacyl- und Triacyl-Lipopeptiden. TLR2 ist essentiell für die Erkennung von mikrobiellen Lipopeptiden. TLR4 erkennt LPS, TLR5 hingegen Flagellin. Diese Rezeptoren sind oberflächlich lokalisiert. TLR3 ist für die virale ds-RNA-Erkennung zuständig, während TLR7 und TLR8 virale ss-RNAs erkennen. TLR9 ist wichtig für die Erkennung von CPG-DNA. TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 sind in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert.

1.4.2 TLR3

Humanes TLR3 enthält 23 Leucin-reiche Kopien und N- und C-terminale flankierende Regionen, die transmembrane Domäne und die intrazelluläre TIR-Domäne (Bell *et al.*, 2003). Humane TLR3-mRNA ist in der Plazenta, Lunge, Leber Pankreas, Herz und Gehirn nachweisbar (Matsumoto und Seya, 2008). Obwohl TLR3 zu den in den Kompartimenten exprimierten TLRs gehört, beobachteten Matsumoto *et al.* (2003) und Matsumoto *et al.* (2002) die TLR3-Expression in humanen Fibroblasten und epithelialen Zellen sowohl intrazellulär als auch auf der Zelloberfläche. Die TLR3-Expression wird durch virale Infektionen deutlich gesteigert (Miettinen *et al.*, 2001). Der *Toll-like* Rezeptor 3 erkennt doppelsträngige-RNA, die während der Replikation vieler Viren entsteht, im Endosom. Polyinosinic polycytidylic acid (Poly I:C) ist eine synthetische Nachbildung dieser dsRNA und wird somit ebenfalls von TLR3 erkannt (Kawai und Akira, 2007), darüber hinaus ist bekannt, dass Poly I:C Immunzell-Funktionen über TLR3 in Mäusen und in Menschen aktiviert (Alexopoulou *et al.*, 2001; Pries *et al.*, 2008b). TLR3 erkennt dsRNA wie Poly I:C unter Verwendung des Adapters TRIF (*TIR-domain containing adapter protein*). TLR3 ist außerdem der einzige der *Toll-like* Rezeptoren, der MyD88 nicht benötigt, um Immunzell-Funktionen zu aktivieren. Der TRIF- abhängige Signalweg führt zur Aktivierung von den Transkriptionsfaktoren IRF3 sowie NF-κB, um die entsprechende Typ-I IFN-Sekretion oder die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen zu veranlassen (Kawai und Akira, 2008). IRF3 kontrolliert die Expression der Gene für die Typ-I-Interferone, NF-κB reguliert die Genexpression für die inflammatorischen Zytokine (Kawai und Akira, 2007). In Abbildung 4 ist die Erkennung von dsRNA und der entsprechende Signalweg vereinfacht dargestellt.

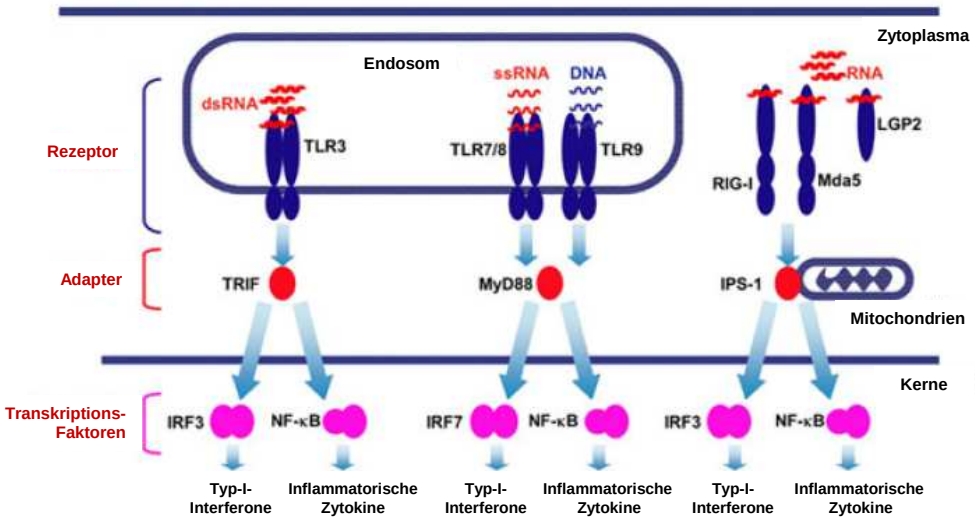

Abbildung 4: TLR- und RLR-Erkennung viraler Nukleinsäuren und ihre Signalwege von Kawai und Akira (2008)
Diese Abbildung zeigt die Erkennung von Nukleinsäuren über TLRs und RLRs sowie die entsprechenden vereinfachten Signalwege. Die Erkennung von dsRNA, ssRNA und DNA über die TLRs TLR3, TLR7 und TLR9 erfolgt im Endosom. RIG-I, MDA5 und LGP2 erkennen RNA im Zytoplasma. TLR3 nutzt TRIF als spezifischen Adapter, TLR7 und TLR9 hingegen MyD88. Die RLRs RIG-I und MDA5 verwenden IPS-1 als Adaptermolekül, das in der Mitochondrien-Membran lokalisiert wird. Sowohl der TRIF- als auch der IPS-1-abhängige Signalweg führen zu einer Aktivierung von IRF3 und NF-κB und somit zu einer Sekretion von Typ-I-Interferonen und inflammatorischen Zytokinen. Der MyD88-Signalweg aktiviert IRF7 und NFκB und führt ebenfalls zur Sekretion dieser Zytokine.

1.4.3 TLR7

TLR7 erkennt Imidazoquinoline (Imiquimod und Resiquimod) sowie einzelsträngige (ss) virale RNA (Diebold *et al.*, 2004; Heil *et al.*, 2004, 2003; Jurk *et al.*, 2002). Ss-RNA-Viren wie zum Beispiel der Influenza-Virus induziert eine TLR7-vermittelte Aktivierung von Immunzellen (Lund *et al.*, 2004). Virale RNA gelangt über die Rezeptor-vermittelte Endozytose in das Endosom, weil sie durch virale Hüllproteine geschützt wird. Die viralen Partikel werden im Endosom abgebaut, dadurch wird virale RNA frei, die wiederum von TLR7 erkannt werden kann. Endogene RNA entgeht der Erkennung durch TLR7, weil sie durch membrangebundene RNAsen schnell zerstört wird und nicht ins Endosom gelangt (Ishii *et al.*, 2005; Sugiyama *et al.*, 2005). TLR7 sowie TLR9 werden von plasmazytoiden dendritischen Zellen exprimiert, als Antwort auf virale Infektionen sekretieren sie große Mengen von Typ-I-Interferonen (Kawai und Akira, 2008). TLR7 erkennt Liganden über MyD88 wie die anderen TLRs, außer TLR3. MyD88 bildet Komplexe mit der IRAK-Familie, diese Komplexbildung aktiviert über weitere Moleküle NF-κB (Kawai und Akira, 2007). Die MyD88-Signalwege führen zu einer Aktivierung NF-κB, um die Sekretion von Typ-I-Interferonen und inflammatorischen Zytokinen zu induzieren (Kawai und Akira, 2008). Die Erkennung von ssRNA über TLR7 und der dazugehörige Signalweg über MyD88 wird in Abbildung 4 gezeigt.

1.5 RIG-I-like Rezeptoren

RLRs (RIG-I-*like* Rezeptoren) gehören zusammen mit den TLRs zur Familie der PRRs und erkennen virale RNA im Zytoplasma. RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*), MDA5 (*melanoma differentiation-asscociated gene 5*) und LGP2 (*laboratory of genetics and physiology 2*) zählen zu den RLRs (Kawai und Akira, 2008). RIG-I weist N-terminal zwei charakteristische *caspase recruitment*-Domänen (Card) auf, gefolgt von einer C-terminalen DexD/H-Box Helikase-Domäne. MDA5 besteht ebenfalls aus zwei CARDs und der DexD/H-Box RNA-Helikase-Domäne. LGP2 fehlen die CARDs, die Helikase-Domäne ist aber vorhanden (Yoneyama und Fujita, 2007). RIG-I und MDA5 erkennen unterschiedliche RNA-Viren im Zytoplasma. RIG-I erkennt Paramyxo-Viren, Influenza-Viren, Orthomixo-Viren und Japanische Encephalitis-Viren, MDA5 hingegen Picorna-Viren (Childs *et al.*, 2007; Fujita *et al.*, 2007; Kato *et al.*, 2006). Durch *in vitro*-Experimente konnte gezeigt werden, dass LGP2 eine inhibitorische Rolle in der RIG-I/MDA5-Signalgebung spielt (Yoneyama und Fujita, 2007; Yoneyama *et al.*, 2005).

Hornung *et al.* (2006) und Pichlmair *et al.* (2006) beschrieben, dass ein 5´-Triphosphat am Ende einer RNA, das durch virale Polymerasen generiert wird, für die RIG-I-vermittelte Erkennung von RNA-Molekülen verantwortlich ist. Die Erkennung der RNA durch RIG-I endet durch das Abtrennen des 5´Triphosphatrestes oder durch Nukleosidmodifikationen, wie es in posttranskriptionellen RNA-Prozessen bei Eukaryoten vorkommt. Die Helikasen RIG-I und MDA5 unterscheiden sich in ihrem Erkennungsmuster, während RIG-I nur kurze dsRNAs von 21 - 27 Nukleotiden ohne 3´-Überhang erkennt, erkennt MDA5 lange dsRNA, wie Poly I:C (Kato *et al.*, 2008).

RIG-1 und MDA5 nutzen den Interferon-β Promotor Stimulator 1 (IPS-1) als Adapter, der in den Mitochochondrienmembranen lokalisiert ist und eine N-terminale CARD enthält. (Kawai und Akira, 2008). IPS-1 ist ein Adapter, der in die MDA5 und RIG-1 vermittelen antiviralen Immunantworten verwickelt ist. Wenn IPS-1 mittels si-RNA herunterreguliert wird, verringert sich die antivirale Antwort auf dsRNA (Kawai *et al.*, 2005). Die TRIF- und IPS-1-abhängigen Signalwege führen zur Aktivierung von den Transkriptionsfaktoren IRF3 sowie NF-κB, um die entsprechende Typ-I IFN-Sekretion oder die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen zu veranlassen. Der Signalweg über MDA5 und RIG-I ist im Vergleich zu den Signalwegen über TLR3 und TLR7/8 in Abbildung 4 graphisch dargestellt (Kawai und Akira, 2008). IRF3 kontrolliert die Expression der Gene für die TypI-Interferone, NF-κB dagegen reguliert die Genexpression für die inflammatorischen Zytokine (Kawai und Akira, 2007).

1.6 PRR-vermittelte Immunmodulation

1.6.1 Poly I:C

Wie bereits beschrieben sind *Polyinosinic-polycytidylic*-Säuren (Poly I:C) eine synthetische Nachbildung viraler dsRNA und werden somit ebenfalls von TLR3 und MDA5 erkannt (Kato *et al.*, 2006; Kawai und Akira, 2007). Poly I:C aktiviert isolierte NK-Zellen in Anwesenheit von IL-12, dies erkannte Sivori *et al.* (2004) anhand der Aktivierungsmarker CD25 und CD69. NK-Zell-Funktionen wie die Zytotoxizität oder die IFN-γ-Sekretion, können durch Poly I:C in Anwesenheit von anderen Immunzellen oder Zytokinen wie IL-12 oder IFN-α aktiviert werden (Girart *et al.*, 2007; Sivori *et al.*, 2004). Die TLR3-Expression wird außerdem durch virale Infektionen und durch Poly I:C-Stimulation gesteigert (Farina *et al.*, 2005; Miettinen *et al.*, 2001).

Eine erhöhte MDA5-Expression konnte durch die Poly I:C-Stimulation bei Wörnle *et al.* (2009) für mesotheliale Zellen ebenfalls dargelegt werden. Gitlin *et al.* (2006) demonstrierte durch die Herstellung von MDA5-deffizienten Mäusen, dass der Rezeptor MDA5 für die TypI-IFN-Sekretion nach Stimulation mit Poly I:C *in vivo* und *in vitro*, bei DCs und Makrophagen, verantwortlich ist.

1.6.2 immunstimulatorische RNA

SiRNAs (small interfering RNAs) sind kurze doppelsträngige (ds) RNA-Moleküle, die in dem RNA-Interferenz-Signalweg wirken (Marques und Williams, 2005). Einige siRNA-Sequenzen lösen die Sekretion von IFN-α bei plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDCs) aus (Hornung *et al.*, 2005). Verschiedene immunstimulatorische Motive sind entdeckt worden. Heil *et al.* (2004) beschrieben, dass einzelsträngige Guanosin-(G-) und Uridin-(U-) reiche RNA-Oligonukleotide, die sich von HIV-1 ableiteten („ss-RNA40“), die IFN-α-Sekretion von dendritischen Zellen und Makrophagen stimulieren. Bei Judge *et al.* (2005) wurden sechzehn verschiedene siRNAs, die gegen GAPDH oder BP1 gerichtet waren und zusätzlich GU-reiche Sequenzmotive, die 5´-UGUGU-3´enthielten, charakterisiert. Diese Sequenzmotive sind in der Lage bei Mäusen *in vivo* und bei humanen PBMCs *in vitro* Interferone und inflammatorische Zytokine zu induzieren. Ein anderes immunstimulatorisches Sequenzmotiv, unabhängig vom GU-Gehalt, enthält 9 Basen (5´-GUCCUUCAA-3´) und wurde von Hornung *et al.* (2005) identifiziert. Weitere immunstimulatorische RNA-Sequenz-Motive wurden von Sioud (2006) entdeckt, die entweder GU-reich (5´-GUAGUGU-3´, 5´-GUGAUUGU-3´, 5´-GUCUACUUU-3´, 5´-GUUCUU-3´, 5´-GUUGGU-3´, 5´-UGCUAUUGGUGAUUGCCUCTT-3´) oder ohne GU-Reste sind (5´-GACUUGAGCGAGCGCUUUUTT-3´). Diese si-RNAs werden deshalb als immunstimulatorische (is) RNAs bezeichnet. Wahrscheinlich ist nicht nur der GU-Gehalt für die immunstimulatorische Wirkung der RNAs verantwortlich, andere Charakteristika wie beispielsweise die RNA-Struktur, die Basenposition,

die Anordnung der Basen der flankierenden Sequenzen sind in die Immunerkennung und in die Signalgebung durch die isRNAs involviert. Wie schon beschrieben können siRNA-Sequenzen, die dieses Motiv enthalten, die Zytokinsekretion in PDCs steigern. Immunstimulatorische Motive werden als einzelsträngige RNAs von Zellen des angeborenen Immunsystems besser erkannt als doppelsträngige. Sioud (2006) beschrieb diesen Effekt bei der Über-Nacht-Stimulation von PBMCs mit ss-siRNA und ds-siRNA unterschiedlicher Sequenzen.

Die Erkennung von einzelsträngigen RNAs erfolgt über TLR7 im Menschen und in Mäusen. Diese TLR7-Abhängigkeit wurde bereits für unterschiedliche ss-RNA-Sequenzen gezeigt (Bourquin *et al.*, 2007; Diebold *et al.*, 2004; Hornung *et al.*, 2005; Lund *et al.*, 2004). Alter *et al.* (2007) demonstrierte, dass die Aktivierung von NK-Zellen innerhalb isolierter PBMCs durch ssRNA40 über TLR7 und TLR8 läuft. Die NK-Zell-Aktivierung ist jedoch abhängig von direktem Zell-Kontakt mit PDCs oder Monozyten (Alter *et al.*, 2007). Außerdem ist zusätzlich bekannt, dass die TLR7-Stimulation von PDCs durch Uridin und Ribose, charakteristische Eigenschaften der RNA, ausgelöst wird (Diebold *et al.*, 2004). Darüber hinaus können kurze ssRNAs mit mehreren Uridinen als Agonisten von TLR7 Sequenz-unabhängig wirken (Diebold *et al.*, 2006).

1.6.3 weitere immunstimulatorische Agenzien

Um die Vielseitigkeit bekannter Immunmodulationen über TLRs zu demonstrieren, werden im folgenden zwei nicht in dieser Arbeit verwendeten immunstimulatorischen Agenzien vorgestellt.

Synthetische CpG-DNA stimuliert Immunzellen, wie B-Zellen und PDCs und führt zu einer immunologischen Kaskade verschiedener zellulärer Prozesse (Reifung, Differenzierung und Proliferation) in einigen Immunzell-Typen (Klinman *et al.*, 2004). Hartmann und Krieg (2000) ermittelten ein optimales humanes CpG-Motiv (5´-TCGTCGTT-3´), das zu einer B-Zell-Stimulation führt.

Die immunstimulatorische Funktion von isolierten NK-Zellen wird durch CpG-ODN nur in Anwesenheit von DCs induziert. Die IFN-α-Sekretion der PDCs ist für diese NK-Zellaktivität verantwortlich (Ballas, 2007). TLR9 and TLR7 sind für die Erkennung von CpG-Motiven verantwortlich und werden in PDCs sowie B-Zellen exprimiert (Hornung *et al.*, 2002).

OK-432 (Picibanil) ist ein Streptokokken-Agenz und wird bereits mehr als 30 Jahre klinisch eingesetzt. Aufgrund der Nebeneffekte wie Fieber, Schmerzen, Schwellungen Leukozytose und Thrombozytose wurde OK-432 mit Penicillin vervollständigt. Dieses Agenz wird in Taiwan und Korea zur Immuntherapie verschiedener bösartiger Tumoren, unter anderem auch bei HNSCC eingesetzt (Okamoto und Sato, 2003; Okamoto *et al.*, 2003). OK-432 vermittelt die Sekretion verschiedener Zytokine, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, IFN-α, TNF-α, G-CSF, and GM-CSF (Ryoma *et al.*, 2004). OK-PSA (eine aktive Komponente von OK-432), sowie OK-432, induzieren eine starke Th1-Antwort, steigern NK-Zell-

Aktivität und DC-Reifung und lösen einen Antitumor-Effect über TLR4 in Mäusen und Menschen aus (Okamoto und Sato, 2003; Okamoto *et al.*, 2000, 2003, 2004).

1.7 Tumor-*Escape*-Mechanismen

Der menschliche Körper ist abhängig von Kontroll-Systemen, die die Transformation von normalen Zellen zu unkontrolliert wachsenden Tumorzellen rechtzeitig erkennen und verhindern sollen (Malmberg und Ljunggren, 2006). Diese Tumorüberwachung zählt zu den Aufgaben von Immunzellen. Die Hauptaufgaben von Immuneffektorzellen wie B-, T-, NK- und NKT-Zellen sind die Produktion von Typ-I- und Typ-II-Interferonen sowie Perforinen und Granzymen für die Tumorüberwachung. Kontrollmechanismen dieser Immunzellen sind zum Beispiel die Erkennung von DNA-Schäden beziehungsweise das veränderte Wachstum und das Einleiten der Apoptose sowie die Eliminierung von Tumorzellen (Kim *et al.* 2007, Malmberg und Ljunggren 2006).

Der Wachstumsprozess von Tumorzellen wird als Immun-Editierung bezeichnet, dieser Prozess besteht aus drei Phasen: Eliminierung, Equilibrium und *Escape*. In der Eliminierungsphase werden sich entwickelnde Tumoren von Zellen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems zerstört. Scheitert das Immunsystem an der Eliminierung aller Tumorzellen, entwickeln sich die genetisch unstabilen Tumorzellen in der nächsten Phase, dem Equilibrium, durch zufällige Mutationen weiter und werden dadurch immunogen. Diese Phase ist die längste der drei Immun-Editierungs-Phasen. Als letzte Phase folgt die *Escape*-Phase, in dieser Phase erfolgt der Auswuchs der Tumorzellen, die der Erkennung durch das Immunsystem entfliehen können. Für Immun-*Escape* sind drei verschiedene Prinzipien bekannt (Abbildung 5): Die fehlende Erkennung durch Immunzellen, die mangelnde Anfälligkeit des Tumors und die Induktion der Immunsuppression (Malmberg und Ljunggren, 2006).

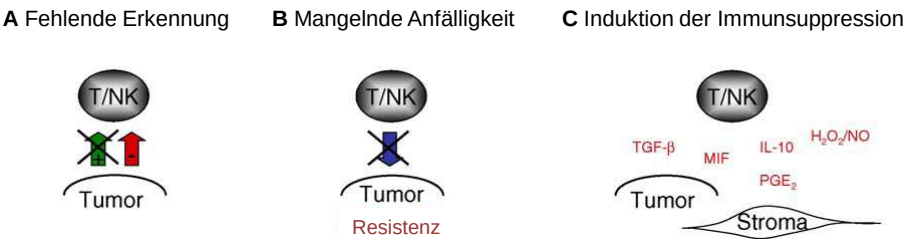

Abbildung 5: Tumor-*Escape*-Mechanismen von Malmberg und Ljunggren (2006)
Die drei Prinzipien des Immun-*Escape* sind hier dargestellt. A Durch die Fehlende Erkennung der Tumorzellen durch die Immunzellen erfolgt die Abnahme der Aktivierung (grüner Pfeil) und die Zunahme der Inhibierung (roter Pfeil). B Bei der mangelnden Anfälligkeit werden Tumorzellen unempfindlich gegenüber den Effektormechanismen von NK-Zellen oder zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL). C Die Induktion der Immunsuppression beinhaltet die Sekretion vielfältiger immunsuppressiver Zytokine, die zur Dysfunktion der Immunzellen führt.

Beim Prinzip der fehlenden Erkennung von Tumorzellen durch Immunzellen kommt es wahrscheinlich zu einer Verschiebung der Balance von aktivierenden und inhibierenden Signalen zu Gunsten der Inhibierung (Abbildung 5). Außerdem ist die Präsentation von Tumorantigenen durch genetische Veränderungen der entsprechenden Gene gestört. Die Herunterregulierung der HLA I (Humanes Leukozyten Antigen Typ-I)-Expression und die gleichzeitige Überexpression des Fas-Liganden in Tumorzellen führen zur fehlenden Erkennung durch Immunzellen. Der Tumor entkommt beispielsweise der Erkennung durch T-Lymphozyten, weil durch die Bindung von Fas und den Fas-Liganden des Tumors bei den T-Lymphozyten Apoptose induziert wird. Bei durchschnittlich 50 % aller HNSCC-Fälle wurde das Fehlen von HLA-Klasse-I-Molekülen festgestellt, dieser Prozess korrellierte mit der Entstehung regionaler Lymphknotenmetastasen (Young 2006, Campoli und Ferrone 2008). Das zweite Prinzip ist die mangelnde Anfälligkeit von Tumorzellen gegenüber Immunfunktionen und Apoptose. Unterschiedliche humane Tumoren, unter anderem Melanome und Brustkrebs, exprimieren den Serin-Protease-Inhibitor (PI-9), der dafür bekannt ist, Granzym B zu inhibieren. Cathepsin B ist eine Cystein Proteinase, die ebenfalls von Tumoren gebildet wird und Perforin inaktiviert. Durch diese Inhibierungen der Effektorproteine entkommt der Tumor einer Immunantwort aufgrund der mangelnden Anfälligkeit (Malmberg und Ljunggren, 2006). In gesunden Zellen wird Apoptose bei zellulärem Stress induziert. Durch genetische Veränderungen von Tumorsuppressorgenen wie beispielsweise p53, die bei Stress-Signalen Apoptose induzieren und bei DNA-Schäden Proteine für die DNA-Reparatur zur Verfügung stellen, wird die Anfälligkeit von Tumoren ebenfalls vermindert (Harris und Levine, 2005). Die Induktion der Immunsuppression, das dritte Prinzip der Immun-*Escape*-Mechanismen und die damit verbundene Induktion von Immun-Dysfunktionen durch die Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*), PGE2 (Prostaglandine E2), TGF-ß (*tumour growth factor*-ß), IL-6, M-CSF (*Macrophage colony-stimulating factor*) oder IL-10, führen zum Beispiel zur Unterdrückung der Reifung von DCs und blockieren die entsprechende Antigenpräsentation, die für die T-Zell-Antwort notwendig ist (Loose und de Wiele, 2009). Bei Patienten mit fortgeschrittenem HNSCC, verglichen mit gesunden Spendern oder Patienten mit geringen Erkrankungen, nimmt die Th1-Antwort ab, während die Th2-Antwort zunimmt (Sparano *et al.*, 2004). HNSCC verschiebt somit die Th1-Antworten der Immunzellen zu Th2-Antworten, die das Tumorwachstum fördern (Pries *et al.*, 2006).

1.8 Der Einfluss von HNSCC auf Immunzellen

In Kapitel 1.7 wurden bereits die von Tumoren entwickelten *Tumor-Escape*-Mechanismen beschrieben. Bei HNSCC wurden ebenfalls verschiedene dieser Strategien entdeckt. Der Wechsel von normalen Zellen zu transformierten HNSCC-Zellen begleitet eine Veränderung der Empfindlichkeit gegenüber in-

flammatorischen Zytokinen (Douglas *et al.*, 2004). Außerdem kommt es bei HNSCC zu einer Verschiebung der Immunantwort von Th1 zu Th2. Patienten mit HNSCC weisen erhöhte Zytokinlevel von IL-4, IL-6 und IL-10 sowie abnehmende Level von IFN-γ auf. Die Ausschüttung der Zytokine IL-4, IL-6 und IL-10 des Tumors, bringt die Immunzellen dazu weniger Th1-Zytokine und vermehrt Th2-Zytokine zu sekretieren. Je stärker die Krankheit fortgeschritten ist, desto weiter verschiebt sich die Zytokinantwort in Richtung Th2 (Lathers und Young, 2004).

Isolierte PBMCs aus HNSCC weisen *in vitro* eine geringere Proliferationsfähigkeit von T-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen auf. Hierbei korrelierte die Prognose für den Patienten mit dem Level der eingeschränkten Proliferationsfähigkeit (Heimdal *et al.*, 1999). Bösartige Zellen wie HNSCC entkommen einer Immunantwort, indem die Level von CD3+-, CD4+- und CD8+-T-Lymphozyten reduziert werden. Diese veränderten T-Zell-Level werden noch einige Jahre nach resektiven Operationen beibehalten (Kuss *et al.*, 2004). Bose *et al.* (2008) beschrieb darüber hinaus, dass innerhalb der PBMC-Population von Patienten mit HNSCC die $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zellen, die $CD3^-CD56^+CD16^+$-NK-Zellen und die $CD3^+CD56^+$-NKT-Zellen herunterreguliert wurden, während $CD4^+CD25^+Foxp3^+$-Zellen hochreguliert wurden. Zusätzlich bestätigte Bose *et al.* (2008) die verminderte Sekretion von Th1-Zytokinen wie IFN-γ, IL-12 und TNF-α in Patienten mit HNSCC.

Young (2006) fasste die in HNSCC vorkommenden Tumor-Escape-Mechanismen zusammen. Zum Einen entkommt der Tumor der Immunerkennung durch das Herunterregulieren von MHC KlasseI-Molekülen und durch T-Zell-Apoptose, vermittelt durch die Fas-Fas-Ligand-Interaktion (siehe Kapitel 1.7). Zum Anderen wird die Immunabwehr aufgrund der Produktion von PGE_2, TGF-β, IL-10 und VEGF direkt inhibiert. Darüber hinaus wird durch den Tumor die Entstehung von Immunsuppressorzellen des eigenen Körpers induziert, wie beispielsweise Makrophagen, Dendritische Zellen, T-Zellen (T_{reg} und Th2) sowie $CD34^+$-Vorläuferzellen. Obwohl die Aktivierung von Makrophagen die Fähigkeit induziert, Tumorzellen zu zerstören, können diese tumor-assoziierten Makrophagen die Aktivität von Effektorzellen des Immunsystems gegen HNSCC inhibieren (Young, 2006).

1.9 Immuntherapien in HNSCC

Die Therapie von HNSCC umfasst Operationen, Radiotherapien und Chemotherapien, die Überlebensrate der Patienten wurde in den letzten Jahren jedoch nicht deutlich verbessert. Immuntherapien stellen einen neuen Lösungsweg bei der Behandlung von HNSCC dar. Es sind sowohl aktive als auch passive Immuntherapien bekannt. Jede dieser beiden Kategorien kann in spezifische und unspezifische Therapien unterteilt werden. In den 1980ern starteten Immuntherapien mit Zytokinen, die jedoch nur einen eingeschränkten Erfolg erzielten. IL-2 und IFN-α waren die ersten verwendeten Zytokine in der The-

rapie von HNSCC (Ensley *et al.*, 2003). Bei van Herpen *et al.* (2005) wurde IL-12 in den Primärtumor injiziert, diese Injektion führte unter anderem zu einer erhöhten IFN-γ-Sekretion. Allerdings wirkten höhere Dosen des Zytokins wie auch bei anderen Studien toxisch. Es existieren ebenfalls Versuche eine Zytokin-Therapie mit einer Chemotherapie zu kombinieren. Timar *et al.* (2005) verwendete eine lokale neoadjuvante Leukozyten-Interleukin- (LI-) Injektion bei Patienten mit HNSCC. Die Behandlung beinhaltet 800 Units LI zusammen mit Cyclophosphamid, Indomethacin, Zink und Multivitaminen pro Tag, über 3 Wochen, an fünf Tagen in der Woche. Die Patienten besaßen eine veränderte Zusammensetzung Tumor-infiltrierender mononukleärer Zellen, ein erhöhtes CD4/CD8-Verhältnis sowie erhöhtes Tumor-Stroma zum epithelialen Anteil (Timar *et al.*, 2005). P53 ist eines der am häufigsten mutierten Gene in allen Krebsarten, HNSCC eingeschlossen. Deshalb ist ein weiterer Therapieansatz das Einbringen von Wild-Typ-P53-Genen, was signifikante Effekte zur Folge hat (Agada *et al.*, 2009). Die Verwendung von monoklonalen Antikörpern in Krebstherapien wurde bereits mehrfach beschrieben und bei Cragg *et al.* (1999) zusammengefasst. Spezifische zelluläre Tumortherapien sind bei HNSCC nicht möglich, weil spezifische Antigen-Ziele auf HNSCC-Zellen nicht bekannt sind (Ensley *et al.*, 2003). Bei HNSCC wird EGFR in frühen Stadien der Tumorentwicklung überexprimiert. Deshalb wurden monoklonale blockierende Antikörper gegen EGFR entwickelt, die als Cetuximab (Erbitux) bezeichnet werden. Die unterstützende Behandlung mit Cetuximab führte zu effektiveren Ergebnissen der Strahlungstherapie (Agada *et al.*, 2009). Eine Vielzahl von „*small molecule* Medikamenten“, wie Tyrosin-Kinase-Inhibitoren, die für die Krebstherapie vielleicht wichtiger werden als Antikörper, befinden sich in der Entwicklungsphase (Agada *et al.*, 2009). Die Immuntherapie in Kombination mit konventionellen Therapien ist am vielversprechendsten (Agada *et al.*, 2009).

Obwohl bereits viele Immuntherapie-Strategien getestet wurden, gibt es bis zum jetzigen Zeitpunkt keinen Therapieansatz, der ohne konventionelle Therapien die absolute Heilung verspricht.

1.10 Ziel dieser Arbeit

Natürliche Killer- (NK-) Zellen sind wichtige Effektorzellen des angeborenen Immunsystems und sind in der Lage, Tumorzellen und virus-infizierte Zellen ohne vorherigen Kontakt direkt zu lysieren und Zytokine zu sekretieren, um mit anderen Immunzellen zu interagieren (Trinchieri, 1989). NK-Zellen können darüber hinaus in zwei Subpopulationen unterschieden werden, die immunregulatorischen $CD56^{bright}$-NK-Zellen und die zytotoxischen $CD56^{dim}$-NK-Zellen (Caligiuri *et al.*, 1990).

Bei HNSCC-Patienten ist bereits bekannt, dass die Funktionen des Immunsystems stark unterdrückt werden und dass eine Vielzahl immunsuppressiver Zytokine im HNSCC-Milieu dafür verantwortlich sind (Pries und Wollenberg, 2006). HNSCC hat vielfältige Strategien entwickelt, um einer effizienten

Immunantwort zu entgehen (Young, 2006). Deshalb sollte in dieser Arbeit sowohl der Einfluss des HNSCC-Milieus auf NK-Zellen als auch die immunstimulatorischen Eigenschaften von RNA (Poly I:C und ss-isRNA) untersucht werden. Die Arbeit gliederte sich in drei Teile:

1. Einfluss von HNSCC auf NK-Zellen und ihre Funktionen

   Um den Einfluss des HNSCC-Milieus auf NK-Zellen zu untersuchen, sollten diese mit HNSCC-Milieu inkubiert und durchflusszytometrisch auf verschiedene Rezeptoren, unter anderem *Toll-like*-Rezeptoren und *RIG-I-like*-Rezeptoren untersucht werden. Durch vergleichende Analysen der zirkulierenden $CD56^{bright}$-NK-Zellen im peripheren Blut von Tumorpatienten und von gesunden Spendern, sollte der Einfluss des *in vivo*-HNSCC-Milieus genauer analysiert werden. Bei Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (Xie *et al.*, 2007) wurde die Internalisierung von TLR3 als Antwort auf das HNSCC-Milieu beobachtet, außerdem wurden antagonistische Effekte von Poly I:C beschrieben. Die Internalisierung sollte in dieser Arbeit bestätigt werden.

2. Poly I:C als immunstimulatorisches Agenz

   Die Aktivierbarkeit von Poly I:C mittels durchflusszytometrischer Analysen mit dem Aktivierungsmarker CD69 sollte zu Beginn durchgeführt werden. Da bereits gezeigt werden konnte, dass die 24-stündige Inkubation mit Poly I:C nur in Anwesenheit von Zytokinen die Zytokinsekretion induziert (Girart *et al.*, 2007), sollte in dieser Arbeit die alleinige Stimulation mit Poly I:C sowie die Auswirkungen auf die Zytokinsekretion nach 48-stündiger Inkubation analysiert werden. Die Rezeptoren TLR3 und MDA5, die für die Erkennung von Poly I:C verantwortlich sind, sollten ebenfalls erforscht werden.

3. ss-isRNA als immunstimulatorisches Agenz

   Ss-isRNA (*single-stranded immunostimulatory* RNA) wurde bei Hornung *et al.* (2005) beschrieben, die Stimulation mit ss-isRNA führt zu einer Steigerung der Interferon-α -Sekretion bei PDCs. Da die beschriebene ss-siRNA in PDCs starke Immun-Funktionen auslöste, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob ss-isRNA ebenfalls NK-Zell-Funktionen aktivieren kann. Zuerst wurde durch Zell-Proliferationstests (MTT) überprüft, ob ss-isRNA auf das Wachstum von HNSCC-Zellen wirkt. Im Anschluss sollte der Einfluss von ss-isRNA auf isolierte NK-Zellen analysiert werden, zu diesem Zweck wurde die Zytotoxizität sowie die Zytokinsekretion als Antwort auf die Stimulation mit ss-isRNA untersucht. Darüberhinaus war es interessant, den Einfluss des immunsuppressiven HNSCC-Milieus auf die Aktivierbarkeit von NK-Zellen durch ss-isRNA zu beobachten und somit zu überprüfen, ob ss-isRNA als immunstimulatorisches Agenz gegen HNSCC in Frage kommt. Es ist bekannt, dass ss-RNA von Immunzellen über TLR7 erkannt wird, dieser Effekt sollte für die Erkennung von ss-isRNA in NK-Zellen bestätigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Geräte

Durchflusszytometer FACS Canto	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
MoFlo™ Cell Sorter	Dako, Glostrup (DK)
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss GmbH, Göttingen
Axio Cam MRn	Carl Zeiss GmbH, Göttingen
Bioplex System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Shandon Cytospin Centrifuge 3	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham (MA, USA)
Microplate Spectrophotometer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Vakuum - Absauggerät	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Biophotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Imagingsystem Gel-Dok XR	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

2.1.2 Software

Quantity One	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Zeiss AxioVision Rel. 4.7 Software	Zeiss, Jena
BD FACS Diva	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
FlowJo	Tree Star Inc., Ashland (OR, USA)
FCAP™ Array Software	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
Bio-Plex-Manager Software	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Microsoft Office 2007	Microsoft Corporation, Redmont (WA, USA)
CorelDRAW 12	Corel Corporation, Fremont (CA, USA)

2.1.3 Chemikalien

Antikörper-Verdünnungs-Puffer	DCS, Hamburg
Aqua Spüllösung	Delta Select, Dreieich
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
BLOCK-iT™ Fluorescent Oligonukleotid	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DAPI	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol	Apotheke UK-SH Campus Lübeck
FACSFlow™	Becton & Dickinson, Heidelberg
Fluoromount G	SouthernBiotech, Birmingham (AL, USA)
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Lipofectamin™ 2000	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Lymphocyte Separation Medium	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)
Methanol	JTBaker, Griesheim
MitoTracker® Orange CMTMRos	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Mycoplasma-Off®	Minerva Biolabs GmbH, Berlin
Opti-MEM®	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saponin	Fluka, Buchs (CH)
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories, Pasching (A)
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Weitere verwendete Chemikalien stammen von Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Sigma-Aldrich, Steinheim, und FLUKA, Buchs (CH).

2.1.4 Puffer und Lösungen

Die aufgeführten Puffer und Lösungen wurden mit bi-destilliertem Wasser angesetzt.

MACS-Puffer	1 $\times$ PBS
	20 mM EDTA
	4 % FKS

	ph 7,4
Permeabilisierungspuffer	1 % FCS
	0,1 % Saponin
	PBS
	ph 7,4 - 7,6

2.1.5 Medien und Zusätze

Zellkulturmedium mit Zusätzen für adhärente Zellen

500 ml DMEM (*Dulbecco´s modified Eagle´s Medium*)	
+ 4,5 g/l D-Glucose	
+ L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)
10 % FKS inaktiviert	GIBCO, New York (CT, USA)
1 mM Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Steinheim
1 × NEA (nicht essentielle Aminosäuren)	GIBCO, New York (CT, USA)
25 mM HEPES	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)

Einfriermedium für adhärente Zellen

20 % FKS	GIBCO, New York (CT, USA)
10 % DMSO (Dimethylsulfonat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
70 % DMEM	
+ 4,5 g/l D-Glucose	
+ L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)

Zellkulturmedium mit Zusätzen für Suspensionszellen

RPMI 1640	
+ L-Glutamin	
+ Phenolrot	PAA Laboratories GmbH, Pasching (A)
10 % FKS inaktiviert	GIBCO, New York (CT, USA)
1 mM Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, Steinheim

1 × NEA (nicht essentielle Aminosäuren)	GIBCO, New York (CT, USA)

2.1.6 *Kits*

Annexin V-FITC Apoposis detection kit	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
AP Conjugate Substrate Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bio-Plex calibration kit	Bio-Rad Laboratories, Hercules (CA, USA)
Bio-Plex cytokine reagent kit	Bio-Rad Laboratories, Hercules (CA, USA)
Bio-Plex human serum diluent kit	Bio-Rad Laboratories, Hercules (CA, USA)
Bio-Plex validation kit	Bio-Rad Laboratories, Hercules (CA, USA)
CBA Human Immunoglobulin Flex-Set	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	Promega, Mannheim
Human Cytokine Th1/Th2 Assay	Bio-Rad Laboratories, Hercules (CA, USA)
In Vitro Toxicologie Assay Kit (MTT-Test)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs GmbH, Berlin
NK Cell Isolation Kit - negative selection	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach

2.1.7 Zelllinien

Tabelle 5: Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
PCI-1	Humanes Plattenepithelkarzinom, Hypopharynx; adhärent	University of Pittsburgh Cancer Institut, Pittsburgh (PA, USA) (Heo *et al.*, 1989)
PCI-13	Humanes Plattenepithelkarzinom, Hypopharynx; adhärent	University of Pittsburgh Cancer Institut, Pittsburgh (PA, USA) (Heo *et al.*, 1989)
BHY	humanes Plattenepithelkarzinom, Oropharynx (hochdifferenziert); adhärent	DSMZ, Braunschweig #ACC404

2.1.8 Antikörper

Tabelle 6: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Isotyp	Fluorochrom	Referenz
Anti-CD16	Maus IgG1, κ	FITC	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
Anti-CD16	Maus IgG1, κ	APC	AbD Serotec, Düsseldorf
Anti-CD56	Maus IgG2b, κ	PE-Cy7	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
Anti-CD56	Maus IgG2b, κ	PE	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
Anti-Perforin	Maus IgG2b, κ	FITC	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
Anti-Granzym B	Maus IgG1, κ	FITC	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
Anti-MDA-5	Kaninchen IgG	purified	Novus Biologicals, Littleton (CO, USA)
Anti-CD69	Maus IgG1, κ	FITC	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
Anti-TLR1	Maus IgG1, κ	PE	eBioScience Inc., San Diego (CA, USA)
Anti-TLR2	Maus IgG2a,κ	PE	eBioScience Inc., San Diego (CA, USA)
Anti-TLR3	Maus IgG1, κ	PE	eBioScience Inc., San Diego (CA, USA)
Anti-TLR4	Maus IgG2a,κ	PE	eBioScience Inc., San Diego (CA, USA)
Anti-TLR5	Maus IgG2a,κ	PE	ImGenex, San Diego (CA, USA)
Anti-TLR6	Maus IgG1, κ	FITC	ImGenex, San Diego (CA, USA)
Anti-TLR7	Kaninchen IgG	FITC	AbCam, Cambridge (UK)
Anti-TLR7	Kaninchen IgG	purified	ImGenex, San Diego (CA, USA)
Anti-TLR8	Maus IgG1, κ	PE	ImGenex, San Diego (CA, USA)
Anti-TLR9	Maus IgG1, κ	FITC	ImGenex, San Diego (CA, USA)
Anti-TLR10	Maus IgG	purified	Stratagene, La Jolla (CA, USA)
Anti-Maus	Ziege	PE	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)
Anti-Kaninchen	Ziege	FITC	BD Biosciences, San Jose (CA, USA)

Tabelle 7: Antikörper für die Immunhistochemie

Bezeichnung	eingesetzte Konzentration	Wirt	Referenz
CD16	1:50	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz (CA, USA)
CD56	1:400	Maus	US Biological, Swampscott (MA, USA)
MDA5	1:100	Kaninchen	Novus Biologicals, Littleton (CO, USA)
TLR 3	1:20	Kaninchen	Abgent Inc., San Diego (CA, USA)

Fortsetzung

Bezeichnung	eingesetzte Konzentration	Wirt	Referenz
Sekundär-Antikörper			
Anti-Kaninchen-Cy3	1:200	Ziege	Jackso ImmunoResearch/Dianova, Hamburg
Anti-Maus-Cy2	1:100	Ziege	Jackso ImmunoResearch/Dianova, Hamburg

2.1.9 Blut- und Gewebeproben

Blutproben von gesunden Patienten

Die Blutproben von gesunden Spendern wurden in aufkonzentrierter Form als *buffy coats* von der Blutbank des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Lübeck zur Verfügung gestellt. Als Blutspender stellten sich 18 bis 65-jährige gesunde Frauen und Männer zur verfügung, die auf HIV, Hepatitis B und C Virus negativ getestet worden sind. Aus datenschutzrechtlichen Gründen waren von den Spendern und Spenderinnen nur die Blutgruppe und die Befunde auf Nachweis von Antikörpern gegen das Cytomegalievirus (CMV) bekannt.

Blut- und Gewebeproben von Tumorpatienten

Die in Tabelle 8 aufgeführten Blut- bzw. Gewebeproben wurden von Patienten der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde & Plastische Operationen des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck zur Verfügung gestellt. Alle Patienten haben oder hatten verschiedenartige Tumoren im Kopf-Hals-Bereich. Aus datenschutzrechtlichen Gründen werden die Namen der Patienten durch Nummern ersetzt.

Tabelle 8: Blut- und Gewebeproben von Tumorpatienten

Patienten-Nr.	Alter, Geschlecht	TNM-Stadium	Tumor-stadium	Erst-Diagnose	Lokalisation
T290	65 / M	pT3 pN1 cM0	III	12/04	Oropharynx
T292	56 / M	pT1 N2b M0	III	04/97	Oropharynx
T293	55 / M	cT4 cpN2 cM	III	11/05	Hypopharynx
T346	52 / M	pcT4 pcN2b cM0	III	06/06	Oropharynx
T348	49 / W	pT4 N2a M1	IV	05/06	Oropharynx
T356	57 / M	pT1 cN0 cM0	I	07/04	Larynx
T358	64 / M	pT1 pN2c cM0	III	10/05	Larynx
T360	54 / W	pT1 pN2b cM0	III	11/05	Oropharynx

Fortsetzung

Patienten-Nr.	Alter, Geschlecht	TNM-Stadium	Tumor-stadium	Erst-Diagnose	Lokalisation
T364	64 / M	pT3 pN0 cM0	III	10/01	Larynx
T366	68 / M	cT2 cN2b cM0	III	02/04	Oropharynx
T368	77 / M	pT2 pN2b cM0	III	01/05	Oropharynx
T371	62 / M	pT3 pN0 cM0	III	06/05	Mundhöhle
T374	70 / M	pT2 cN0 cM0	II	04/05	Larynx
T378	56 / M	cT4 cN2c cM0	III	01/06	Hypopharynx
T382	76 / M	pT3 pN0 cMx	III	10/89	Larynx
T383	64 / M	cT4 cN2c cM0	III	07/06	Hypopharynx
T399	64 / M	cT2 cN1 cM0	II	10/01	Larynx
T404	60 / M	cT? cN2 cM1	IV	01/07	CMP-Syndrom
T406	74 / M	cT3 cN0 cM0	IV	01/07	Adenokarzinom
T411	58 / M	pT2 cN0 cM0	II	10/06	Larynx
TB474	55 / M	pT2 pN2c cM0	III	10/03	Oropharynx, Rezidiv
TB489	56 / M	pT2 pN1 cM0	III	3/01	Mundhöhle
TB490	60 / M	pT1 cN0 cM0	I	1/07	Larynx, Rezidiv
TB496	52 / M	pT2 cN0 cM0	II	11/05	Larynx
TB497	67 / M	rpT3 rpN0 cM0	III	06/00	Larynx, Rezidiv
TB498	59 / M	pT1b cN0 cM0	I	02/07	Larynx, Rezidiv
TB517	55 / W	pT1 pN2c cM0	III	06/05	Hypopharynx
TB518	61 / M	pT1 pN0 cM0	I	93	Larynx
TB519	59 / M	pT1 pN0 cM0	I	93	Larynx
TB551	69 / M	pT2 pN0 pM0	II	04/03	Oropharynx
TB565	64 / M	T1a cN0 cM0	I	9/02	Larynx
TB566	50 / M	pT2 pN2b cM0	III	06/07	Oropharynx
TB567	65 / M	cT4 cN2c cM0	III	09/07	Oropharynx
TB568	71 / M	T1a cNx cM0	I	09/07	Larynx
TB570	62 / M	pT3 pN0 cM0	III	99	Mundhöhle
TB572	48 / W	pT3 pN2c cM0	III	01/03	Larynx
TB586	67 / M	pT3 pN1 cM0	III	10/07	Hypopharynx
TB587	77 / M	pT4 pN0 cM1	IV	06/06	Larynx
TB588	59 / M	rpT3 rpN2b cM0	III	05/07	Hypopharynx
TB590	55 / M	pT2 pN0 cM0	II	10/02	Larynx
TB591	62 / M	pT1 pN0 cM0	I	04/00	Mundhöhle
TB592	56 / M	cT4 cN1-2b Mx	III-IV	11/07	Alveolarfortsatz
TB593	53 / M	cT3 cN2b cM0	III	10/07	Hypopharynx
TB594	76 / W	cT2-3 cN0-1 cMx	II-III	11/07	Mundhöhle
TB595	52 / M	cT1 cN0 cM0	I	11/07	Mundhöhle
TB597	53 / M	cT4 cN0 cM0	III	11/07	Oropharynx
TB600	50 / M	cT4 cN2c CM0	III	12/07	Mundhöhle
TB610	43 / M	cT2 cN0 cM0	II	01/08	Mundhöhle
TB611	49 / M	cT4a cN2c cM0	III	01/08	Oropharynx
TB613	52 / M	cT2 cN2b cM0	III	01/08	Oropharynx
TB615	75 / M	cT4a cN2c cMx	III-IV	01/07	Larynx
TB616	65 / M	cT3 cN2b cM0	III	06/05	Larynx

Fortsetzung

Patienten-Nr.	Alter, Geschlecht	TNM-Stadium	Tumor-stadium	Erst-Diagnose	Lokalisation
TB617, siehe T399	66 / M	cT2-3 cNx cMx	II-III	10/01	Larynx, Rezidiv
TB618	85 / W	pT4 pN0 cM0	III	05/07	Parotis
TB621	46 / M	pT1 cN2c cM0	III	10/06	Nasopharynx-Ca
TB622	66 / M	pT2 cN0 cM0	II	07/02	Oropharynx
TB623	70 / M	cT2 cN2b cM0	II	10/04	Oropharynx
TB626	56 / M	pT3 pN1 cM0	III	07/04	Larynx
TB627	67 / M	pT2 pN0 cM0	II	04/07	Larynx
TB628	64 / M	cT3 cN1 cM0	III	04/08	Larynx
TB629	58 / M	cT3 cN2c cMx	III-IV	03/08	Oropharynx
TB630	58 / M	pT1 cN2 cM0	III	05/07	Oropharynx, Rezidiv
TB631	76 / W	cT2 cN0 cM0	II	02/08	Alveolarfortsatz
TB634	73 / M	pT1 cN0 cM0	I	02/08	Mundhöhle
TB635	44 / M	cT3 cN0 cM0	III	02/08	Mundhöhle
TB636	53 / W	cT1 cN2c cM0	III	04/07	Larynx
TB637	61 / M	pT2 pN1 cM0	III	08/03	Mundhöhle
TB638	66 / M	pT3 pN2b cM0	III	07/07	Oropharynx
TB639	65 / M	pT3 pN0 cM0	III	09/02	Hypopharynx, Rezidiv
TB640	59 / M	cT4 cN2c cMx	III-IV	08/08	Larynx, Rezidiv
TB641	64 / M	pT3-4 pN2b cM0	III	03/08	Larynx
TB645	70 / M	T3 N2 cM0	III	06/04	Nasopharynx, Rezidiv
TB646	58 / M	cT3 cN2c cM	III	03/08	Oropharynx
TB647	50 / W	cT2 cN0 cM0	II	03/08	Mundhöhle
TB648	65 / M	cT1 cN0 cM0	I	03/08	Alveolarfortsatz
TB654	40 / M	cT1 cN0 cM0	I	04/08	Mundhöhle
TB655	74 / M	pT1 cN0 cM0	I	07/03	Mundhöhle, Rezidiv
TB657	69 / M	cT1 cN0 cMx	I	07/07	Larynx
TB658	61 / M	pT1 pN0 cM0	I	07/06	Larynx
TB659	60 / M	pT2 pN2b cM0	III	11/03	Larynx
TB660	62 / W	pT4a pN2b cM0	III	10/07	Oropharynx
TB662	66 / M	cT1 N2b M0	III	04/05	Oropharynx
TB663	52 / M	cT2 cN0 cM0	II	03/08	Mundhöhle
TB664	53 / M	pT1 pN1 cM0	III	1999	Oropharynx
TB669	53 / M	pT4 pN2b cM0	III	04/05	Larynx
TB670	55 / M	cTx cN2bc cM0	III	01/06	Hypopharynx
TB672	59 / M	pT2 pN0 cM0	II	09/06	Larynx
TB673	73 / W	pT2 pN2b cM0	III	06/05	Oropharynx
TB674	58 / M	cT1 cN2b cM0	III	06/07	Larynx
TB675	61 / M	cT1 cN0 cM0	I	04/08	Mundhöhle
TB676	68 / M	cT4 cN2b cM1	III	02/08	Hypopharynx
TB677	65 / M	pT3 pN0 cM0	III	07/07	Oropharynx, Rezidiv
TB678	47 / M	pT4 cN2b cMx	III	04/08	Wangenschleimhaut
TB679	56 / W	cT4 cN2 cM0	III	09/06	Nasopharynx
TB680	64 / M	pTx pN2a cM0	III		CUP
TB681	67 / M	pT2 pN0 cM0	II	10/05	Mundhöhle, Rezidiv

Fortsetzung

Patienten-Nr.	Alter, Geschlecht	TNM-Stadium	Tumor-stadium	Erst-Diagnose	Lokalisation
TB685	68 / M	cT4 N0 M0	III	90	Nasopharynx, Rezidiv
TB687	70 / M	cT1a cN0 cM0	I	05/08	Larynx
TB688	60 / M	cT4 cN0 cM0	III	08/08	Oropharynx
TB689	62 / M	cT4 cN3 cM0	III	06/07	Mundhöhle
TB690	57 / M	pT3 pN0 cM0	III	09/07	Larynx
TB691	67 / M	pT1 pN0 cM0	I	98	Mundhöhle
TB692	57 / M	pT2 pN2b cM0	III	03/01	Mundhöhle
TB693	50 / M	pT3 pN2b cM0	III	11/02	Oropharynx
TB701	66 / M	cTx cN3 cM0	III	05/08	CUP
TB702	71 / W	pT1 pN1 cM0	III	08/06	Oropharynx
TB703	43 / W	pT2 pN1 cM0	III	01/07	Oropharynx
TB704	56 / M	pT4 pN2c cM0	III	12/06	Larynx
TB705	66 / M	pT2 pN1 cM0	III	11/97	Oropharynx
TB706	52 / M	pT1 cN0 cM0	I	08/04	Larynx
TB707	57 / M	cT4 cN1-2 cMx	III-IV	11/07	Alveolarfortsatz
TB811	67 / M	cT3 cN2b cMx	III-IV	11/07	Hypopharynx
TB816	43 / M	cT4a cN2c cM0	III	12/08	Mundhöhle
TB817	62 / M	cT2 cN1 cM?	III	01/09	Alveolarfortsatz
TB823	80 / M	cT3 cN0 cM0	III	12/08	Ohrmuschel
TB835	52 / M	cT4 cN2c cM0	III	01/09	Tonsille
TB838	74 / M	cT3-4 cN0 cM0	III	02/09	Alveolarfortsatz
TB895	60 / M	cT3 cN2b/c cM0	III	05/09	Oropharynx
TB902	61 / W	cT4 cN1 cM0	III	05/09	Larynx
TB912	77 / M	pT4 pN2c Tx	III-IV	06/09	Mundhöhle

2.2 Angewandte Methoden

2.2.1 Zellkultur

Kultivierung von HNSCC-Zelllinien

Die adhärenten HNSCC-Zelllinien wurden bei 37 ℃ und 5 % CO_2 im Brutschrank unter Verwendung von Zellkulturmedium mit Zusätzen für adhärente Zellen kultiviert. Für die Subkultivierung wurden die Zelllinien bei einer Konfluenz von 70-80 % mit Trypsin-EDTA von den Zellkulturflaschen abgelöst, in DMEM resuspendiert und zum Pelletieren zentrifugiert (200 × g, 8 min, 30℃). Nach dem Resuspendieren des Zellpellets wurde die gewünschte Verdünnung der Zellsuspension in neue Zellkulturflaschen überführt. Die Zelllinien wurden in regelmäßigen Abständen mit dem Mycoplasma Detection Kit auf Mycoplasmen-Kontaminationen untersucht. Zur Langzeit-Aufbewahrung wurden die Zelllinien im Ver-

hältnis 1:1 mit einem 2-fach konzentriertem Einfriermedium versetzt und in Kryoröhrchen (SARSTEDT) unter Verwendung eines mit Isopropanol gefüllten Einfrierkarussels bei -80 ℃ eingefroren.

2.2.2 Zellisolierung

Isolierung von PBMCs

Zur Isolierung von humanen PBMCs gesunder Spender wurden *buffy coats* 1:4 mit PBS verdünnt und auf 20 ml Ficoll -Lösung (Lymphocyte Separation Medium) in ein 50 ml Falcon-Röhrchen vorsichtig geschichtet. Diese Röhrchen wurden für 30 min bei 600 $\times$ g, RT zentrifugiert, dabei musste mit geringer Beschleunigung und ausgeschalteter Bremse zentrifugiert werden, um eine optimale Fraktionierung des Blutes zu erreichen. Blutproben von Tumorpatienten wurden direkt in CPT Vacutainer abgenommen, welche für 20 min (1700 $\times$ g, RT) ebenfalls mit geringer Beschleunigung und ausgeschalteter Bremse zentrifugiert wurden. Die in der Interphase zwischen Ficoll (transparente Schicht) und Blutplasma (oberste Schicht) befindlichen Zellen wurden in ein Röhrchen mit 25 ml MACS-Puffer überführt und im Anschluss 10 min (300 $\times$ g, 4 ℃) zentrifugiert. War ein Poolen der Pellets notwendig, wurde danach erneut zentrifugiert (300 $\times$ g, 4 ℃) und der Überstand verworfen. Zur Erythrozytenlyse wurde das Pellet in MACS-Puffer resuspendiert und die doppelte Menge an dest. H_2O dazugegeben, durch ständiges Auf- und Abpipettieren für 1 Minute 20 Sekunden wurden die Erythrozyten lysiert. Anschließend wurde das Röhrchen mit MACS-Puffer aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in circa 3 ml Puffer oder Medium resuspendiert und die Zellzahl der PBMCs bestimmt (Kapitel 2.2.3).

Isolierung von NK-Zellen

Zur Isolierung von unberührten NK-Zellen aus PBMCs wurde das Prinzip des *magnetic cell sorting* mittels Negativselektion angewandt. Dabei wurden spezifische Antikörper verwendet, die chemisch an ferromagnetische (Eisen-) Kügelchen (*beads*) gebunden sind. Diese Antikörper binden an T-Zellen, B-Zellen, Stammzellen, Dendritische Zellen, Monozyten, Granulozyten und Erythrozyten in den PBMCs. Die Separation erfolgt dann über MACS-Säulen (Milteny Biotech), die sich in einem Magnetfeld befinden und an die sich alle mit *beads* markierten Zellen binden. Die unmarkierten NK-Zellen laufen durch die Säule und werden auf diese Weise eluiert. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die isolierten NK-Zellen wurden je nach Versuchsaufbau stimuliert und im Brutschrank bei 37 ℃, 5 % CO_2 inkubiert.

2.2.3 Stimulation der isolierten Zellen

Die NK-Zellen wurden je nach Versuchsaufbau mit unterschiedlichen Reagenzien, z.B. ss-isRNA, Poly I:C oder HNSCC-Überständen (Tabelle 9) für unterschiedliche Zeitspannen (12 h, 24 h, 48 h) im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO_2 inkubiert.

Poly I:C

Polyinosinic-polycytidylic acid (Poly I:C von Sigma Aldrich, Steinheim) ist synthetisch hergestellte doppelsträngige RNA.

ss-isRNA

Immunstimulatorische einzelsträngige ss-isRNA (Metabion, Martinsried) wurde wie bei Hornung *et al.* (2005) beschrieben mit der Sequenz: 5'-AGCUUAACCUGUCCUUCAA-3' eingesetzt.

Tabelle 9: Unterschiedliche Reagenzien und Überstände für die Stimulation der NK-Zellen

Stimulanzien	Konzentration
PCI-1-Überstand aus der Zellkultur	Abnahme nach 24 h oder 48 h bei 1 x 10^6 Zellen pro ml
PCI-13-Überstand aus der Zellkultur	Abnahme nach 24 h oder 48 h bei 1 x 10^6 Zellen pro ml
BHY-Überstand aus der Zellkultur	Abnahme nach 24 h oder 48 h bei 1 x 10^6 Zellen pro ml
ss-isRNA	1 μM oder 100 nM
Poly I:C	50 μg/ml

Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (BRAND; Wertheim). Zur Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen wurde die Zellsuspension, die je nach Zelldichte zuvor 1:10 oder 1:100 verdünnt wurde, im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt. Der Farbstoff Trypanblau färbt lebende Zellen nicht an (Vitalfärbung), daher erscheinen lebende Zellen im Mikroskop farblos. Tote Zellen werden dunkelblau angefärbt, weil Trypanblau die Zellmembran durchdringen kann. Die Anzahl lebender Zellen wurde mit Hilfe folgender Formel bestimmt:

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

2.2.4 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Prinzip

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur quantitativen Analyse von intrazellulären Proteinen und Oberflächenmolekülen sowie zur Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen. Die Methode basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörpern durchgeführt wird. Zellen in einer einer Zellsuspension werden einzeln in einem laminaren Probenstrom an einem gebündelten Laserstrahl vorbeigeführt, das Laserlicht wird gestreut und mit Hilfe von Photodetektoren gemessen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forwardscatter) ist ein Maß für die Größe der Zellen, während das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sidescatter) ein Maß für die Granularität ist. Außerdem werden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl auf ein höheres Energieniveau gebracht. Nach dem Lichtimpuls fallen die Elektronen auf das ursprüngliche Niveau zurück. Die Emission wird im Anschluss mit Photodetektoren registriert und verhält sich proportional zur Menge an die Zelle gebundenen Antikörpern.
Zum Ausschluss von Artefakten, die sich aus überlappenden Fluoreszenzspektren ergeben, wurden die Photodetektorkanäle kompensiert. Kompensationsbeads (BD Biosciences, San Jose (CA,USA)) wurden jeweils mit den zu messenden mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Antikörpern inkubiert und im FACS gemessen. Die Kompensation konnte berechnet und für nachfolgende Versuche verwendet werden.

Probenvorbereitung

Die über Nacht inkubierten isolierten NK-Zellen oder Zellen aus Zellkulturen wurden abzentrifugiert (300 $\times$ g, 10 min, 4 ℃), der Überstand wurde für Zytokinanalysen abgenommen und bei -80 ℃ aufbewahrt. Pro FACS-Röhrchen wurden 2 bis 4 $\times$ 10^5 Zellen eingesetzt. Zu den Zellen wurden Antikörper (Tabelle 6) gegeben. Für die Oberflächenantigenanalyse wurde je 50 µl PBS + 1 % BSA (Färbepuffer) hinzugefügt. Um intrazelluläre Antigene zu analysieren, wurde je 50 µl Permeabilisierungspuffer dazugegeben. Die Proben wurden 15 min bei 4 ℃ inkubiert. Um unspezifische Bindungen auszuschließen, wurden eine Isotypkontrolle sowie eine Negativkontrolle mitgeführt.
Die BD FACSDiva Software wurde zur Messung und Darstellung der Proben sowie zur Kompensation der Farben verwendet. Weitere Auswertungen erfolgten mit Hilfe der BD FACSDiva oder der FlowJo Software.

Cell Sorter

Isolierte PBMCs aus Buffy Coats wurden mit PBS mit 1 % BSA gewaschen und im Anschluss mit Anti-CD56 (PE) markiert. Die markierten Zellen wurden mit Hilfe des MoFlo™ Cell Sorters der „Campus Cell Sorting Core Facility im Kompetenzzentrum Tissue Engineering (KTE)“ der Universität zu Lübeck in die NK-Zell-Subpopulationen $CD56^{dim}$ und $CD56^{bright}$ sortiert. Die sortierten NK-Zellen wurden in Röhrchen mit Medium + 20 % FKS aufgefangen, um die Vitalität zu verbessern.

Annexin V- und Propidiumjodid- (PI-) Färbung

Die Annexin V- und Propipidiumjodid-Färbung dient als Nachweismethode für die Zell-Vitalität, da nekrotische und apoptotische Zellen nachgewiesen werden können. Phosphatidylserin (PS) ist normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran einer lebenden Zelle vorhanden, bei apoptotischen Zellen wird PS auf die Außenseite der Membran verlagert und kann von Annexin V gebunden werden. Durch die Markierung von Zellen mit Annexin V (FITC) können apoptotische Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Werden Zellen nekrotisch und ihre Membran durchlässig, kann Propidiumiodid (PI) in diese Zellen eindringen. Da Annexin V ebenfalls in nekrotische Zellen gelangen und an PS der Innenseite der Membran binden kann, wird daher die FITC-Annexin V-Färbung mit einer Propidiumjodidfärbung kombiniert. Somit können nekrotische und apoptotische Zellen unterschieden werden. Lebende Zellen sind Annexin-negativ und PI-negativ, apoptotische Zellen sind Annexin-positiv und PI-negativ, nekrotische Zellen sind Annexin-positiv und PI-positiv. Die experimentelle Durchführung erfolgte laut Angaben des Herstellers.

2.2.5 Immunhistochemie

Gefrierschnitte

Tumorgewebe und metastasierende Lymphknoten wurden bei -80 °C in Einfriermedium (Tissue Tek) konserviert. Mit dem Leica Kryotostat CM3050S wurden 6 µm dünne Gefrierschnitte aus den eingebetteten Zellen angefertigt, auf Superfrost Plus Objektträger überführt und ebenfalls bei -80 °C aufbewahrt.

Herstellung von Cytospin-Präparaten

Um Zellen aus einer Zellsuspension wie z.B. isolierte NK-Zellen oder Zellkultur auf einem Objektträger zu fixieren, wurden sie mit Hilfe einer Cytospin-Zentrifuge (600 Upm / 4 min) auf einen klar definierten Bereich auf einen Objektträger sedimentiert. Nach Trocknung der Objektträger wurden diese bis zur immunhistochemischen Färbung bei -80 °C aufbewahrt.

Immunhistochemische Färbung

Die anzufärbenden Objektträger wurden für 20 min in Methanol (-20 ℃) fixiert und anschließend 5 min getrocknet. Nach dreimaligem Waschen mit 1 × PBS wurden die in Antikörperverdünnungspuffer verdünnten Primärantikörper (Tabelle 7) auf die Objekträger gegeben und für 1 h bei RT oder ÜN bei 4 ℃ in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 1 × PBS wurden die Schnitte mit in Antikörperverdünnungspuffer verdünntem Sekundärantikörper (Tabelle 7) für 45 min in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI (1:5000 (1 µg/ml)) für 1 min. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Objektträger mit FluoromountG eingedeckt und getrocknet. Die gefärbten Zellen wurden auf dem Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mittels differentialer Interferenz Kontrast (DIC) Mikroskopie oder mittels Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung unterschiedlicher Filtersets visualisiert. Die Zellen wurden mit der Zeiss AxioCam MRm Rev.3 FireWire fotografiert und mittels Zeiss AxioVision Rel. 4.7 Software ausgewertet.

2.2.6 *In Vivo* Fluoreszenzmikroskopie

Die Tumorzelllinie PCI-1 wurde in 4-Kammer-Objektträgern á 20000 Zellen pro Kammer ausgesät und über Nacht inkubiert (37 ℃, 5 % CO_2). Die ausgesäten Tumorzellen wurden mit einem gfp (*green fluorescent protein*)-markierten doppelsträngigen Oligonukleotid (BLOCK-it™Fluorescent Oligo) transfiziert. Die Transfektion wurde mit Lipofektamin2000 nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Isolierte und über Nacht mit ss-siRNA inkubierte NK-Zellen wurden zu den transfizierten HNSCC-Zellen in die Kammern gegeben, dass man ein Verhältnis von NK-Zellen zu HNSCC-Zellen von 5:1 in 1 ml Medium erhielt. Um die Zytotoxizität der NK-Zellen zu visualisieren, wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop über einen Zeitraum von 5 Stunden in Intervallen von 30 Min und in 5 verschiedenen Ebenen fotografiert (Zeiss AxioCam MRm Rev.3 FireWire) und mittels Zeiss AxioVision Rel. 4.7 Software ausgewertet.

2.2.7 Messung der Zytokinsekretion von Zellen

Es wurden zwei Methoden verwendet, um mehrere Zytokine gleichzeitig im Zellüberstand nachzuweisen: Flex-Set-Messung am Durchflusszytometer sowie Bioplex-Messung mit dem Bio-Plex-Array-Reader. Beide Methoden beruhen auf dem gleichen Prinzip, die Durchführungen und die Probenmessungen unterscheiden sich jedoch. Es werden Antikörper gegen verschiedene Zytokine verwendet, die an fluoreszierende *Beads* gekoppelt sind.

Bio-Plex-System™

Die *Beads* der Antikörper sind in unterschiedlichen Verhältnissen mit roten und grünen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt und können aufgrund dieser Eigenschaft von einer Photozelle im Bioplex-Gerät unterschieden werden. Das jeweilige Zytokin bindet an die Antikörper auf den *Beads*. Daraufhin wird das gebundene Zytokin an einem anderen Epitop mit einem Biotin - markierten Detektionsantikörper nachgewiesen. Die Menge an gebundenen Zytokinen kann durch die Bindung von PE-markiertem Streptavidin an Biotin photometrisch nachgewiesen werden (Abbildung 6).

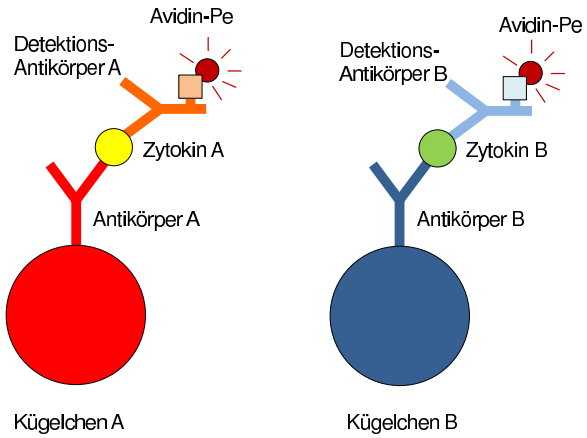

Abbildung 6: Bestimmung von Zytokinkonzentrationen
Diese Abbildung wurde anhand des Bioplex-*Array Manual* von Biorad erstellt.

Durch eine mitgeführte Standardreihe der Zytokine kann eine Quantifizierung über Standardkurven erfolgen. Mit dem hier verwendeten Th1/Th2 - Assay-Kit konnten die Konzentrationen von IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, GM-CSF, IFN-γ und TNF-α bestimmt werden. Die Zellkulturüberstände wurden auf Eis aufgetaut und die Durchführung erfolgte laut Angaben des Herstellers. Die Standardkurven der einzelnen Zytokine wurden von der Bio-Plex Software berechnet. So konnten die jeweiligen Zytokinkonzentrationen der einzelnen Proben bestimmt werden.

CBA Human Immunoglobulin Flex-Set-System™

Die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen *Beads* werden im FACS Canto im APC-Cy7- und APC-Filter detektiert, hierbei werden die *Beads* einer spezifischen Region zugeordnet.
Bei dieser Methode können auch mehrere Zytokine gleichzeitig gemessen werden, weil jede *Bead*-Population ein bestimmtes Zytokin spezifisch bindet. Der Nachweis der Zytokine in den Zell-Überständen erfolgt wie bei der Bioplex-Messung mit PE-markiertem Sekundärantikörper, der aber hier im PE-Kanal vom FACS gemessen wird.

Die Zellüberstände wurden auf Eis aufgetaut und nach Angaben des Herstellers für die Flex-Set Messung vorbereitet. Anhand einer Standardkurve wurden die Zytokinkonzentrationen mit der FCAP™ Array Software berechnet. Diese Methode wurde verwendet, um die Konzentrationen von IFN-γ, TNF-α und Il-6 in Zellüberständen zu messen.

2.2.8 Zytotoxizitätstest

Das CytoTox 96® *Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* ist eine kalorimetrische Alternative zu $_{51}$Cr *release Cytotoxicity Assays*. Die Menge an Lactatdehydrogenase (LDH) wird quantitativ im Zellüberstand gemessen. Bei diesem enzymatischen Test wird ein Tetrazolium Salz (INT) in ein rotes Formazan-Produkt umgewandelt. Die Menge an gebildetem Farbstoff ist proportional zur Anzahl der lysierten Zellen. Die Absorption kann mit einem normalen 96-Well Platten-Leser (*Microplate Spectrophotometer*) mit einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt werden.
Als Target-Zellen wurden BHY, PCI-I oder PCI-13 eingesetzt. Die Effektorzellen waren die isolierten NK-Zellen, die entweder zuvor mit ss-siRNA, DMEM, ss-isRNA und HNSCC-Überstand oder nur HNSCC-Überstand inkubiert wurden. Für den Zytotoxizitätstest wurde DMEM ohne FKS verwendet. Pro Bedingung wurde ein vierfacher Ansatz gemacht; das Endvolumen betrug 100 µl in 96-Well-Platten. Die Effektorzellen wurden in den Verhältnissen 10:1, 5:1 und 2,5:1 zu den Targetzellen eingesetzt. Als Kontrollen für die nachfolgende Berechnung der Zytotoxizität wurden nur Targetzellen (Spontane Target-Zelllyse), nur Medium (Hintergrund), nur Effektorzellen (Spntane Effektor-Zelllyse) und Lysiskontrollen der Target-Zellen (Maximale Target-Zelllyse) sowie von dem Medium (Volumen-Korrektur-Kontrolle) mitgeführt. Als Lysiskontrolle wurden Target-Zellen und Medium in einer 96-Well-Platte mit inkubiert und vor der Assaydurchführung zweimal bei -80 °C für 30 min eingefroren und anschließend im Brutschrank für 15 min aufgetaut. Die Inkubation der Assay-Platten erfolgte für mindestens 6-8 Stunden im Brutschrank. Die weitere Durchführung erfolgte laut Angaben des Herstellers.

2.2.9 MTT Zell-Proliferationstest

Dieser Test wird zur Messung der Zell-Überlebensrate und Zellproliferation verwendet. Das gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) wird in lebenden Zellen von mitochondrialen Dehydrogenasen durch Abspaltung der Tetrazolringe zu violetten, wasserunlöslichen Formazankristallen reduziert. Durch die MTT Solubilization-Lösung werden die Kristalle in Lösung gebracht. Die optische Dichte des violetten Farbstoffes ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen (Mosmann, 1983). Das resultierende violette Formazan kann spektrophotometrisch bei 550 - 600 nm bestimmt werden. HNSCC-Zellen wurden in der entsprechenden Zellzahl (PCI-1, PCI-13: 2500 Zellen; BHY: 3000 in 70 µl DMEM pro Well) in eine 96-Well-Platte gegeben. Die HNSCC-Zelllinien

wurden zuvor für mindestens 12 h mit und ohne ss-isRNA inkubiert (37 °C, 5 % CO_2). Von der MTT-Gebrauchslösung (5 mg/ml) wurde nach 0 h, 24 h, 48 h, 72 h und 144 h je 10 µl pro well dazugegeben. Nach 1 h wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 100 µl MTT Solubilization Lösung abgestoppt. Die Platten wurden vor der Messung 24 h im Dunkeln bei RT geschüttelt, um die Kristalle zu lösen. Die Absorption wurde bei 560 nm gegen die Referenzwellenlänge 650 nm im 96-Well Plattenleser (*microplate spectrophotometer*) gemessen.

3 Ergebnisse

Die Funktion sowie die Stimulierbarkeit von Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) soll in diesem Kapitel behandelt werden. Es ist bekannt, dass NK-Zellen über verschiedene Toll-like Rezeptoren (TLR) aktiviert werden können (Pries *et al.*, 2008b). In dieser Arbeit wurde die Aktivierung der NK-Zellen mit ds-RNA oder ss-isRNA über TLR3 beziehungsweise TLR7 näher untersucht. Da bei Patienten mit HNSCC die NK-Zellen in ihrer Funktion stark eingeschränkt sind, gilt es, diesem Prozess durch die Stimulation mit unterschiedlichen immunstimulatorischen Reagenzien entgegen zu wirken.

3.1 Identifizierung von NK-Zellen und den *Toll-like* Rezeptoren

3.1.1 Isolierung und Identifizierung humaner NK-Zellen

Humane NK-Zellen machen circa 10 - 15 % aller Lymphozyten im Blut aus und werden durch die Expression des Oberflächen-Antigens CD56 und die fehlende Expression des Antigens CD3 definiert (Robertson und Ritz, 1990). Obwohl CD56 (N-Cam = *neural adhesion molecule*) auf allen NK-Zellen exprimiert wird, ist die funktionelle Rolle von CD56 noch nicht ausreichend geklärt (Wilk *et al.*, 2008).
Humane PBMCs wurden mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation aus *Buffy coats* oder aus dem peripheren Blut erkrankter Spender isoliert. Die Natürlichen Killerzellen wurden aus den PBMCs mittels *magnetic cell sorting* indirekt isoliert, indem alle anderen Zellen der PBMCs durch spezifische Antikörper markiert wurden. Da somit eine Negativselektion durchgeführt wurde, waren alle NK-Zellen unmarkiert und unbeeinflusst. Zur Bestimmung der Zellzahl, Morphologie und Vitalität wurde eine Trypanblau-Färbung mit anschließender lichtmikroskopischer Analyse durchgeführt. Im Anschluss oder nach einer Inkubation wurden die NK-Zellen mit einem PE- (Phycoerythrin-) markierten Anti-CD56 Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse markiert. Die CD56-positive Population wurde im Durchflusszytometer (FACS Canto) hinsichtlich ihrer Rezeptorprofile untersucht. Im FACS können anhand der Expressionslevel von CD56 die beiden Subpopulationen unterschieden werden, was besonders im PE-Histogramm durch zwei Peaks deutlich wurde (Abbildung 7). Bei dieser Aufreinigungsmethode wurden Reinheiten von bis zu 95 % erreicht. Für alle weiterführenden Experimente wurde immer der CD56-Antikörper gemessen, um die NK-Zell-Population im Durchflusszytometer nachzuweisen.

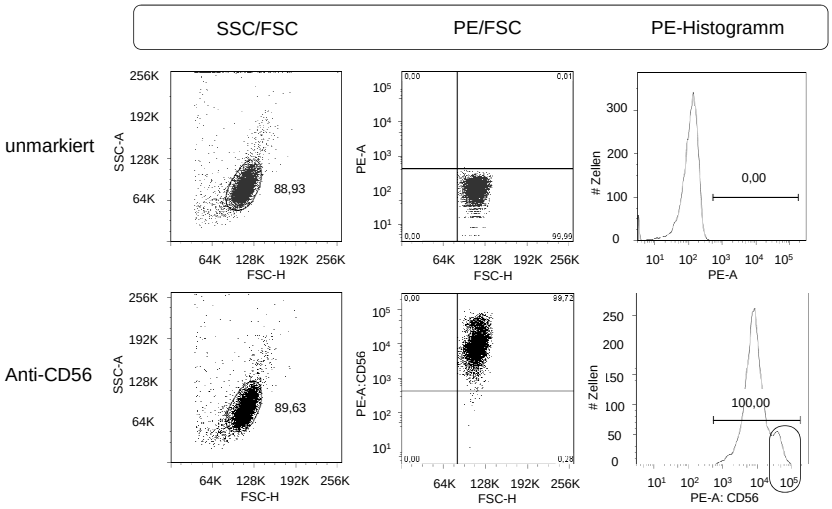

Abbildung 7: FACS-Analyse zur Charakterisierung und Identifizierung von NK-Zellen
In Dot-Plots und Histogrammen sind zum Vergleich unmarkierte Zellen nach der Isolierung und mit Anti-CD56-markierte Zellen dargestellt. Die oberer Reihe von Abbildungen zeigt Dot Plots und Histogramme von unmarkierten Zellen, in der unteren Reihe werden die CD56-markierten Zellen graphisch dargestellt. Im SSC/FSC-Diagramm wird die Population der isolierten Zellen gezeigt. Die CD56-Expression dieser Population wird im PE/FSC-Dot-Plot und im PE-Histogramm dargestellt. Sowohl im PE/FSC-Dot-Plot als auch im PE-Histogramm wird bei den mit Anti-CD56-markierten Zellen deutlich, dass es sich um die NK-Zell-Population handelt, weil sie eindeutig CD56-positiv ist. In dem PE-Histogramm der markierten Zellen wird anhand der zwei Peaks deutlich, dass es zwei Populationen sind, die eine unterschiedliche CD56-Fluoreszenzintensität aufweisen (siehe Kapitel 3.2). Der zweite Peak, der die $CD56^{bright}$-NK-Zellen darstellt, wurde durch eine Umrandung hervorgehoben.

3.1.2 TLR-Expression bei Natürlichen Killerzellen

Toll-like Rezeptoren gehören zur Familie der PRRs, die von Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert werden und der Erkennung von PAMPs dienen (Hopkins und Sriskandan, 2005).

Bei Xie *et al.* (2007) wurde mittels Western-Hybridisierungen die Expression von TLR1, TLR2, TLR3 und TLR7 humaner NK-Zellen nachgewiesen.

Um die Ergebnisse der Western-Hybridisierungen durch weitere Experimente zu untermauern, wurden die zehn humanen *Toll-like* Rezeptoren im Durchflusszytometer untersucht. NK-Zellen wurden aus *Buffy Coats* isoliert und im Anschluss über Nacht mit Medium und HNSCC-Überstand inkubiert. Die NK-Zellen wurden für die Durchflusszytometrie mit Antikörpern gegen alle 10 TLRs (Tabelle 6) und mit dem CD56-Antikörper markiert. Um die intrazelluläre Expression der TLRs zu überprüfen, erfolgte zuerst die Markierung mit Anti-CD56 und im Anschluss die Markierung mit den TLR-Antikörpern und Permeabilisierungspuffer für 15 min.

In den Abbildungen 8 und 9 werden die FACS-Messungen eines gesunden Spenders gezeigt, die Versuche wurden mehrfach wiederholt.

Zusätzlich zu den in den Western-Hybridisierungsexperimenten von Xie *et al.* (2007) nachgewiesenen TLRs konnten im FACS TLR5, TLR6, TLR8, TLR9 und TLR10 nachgewiesen werden (Abbildungen 8 und 9). Die Proteinexpression von TLR2 konnte durch die FACS-Analysen nicht bestätigt werden. Eine

Oberflächen-Expression von TLR1 konnte hier nicht gezeigt werden, die intrazelluläre Expression lag jedoch bei circa 38 %. Die Expression bezüglich TLR3 war intrazellulär mit 58 % stärker als membranständig mit ungefähr 26 %. An der Oberfläche der NK-Zellen wurde TLR4 nicht gemessen, intrazellulär konnte eine Expresion von rund 3 % vernachlässigt werden. TLR5 wurde membranständig zu circa 30 % exprimiert, intrazellulär lag die Expression bei TLR5 um 42 %. TLR6 und TLR9 konnten fast ausschließlich intrazellulär nachgewiesen werden, die Expression von TLR6 lag bei 89,5 %, die von TLR9 bei ungefähr 98 %. TLR8 konnte auf der Oberfläche mit 8 % kaum nachgewiesen werden, intrazellulär konnten ungefähr 24 % gemessen werden. TLR7 und TLR10 wurden sowohl intrazellulär als auch membranständig von nahezu allen NK-Zellen exprimiert. Die im FACS nachgewiesenen TLRs wurden ebenfalls durch HNSCC in keiner Weise beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Abgesehen von TLR2 und TLR4 konnten durch diese durchflusszytometrischen Analysen die anderen acht *Toll-like* Rezeptoren in humanen NK-Zellen nachgewiesen werden, sie wurden jedoch unterschiedlich stark exprimiert.

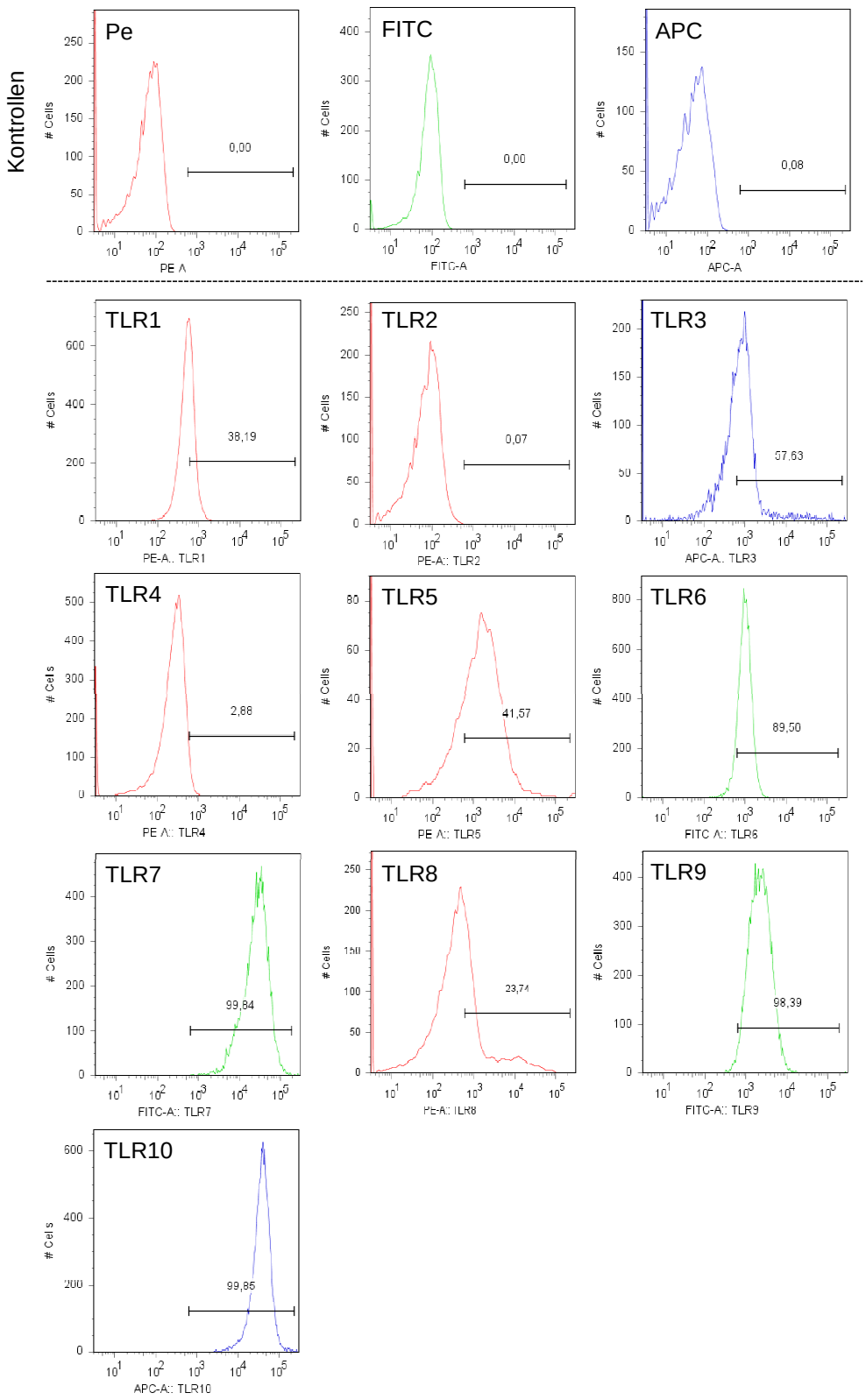

Abbildung 8: Die intrazelluläre TLR-Expression in humanen NK-Zellen
Die FACS-Analysen der intrazellulären TLR-Expression werden in dieser Abbildung gezeigt. In der Abbildung oben sind drei Histogramme von unmarkierten NK-Zellen dargestellt, sie werden durch eine gestrichelte Linie von den anderen Histogrammen getrennt. Mit Hilfe dieser Negativ-Kontrollen konnte festgelegt werden, wo die Messung positiver Zellen beginnt. Die Histogramme der TLRs wurden darunter mit fortlaufenden Nummern abgebildet. Die gezeigten Histogramme beziehen sich auf die NK-Zell-Population (Abbildung 7). PE (Phycoerythrin): rot, FITC (Fluorescein-Isothiocyanat): grün, APC (Allophycocyanin): blau. TLR1, TLR3, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 und TLR10 wurden intrazellulär exprimiert, diese TLRs unterschieden sich anhand ihrer Expressionslevel. TLR2 und TLR4 konnten im FACS nicht nachgewiesen werden.

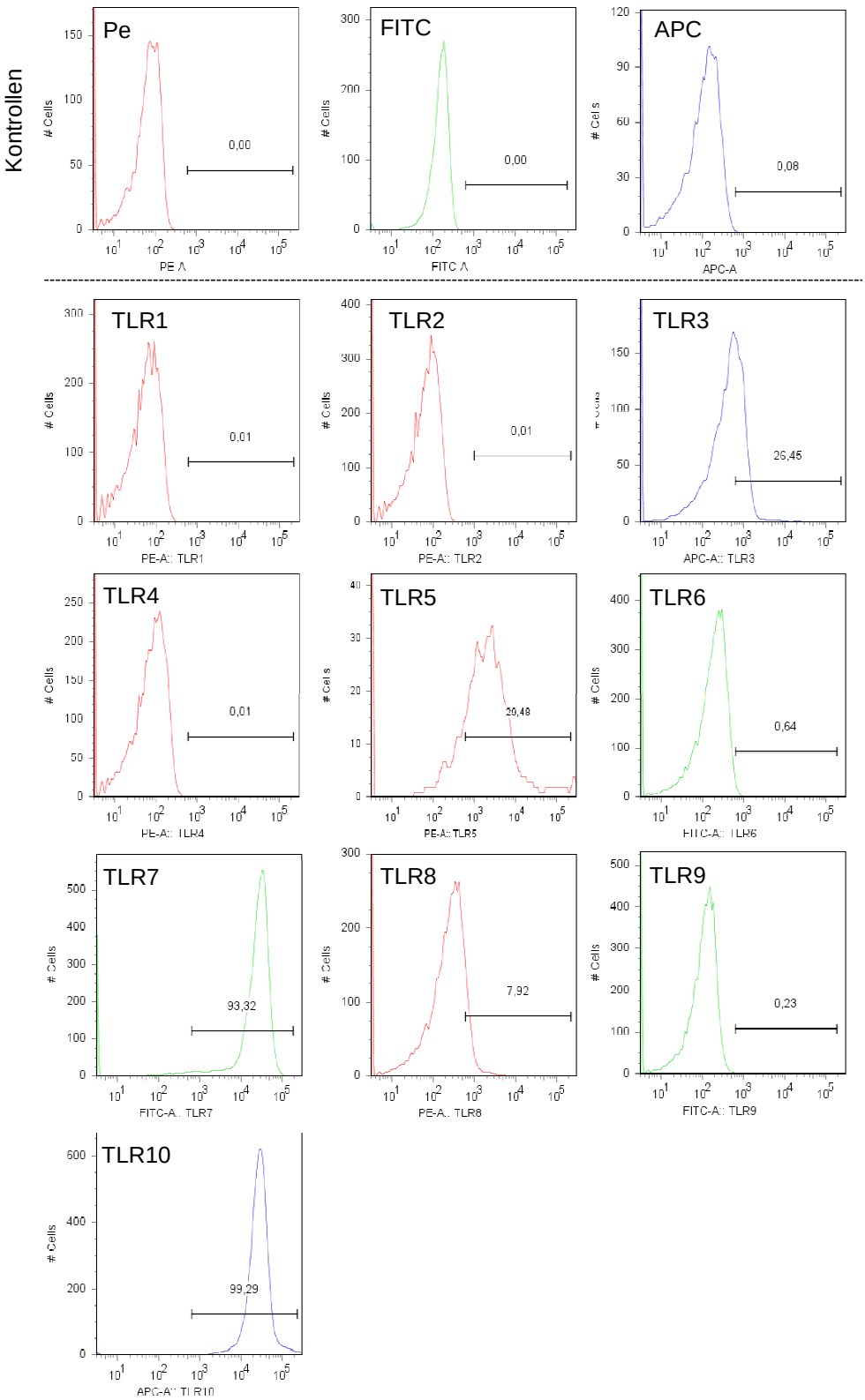

Abbildung 9: Die membranständige TLR-Expression in humanen NK-Zellen
In dieser Abbildung werden FACS-Analysen der membranständigen TLR-Expression dargestellt. Oben in der Abbildung werden drei Histogramme von unmarkierten NK-Zellen gezeigt, sie sind von den anderen durch eine gestrichelte Linie getrennt. Anhand dieser Kontrollen wurde der Beginn positiver Zellen bestimmt. Die Histogramme der TLRs wurden darunter mit fortlaufenden Nummern abgebildet. PE ist in der gesamten Abbildung rot dargestellt, FITC grün und APC blau. Die gezeigten Histogramme beziehen sich auf die NK-Zell-Population (Abbildung 7). Die TLRs 1, 2, 4, 6 und 9 wurden an der Oberfläche von NK-Zellen nicht exprimiert. TLR3, TLR5, TLR7, TLR8 und TLR10 konnten membranständig nachgewiesen werden, diese TLRs unterschieden sich jedoch in der Expressionsstärke.

3.2 Die NK-Zell-Subpopulationen CD56^{dim} und CD56^{bright}

Die NK-Zell-Subpopulationen CD56^{dim} und CD56^{bright} lassen sich im Durchflusszytometer anhand der Fluoreszenzintensität von CD56 deutlich voneinander unterscheiden. Isolierte NK-Zellen wurden mit Anti-CD56 (PE) gefärbt und im FACS gemessen. Im Anschluss an die Messung wurde die CD56-positive Hauptpopulation abgegrenzt (Abbildung 7). Die beiden Subpopulationen CD56^{dim} und CD56^{bright} wurden unterteilt, um unterschiedliche Rezeptoren bei den NK-Zell-Subpopulationen untersuchen zu können (Abbildung 10).

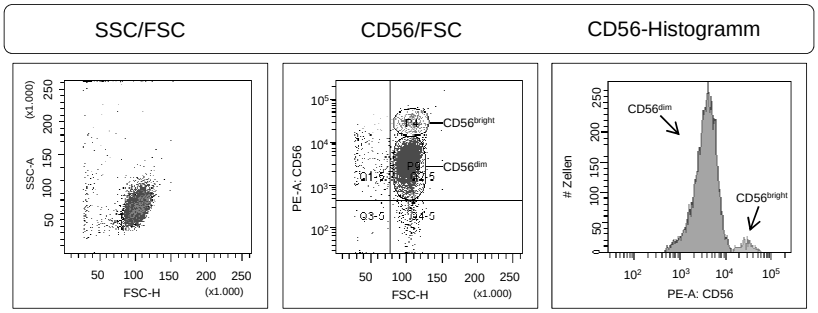

Abbildung 10: Die NK-Zell-Subpopulationen können im FACS getrennt voneinander betrachtet werden
Isolierte NK-Zellen werden für die FACS-Messung mit Anti-CD56 (Pe oder Pe-Cy7) markiert. Im SSC/FSC Dot Plot kann eine Population eindeutig ausgemacht werden, es gibt sowohl hell- als auch dunkelgraue Zellen in dieser Population. In dem Pe/FSC Dot Plot können zwei Population aufgrund der CD56-Fluoreszenzintensität voneinander unterschieden werden. Die CD56^{dim}-Population ist dunkelgrau, die CD56^{bright} -Zellen sind hellgrau abgebildet. Im CD56-Histogramm werden die beiden Subpopulationen nebeneinander noch einmal verdeutlicht.

Diese Unterteilung im FACS erlaubte die Unterscheidung der beiden Subpopulationen in Hinblick auf verschiede Rezeptoren.

Die CD56^{dim} -NK-Zellen exprimieren außerdem ein hohes Level an CD16 (Fcγ-Rezeptor III). Bei den CD56^{bright} -NK-Zellen wurde nur eine sehr geringe CD16-Expression an der Zelloberfläche beschrieben (Lanier *et al.*, 1986).

Um zu bestätigen, dass es sich bei den gegateten Populationen um die beiden Subpopulationen handelt, wurden diese hinsichtlich ihrer CD16-Expression überprüft.

Isolierte NK-Zellen aus *Buffy Coats* wurden für die FACS-Färbung der Oberflächenantigene CD56 und CD16 verwendet. Im Programm BD FACS DIVA wurden die NK-Zellen in CD56^{dim}- und CD56^{bright}-NK-Zellen unterteilt (siehe Abbildung 10). Die Subpopulationen wurden hinsichtlich ihrer CD16-Expression untersucht. In Abbildung 11 A - D wird exemplarisch eine FACS-Messung mit CD56 (A) und CD16 (B-C) gezeigt. In Abbildung 11 A sind die beiden NK-Zell-Subpopulationen, die im FACS getrennt voneinander auf ihre CD16-Expression untersucht wurden, abgebildet. Die Abbildung 11 B zeigt die CD16-Expression beider Subpopulationen im FITC/FSC-Dot Plot. In Abbildung 11 C wird die Expression von CD16 bei CD56^{dim} und in 11 D die von CD56^{bright} in FITC-Histogrammen dargestellt. Vergleicht man C

und D miteinander wird deutlich, dass fast alle CD56^{dim}- NK-Zellen CD16-positiv waren, während viele Zellen der CD56^{bright}-Subpopulation geringe CD16-Expressionslevel aufwiesen.

Somit konnte bestätigt werden, dass die immunregulatorischen NK-Zellen kaum CD16 exprimieren, die zytotoxischen NK-Zellen hingegen zeigten eine nahezu 100-prozentige CD16-Expression.

Die NK-Zellen von Tumorpatienten wurden hinsichtlich der Verteilung der NK-Zell-Subpopulationen untersucht. Deshalb wurde, wie bei gesunden Spendern, die CD16-Expression der beiden Subpopulationen im FACS bestimmt.

Die Mittelwerte von 82 Tumorpatienten und 21 gesunden Spendern wurden errechnet, um die durchschnittliche CD16-Expression im Diagramm darstellen zu können (Abbildung 11 E). Die durchschnittliche CD16-Expression von CD56^{dim}-NK-Zellen lag bei durchschnittlich 98 %, sowohl bei kranken als auch bei gesunden Spendern. Die CD56^{bright}-NK-Zellen gesunder Spender exprimierten durchschnittlich etwa 40 % CD16, die der kranken Spender durchschnittlich etwa 60 %.

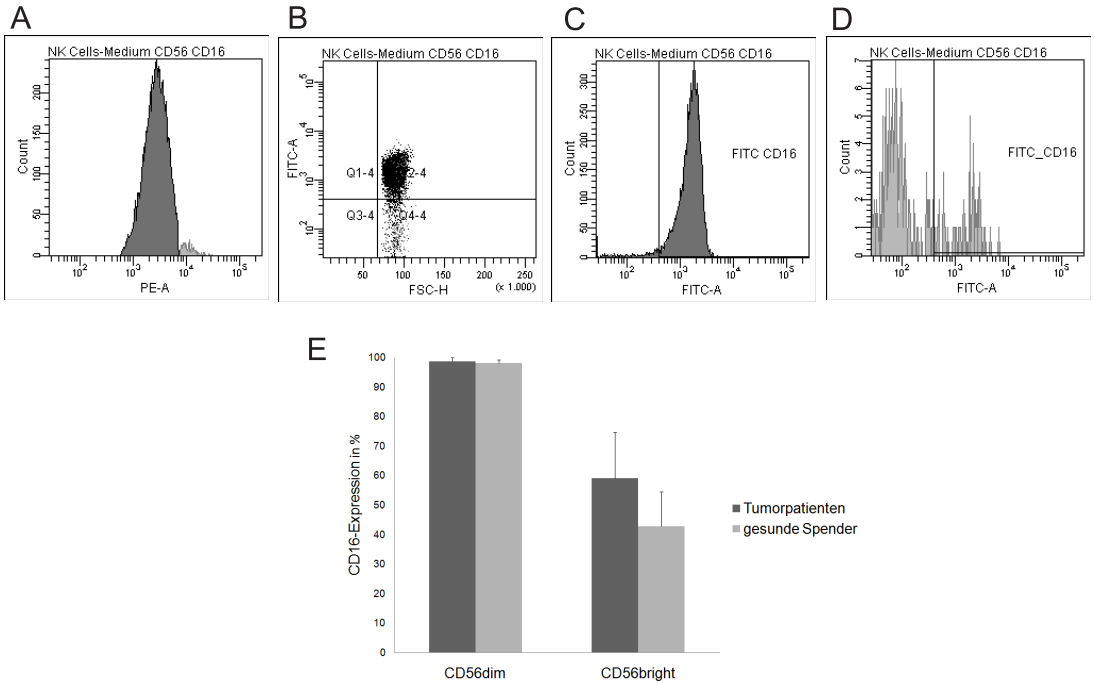

Abbildung 11: CD16-Expression bei NK-Zellen
Isolierte NK-Zellen wurden mit Anti-CD56 (PE) und Anti-CD16 (FITC) für die Durchflusszytometrie gefärbt. Die NK-Zell-Subpopulation CD56^{dim} wird in A-D dunkelgrau und die CD56^{bright}-Zellen hellgrau dargestellt. A: PE-Histogramm beider Populationen. B: PE/FSC-Dot Plot der NK-Zell-Subpopulationen. C: FITC-Histogramm der CD56^{dim}-NK-Zellen. D: FITC-Histogramm der CD56^{bright}-NK-Zellen. E Diagramm der durchschnittlichen CD16-Expression in CD56^{dim}- und CD56^{bright}-NK-Zellen gesunder (n=21) und erkrankter Spender (n=82); die CD16-Expression bei Tumorpatienten ist durch dunkelgraue Säulen und die gesunder Spender durch hellgraue gekennzeichnet. Die CD16-Expression war bei den CD56^{dim}-NK-Zellen wesentlich stärker als bei den CD56^{bright}-NK-Zellen.

Die NK-Zellen wurden mittels Cell Sorter mit Hilfe des Anti-CD56-Antikörpers aus PBMCs isoliert und in die Subpopulationen getrennt, um sie analysieren zu können. PBMCs wurden aus einem *Buffy Coat* isoliert und im Anschluss mit Anti-CD56 markiert. Die Zellen wurden unmittelbar nach der Sortierung im FACS gemessen.

Inkubationen mit immunstimulatorischen Reagenzien oder HNSCC-Überständen konnte aufgrund der Vitalität der sortierten NK-Zellen nicht durchgeführt werden. Direkt nach der Sortierung waren die NK-Zellen jedoch vital, was im FACS mittels Annexin-PI-Färbung und im Lichtmikroskop mittels Trypanblau-Färbung überprüft wurde (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 12 sind die PE/FSC-Dot Plots (A und B) und die PE- (C) und FITC- (D) Histogramme dargestellt. Die Sortierung der Zellen in $CD56^{dim}$ (A) und $CD56^{bright}$ (B) war erfolgreich, die Darstellung der beiden getrennten Populationen erfolgte mittels derselben Gates wie die FACS-Analysen der gesamten NK-Zellen. Die unterschiedlichen CD56-Fluoreszenzintensitäten werden in Abbildung 12 hervorgehoben. Bei den sortierten NK-Zellen wurde bei den $CD56^{dim}$-Zellen ein hohes Level an CD16 nachgewiesen, die Subpopulation $CD56^{bright}$ zeigte, wie in der Literatur beschrieben (Cooper *et al.*, 2001a), eine minimale CD16-Expression. Um diesen Unterschied deutlicher darzustellen, wurden die FACS-Messungen in einem Diagramm dargestellt (Abbildung 12 E). Mit etwa 5 % war die CD16-Expression sehr gering und lag sogar unter den Literaturwerten von 30-50 % (Cooper *et al.*, 2001a).

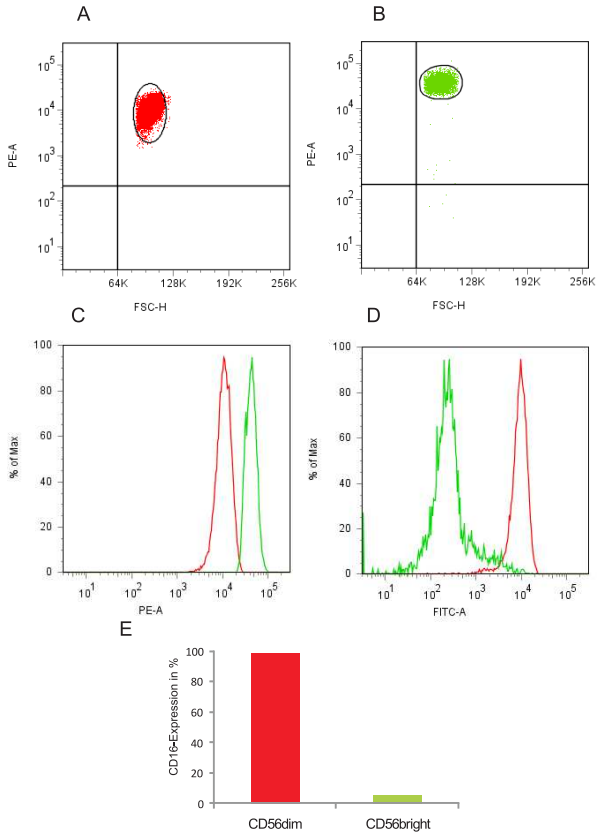

Abbildung 12: CD16-Expression bei sortierten NK-Zellen
NK-Zellen wurden mittels Cell Sorter aus PBMCs isoliert und in die beiden NK-Zell-Subpopulationen $CD56^{dim}$ und $CD56^{bright}$ sortiert. Die NK-Zellen wurden für die Durchflusszytometrie mit Anti-CD56 (PE) und Anti-CD16 (FITC) angefärbt und sofort im FACS analysiert. A zeigt den PE/FSC-Dot Plot der sortierten $CD56^{dim}$-Zellen. B stellt die CD56-Expression im PE/FSC-Dot Plot der $CD56^{bright}$ -NK-Zellen dar. In C werden die unterschiedlichen CD56-Fluoreszenzintensitäten im PE-Histogramm dargestellt. In D ist das FITC-Histogramm der beiden NK-Zell-Populationen abgebildet. E zeigt ein Diagramm, in dem die CD16-Expressionswerte der FACS-Analyse in % aufgetragen sind. Rot stellt die $CD56^{dim}$-NK-Zellen dar und grün die $CD56^{bright}$-NK-Zellen. In D und E wird deutlich, dass die sortierten $CD56^{dim}$-NK-Zellen mehr CD16 exprimieren als die sortierten $CD56^{bright}$-NK-Zellen

3.2.1 Identifizierung von NK-Zellen im Tumorgewebe

NK-Zellen wurden in Gefrierschnitten von Tumorgewebe hinsichtlich des Vorkommens von $CD56^{dim}$ und $CD56^{bright}$ im Tumor untersucht. Immunhistochemische Färbungen von Tumorgewebeschnitten wurden mit Anti-CD56 und Anti-CD16 durchgeführt. CD16 wurde verwendet, um die $CD56^{dim}$-NK-Zellen, die den Oberflächenmarker CD16 exprimieren, von den $CD56^{bright}$-NK-Zellen zu unterscheiden. Mittels Fluoreszenzmikroskop konnten die NK-Zell-Subpopulationen $CD56^{dim}$ und $CD56^{bright}$ nebeneinander im Gewebeschnitt identifiziert werden (Abbildung 13). Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl regulatorische ($CD56^{bright}$-) als auch zytotoxische ($CD56^{dim}$-) NK-Zellen in das Tumorgewebe einwandern und dieses infiltrieren.

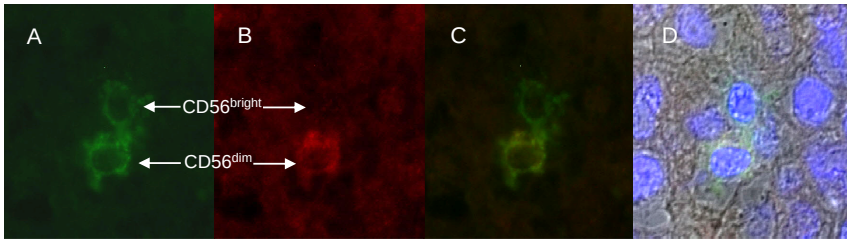

Abbildung 13: Lokalisation von NK-Zellen im Tumorgewebe
Zur Anfärbung von NK-Zellen im Tumorgewebe wurden Antikörper gegen CD56 und CD16 verwendet. A: Zwei CD56-positive NK-Zellen sind übereinander dargestellt. B: Die obere der beiden NK-Zellen exprimiert kein CD16 und ist somit eine regulatorische $CD56^{bright}$-NK-Zelle, die andere ist eine $CD56^{dim}$-NK-Zelle. C Overlay von CD56-Cy2 und CD16-Cy3. D Overlay von CD56-Cy2, CD16-Cy3, DAPI und Hellfeld.

3.2.2 Abnahme der zirkulierenden regulatorischen NK-Zellen bei Patienten mit HNSCC

NK-Zellen wurden aus peripherem Blut von Tumorpatienten (n=79) und gesunden Spendern (n=31) isoliert, mit Anti-CD56 gefärbt und im Durchflusszytometer hinsichtlich der CD56-Expression untersucht. Die Subpopulationen wurden, wie in Abbildung 10 dargestellt, analysiert. Aufgrund der graphischen Aufteilung in $CD56^{dim}$ und $CD56^{bright}$ im Durchflusszytometer kann der Anteil der Subpopulationen prozentual bestimmt werden. Die Ergebnisse der FACS-Messungen sind in der Abbildung 14 in einem Säulendiagramm dargestellt. Der prozentuale Anteil der $CD56^{bright}$-NK-Zell-Subpopulation an den gesamten NK-Zellen (100 %) wird in diesem Diagramm gezeigt, der fehlende prozentuale Anteil bis 100 % entspricht den $CD56^{dim}$-NK-Zellen. Die Tumorstadien I+II und III+IV wurden zusammengefasst. Als Kontrolle dienten gesunde Spender, die laut Literatur einen $CD56^{bright}$-Anteil von etwa 10 % aufweisen (Cooper *et al.*, 2001a).

In dem peripheren Blut von Tumorpatienten konnten im Vergleich zu dem peripheren Blut von gesunden Spendern geringere Level von zirkulierenden $CD56^{bright}$-NK-Zellen nachgewiesen werden, man kann somit von einer Verschiebung der Subpopulationen zu Gunsten der $CD56^{dim}$-NK-Zellen sprechen. Es gibt jedoch keine deutlichen Unterschiede zwischen den Tumorstadien I+II und III+VI (Abbildung 14).

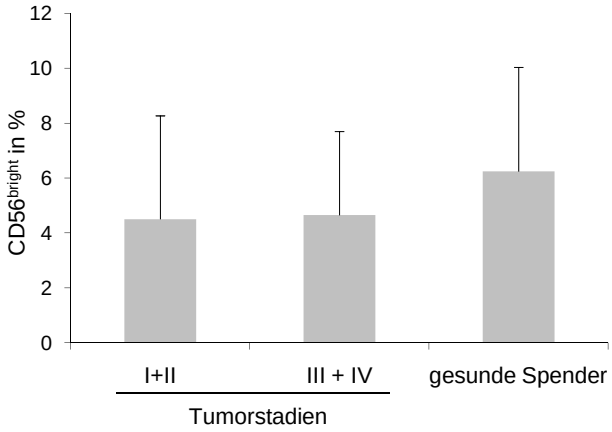

Abbildung 14: Anzahl zirkulierender CD56^{bright}-NK-Zellen von HNSCC-Patienten und gesunden Spendern
Isolierte NK-Zellen aus dem peripheren Blut von Tumorpatienten (n=79) und aus *Buffy Coats* (n=31) zur Kontrolle wurden im FACS auf die Verteilung der NK-Zell-Subpopulationen CD56^{dim} und CD56^{bright} analysiert. Das Säulendiagramm zeigt den durchschnittlichen prozentualen Anteil von CD56^{bright}-NK-Zellen im peripheren Blut von Tumorpatienten (UICC-Stadium I+II und III+IV) und gesunden Spendern. Zur einfacheren Darstellung wird nur die CD56^{bright}-Subpopulation im Diagramm gezeigt, der bis 100 % fehlende Anteil stellt die CD56^{dim}-Subpopulation dar. Im peripheren Blut von Tumorpatienten waren weniger CD56^{bright}-NK-Zellen vorhanden als im Blut von gesunden Spendern. Deutliche Unterschiede zwischen den Tumorstadien waren jedoch nicht erkennbar.

Anhand der großen Standardabweichungen wird deutlich, dass der CD56^{bright}-Anteil an NK-Zellen von Spender zu Spender, ob gesund oder krank, stark variierte.

Die Daten der CD56^{bright}-Verteilung im Blut von Tumorpatienten wurden bei verschiedenen Tumorlokalisationen ausgewertet. Die Tumoren wurden in vier Gruppen eingeteilt: Mundhöhle, Larynx, Oropharynx und Hypopharynx. Es konnte keine Korrelation zwischen der CD56^{bright}-NK-Zell-Menge und der Tumorlokalisation festgestellt werden (Abbildung 15). Es wird deutlich, dass es einen Unterschied in der Häufigkeit der regulatorischen NK-Zellen zwischen Tumorpatienten und gesunden Spendern gibt. Es konnten aber keine definitiven Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen der Tumorpatienten festgestellt werden. Die Daten wurden nach verschiedenen weiteren Parametern geordnet, beispielsweise nach dem Zeitpunkt der Erkrankung (akut erkrankt, in den letzten zwei Jahren erkrankt, vor mehr als zwei Jahren erkrankt) oder entsprechend der Metastasenbildung (keine Metastasen, lokale Metastasen, entfernte Metastasen).

Anhand dieser Auswertung wurde deutlich, dass erkrankte Patienten durchschnittlich weniger immunregulatorische NK-Zellen haben. Die Tumorpatienten unterscheiden sich aber hinsichtlich eines Gruppenmerkmales, wie zum Beispiel der Tumorlokalisation, nicht.

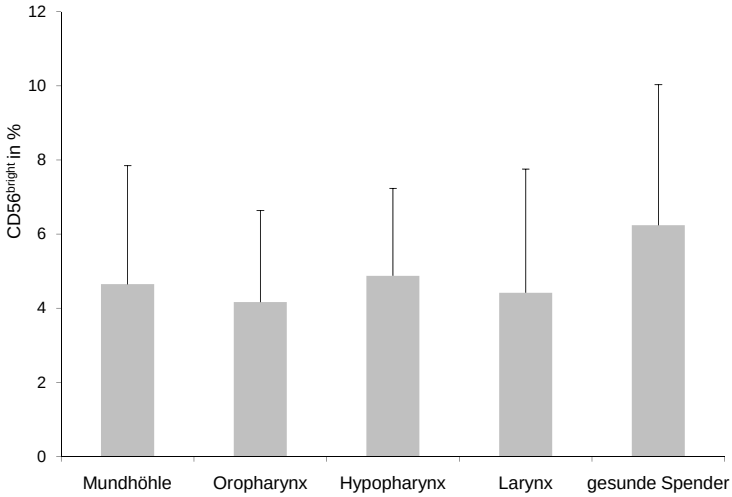

Abbildung 15: Anzahl zirkulierender CD56^{bright}-NK-Zellen verschiedener Tumorlokalisationen
Die errechneten Mittelwerte von durchflusszytometrischen Messungen mit dem Antikörper Anti-CD56 bei isolierten NK-Zellen von Tumorpatienten sowie gesunden Spendern wurden graphisch in einem Diagramm dargestellt. Die Tumorpatienten wurden in vier Gruppen eingeteilt: Mundhöhle, Oropharynx, Hypopharynx und Larynx. Als Kontrolle wurden die NK-Zellen gesunder Spender verwendet. Auf der Y-Achse wurden die CD56^{bright}-NK-Zellen aufgetragen, auf der X-Achse die Tumorlokalisationen und die gesunden Spender. Der Anteil an CD56^{bright}-NK-Zellen war im peripheren Blut von Tumorpatienten geringer als von gesunden Spendern, allerdings waren keine deutlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Tumorlokalisationen zu erkennen.

3.3 Der Einfluss von Poly I:C und HNSCC-Milieu auf NK-Zellen

3.3.1 Aktivierung von NK-Zellen durch Poly I:C

CD69 ist ein charakteristischer Aktivierungsmarker, der auf der Oberfläche von NK-Zellen exprimiert wird. Die Auswirkungen des immunsuppressiven HNSCC-Milieus auf die CD69-Expression sollten untersucht werden. Isolierte NK-Zellen wurden mit den HNSCC-Überständen der HNSCC-Zelllinien PCI-1, PCI-13 und BHY für 24 Stunden bei 37 ℃ und 5 % $C0_2$ inkubiert. Für die durchflussszytometrische Analyse wurde ein CD69-Antikörper eingesetzt (Abbildung 16). Es wird deutlich, dass die HNSCC-Überstände keinen deutlichen Einfluss auf die CD69-Expression von NK-Zellen haben. Die CD69-Peaks der untersuchten HNSCC-Überstände zeigten kaum Abweichungen im Vergleich zur Mediumkontrolle.

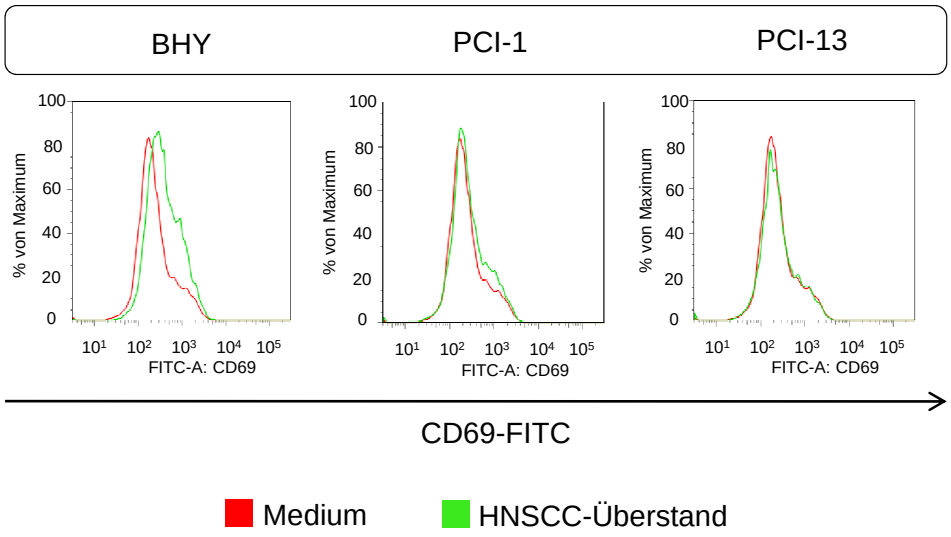

Abbildung 16: HNSCC hat keinen Einfluss auf CD69
In dieser Abbildung sind durchflusszytometrische Messungen in Form von Histogrammen dargestellt. NK-Zellen wurden aus *Buffy Coats* isoliert und mit Medium oder Überständen der permanenten HNSCC-Zelllinien BHY, PCI-1 und PCI-13 für 24 h inkubiert. Die Anzahl der Ereignisse (Y-Achse) wurde gegen die Fluoreszenzintensität von CD69 (X-Achse) aufgetragen. Die roten Peaks stehen für die Mediumkontrollen, die grünen Peaks stellen die CD69-Expression der mit HNSCC-Überständen inkubierten NK-Zellen dar. HNSCC-Überstände haben im Vergleich zum Medium keinen deutlichen Einfluss auf die CD69-Expression in NK-Zellen.

Der Einfluss von Poly I:C auf die Aktivierbarkeit von NK-Zellen wurde auch in Anwesenheit des HNSCC-Milieus untersucht. Isolierte NK-Zellen wurden mit und ohne Poly I:C sowie mit HNSCC-Überständen, wie zuvor beschrieben, inkubiert. Die CD69-Expression und dementsprechend die Aktivierung der NK-Zellen konnte durch Poly I:C deutlich gesteigert werden (Abbildung 17 A). Es ist klar zu erkennen, dass die mit Poly I:C stimulierten NK-Zellen aktiviert wurden und somit im Vergleich zur Mediumkontrolle eine deutlich erhöhte CD69-Expression zeigten. Die Gegenwart des immunsuppressiven HNSCC-Milieus hatte keinen Einfluss auf die Aktivierung durch Poly I:C.

Mehrere FACS-Analysen mit den Antikörpern Anti-CD56 und Anti-CD69 wurden anhand der durchschnittlichen Fluoreszenz Intensität (MFI) ausgewertet (Abbildung 17 B). Der aktivierende Einfluss von Poly I:C wird trotz Anwesenheit des HNSCC-Milieus deutlich. In diesem Diagramm werden die Unterschiede der CD69-Expression zwischen der Medium-Kontrolle und den stimulierten NK-Zellen deutlich. Die mit Poly I:C inkubierten NK-Zellen exprimierten die zwei- bis dreifachen Level an CD69 im Vergleich zu den Kontrollen.

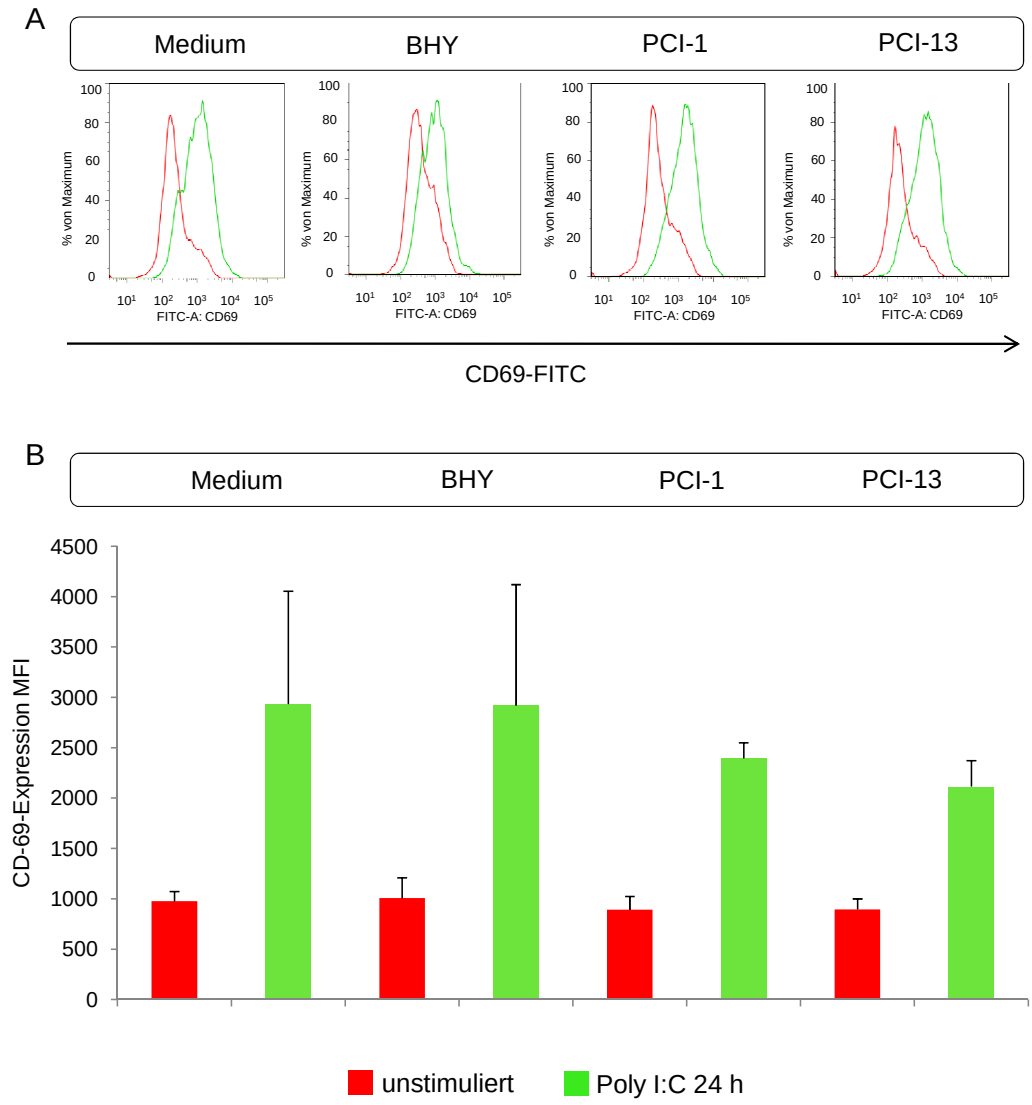

Abbildung 17: Aktivierung von NK-Zellen durch Poly I:C
A: Histogramme von einer FACS-Analyse zeigen die Anzahl der Ereignisse (Y-Achse) sowie die Fluoreszenzintensität von CD69 (X-Achse). Gezeigt werden FACS-Bilder von NK-Zellen, die mit Medium, BHY-, PCI-1- und PCI-13- Überstand sowie Poly I:C für 24 h inkubiert wurden. B: Diagramm der Mittelwerte dreier Messungen von der CD69-Expression (MFI = *mean fluorescence intensity*) in NK-Zellen. Rot: unstimulierte NK-Zellen mit Medium oder HNSCC-Überstand inkubiert, grün: mit Poly I:C stimulierte NK-Zellen mit und ohne Anwesenheit der HNSCC-Überstände. Die NK-Zellen wurden durch Poly I:C, auch in Anwesenheit der HNSCC-Überstände, eindeutig aktiviert.

3.3.2 Internalisierung von TLR3

Der *Toll-like* Rezeptor 3 wird von Kawai und Akira (2008) als intrazellulärer Rezeptor beschrieben, der in Kompartimenten wie dem Endoplasmatischen Reticulum (ER) oder den Endosomen lokalisiert ist. Um die Expression von TLR3 und CD56 innerhalb der Zellen bildlich darzustellen, wurden Cytospins von Zellmischungen von NK-Zellen und PCI-13-Zellen angefertigt. NK-Zellen wurden zu diesem Zweck aus *Buffy coats* isoliert und für 24 h kultiviert (siehe Kapitel 3.1.1). Im Anschluss wurden die NK-Zellen zusammen mit der HNSCC-Zelllinie PCI-13 für 30 Minuten inkubiert, im Verhältnis 10:1 (NK-

Zellen:HNSCC-Zellen) mittels Cytospin auf Objektträger gebracht und mit den Antikörpern Anti-CD56 und Anti-TLR3 immunhistochemisch gefärbt. Die Immunfärbung der Cytospins wurde zuvor mit den NK-Zellen und den HNSCC-Zellen getrennt voneinander durchgeführt, um die Größe der HNSCC-Zellen sowie der NK-Zellen einschätzen zu können (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 18 werden die mikroskopischen Aufnahmen der TLR3-Expression sowie der CD56-Expression bei NK-Zellen und HNSCC-Zellen dargestellt. Durch die Expression des Oberflächenantigens CD56 bei HNSCC-Zellen und bei NK-Zellen, konnte eine membranständige Färbung dargestellt werden (Abbildung 18 C). CD56 wurde nicht nur von NK-Zellen exprimiert, sondern konnte auch deutlich auf den Zellen der Zellinie PCI-13 nachgeweisen werden. Da CD56 auf einigen Tumoren exprimiert wird, wird CD56 in der immunhistochemischen Diagnostik bereits als Tumormarker eingesetzt (Miettinen, 1993).

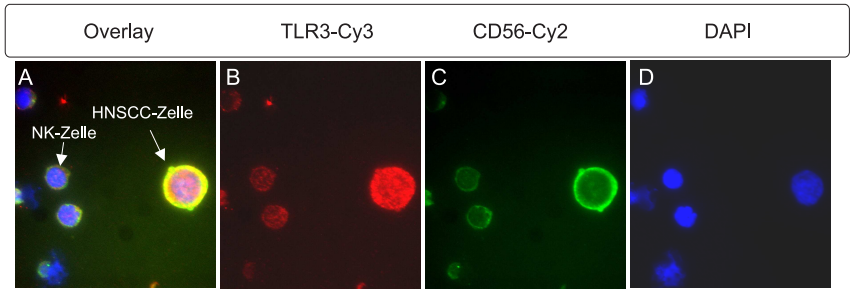

Abbildung 18: TLR3 wird intrazellulär und an der Zelloberfläche exprimiert
Mikroskopische Aufnahmen von immunhistochemischen Färbungen mit Anti-CD56 und Anti-MDA5 der Zellmischungen von NK-Zellen und HNSCC-Zellen. Die größeren HNSCC-Zellen lassen sich gut von den kleineren NK-Zellen unterscheiden.
A: Overlay von Cy2, Cy3 und Dapi B:Cy2 und Dapi C: Cy3 und Dapi D: Dapi. NK-Zellen und HNSCC-Zellen exprimierten CD56 an der Zelloberfläche und TLR3 intrazellulär sowie membranständig.

TLR3 wurde in HNSCC-Zellen besonders stark exprimiert, die Expression war bei NK-Zellen hingegen deutlich schwächer. Die TLR3-Expression war intrazellulär bei NK-Zellen stark ausgeprägt. Anhand der Aufnahmen wird deutlich, dass TLR3 sowohl bei HNSCC-Zellen als auch bei NK-Zellen hauptsächlich intrazellulär, aber auch membranständig exprimiert wurde. Die Oberflächen-Expression von TLR3 wurde durch einen rote Färbung um die Zelle, die wesentlich schwächer im Vergleich zur CD56-Expression war, hervorgehoben.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte eindeutig gezeigt werden, dass TLR3 durch das immunsuppressive HNSCC-Milieu internalisiert wurde. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass Poly I:C diese Internalisierung von TLR3 verhindert. Dieser Prozess konnte auch mit Fibroblasten reproduziert werden (Xie *et al.*, 2007). In dieser Arbeit konnte die Internalisierung von TLR3 durch das HNSCC-Milieu bestätigt werden (Abbildung 19). Isolierte NK-Zellen von acht gesunden Spendern wurden 24 h mit Medium und BHY-Überstand inkubiert und anschließend für die Durchflusszytometrie mit Anti-CD56 und Anti-TLR3 markiert. Die Mittelwerte der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität (MFI) wurden errechnet und in einem Diagramm (Abbildung 19) dargestellt. Durch die rote Linie im Diagramm, die das membranständige TLR3-Expressionslevel der Mediumkontrolle kennzeichnet, wird verdeutlicht, dass

die TLR3-Expression an der Oberfläche von NK-Zellen in Anwesenheit des HNSCC-Milieus im Vergleich zur Mediumkontrolle geringer war. TLR3 wurde in Anwesenheit des HNSCC-Milieus weniger an der Zelloberfläche und vermehrt intrazellulär exprimiert. Außerdem zeigt die Abbildung 19, dass die TLR3-Expression in NK-Zellen intrazellulär höher ist als an der Zelloberfläche. Das HNSCC-Milieu sorgt somit für eine Verschiebung der TLR3-Expression von der Zelloberfläche in das Zellinnere.

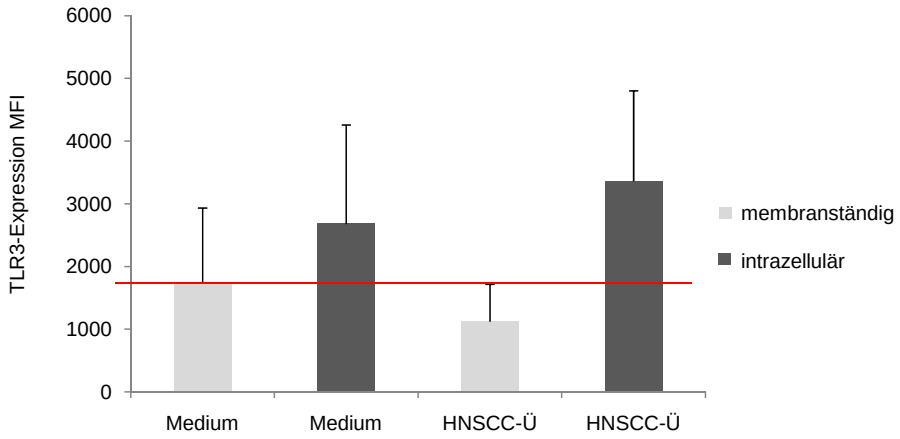

Abbildung 19: TLR3 wird durch das HNSCC-Milieu internalisiert
Die Mittelwerte der durchschnittlichen Fluoreszenz-Intensität (MFI) der TLR3-Expression von acht gesunden Spendern werden in Form eines Säulendiagramms gezeigt. Die membranständige TLR3-Expression ist in hellgrau und die intrazelluläre in dunkelgrau dargestellt. HNSCC-Ü steht für HNSCC-Überstand. Die rote Linie geht von der Expressionsstärke der membranständigen Mediumkontrolle aus, um die Internalisierung von TLR3 in die Zelle zu verdeutlichen. TLR3 wird intrazellulär stärker exprimiert als an der Zelloberfläche. Darüber hinaus nimmt die TLR3-Expression durch die Inkubation mit HNSCC an der Zelloberfläche ab und intrazellulär zu.

Da die Internalisierung *in vitro* gezeigt werden konnte, war es interessant zu untersuchen, ob NK-Zellen von Tumorpatienten ebenfalls weniger TLR3 exprimieren als die NK-Zellen gesunder Spender. NK-Zellen wurden sowohl aus *Buffy Coats* (n=8) als auch aus dem peripheren Blut von Tumorpatienten (n=3) isoliert. Die NK-Zellen wurden für 24 h mit und ohne Poly I:C in Medium kultiviert und durchflusszytometrisch untersucht. Die TLR3-Expression von Tumorpatienten lag überraschenderweise sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten NK-Zellen deutlich über der TLR3-Expression gesunder Spender (Abbildung 20). Das spricht *in vivo* gegen eine Internalisierung von TLR3 in Anwesenheit von HNSCC.

Außerdem verringerte sich die TLR3-Expression nach Poly I:C-Stimulation in NK-Zellen von Tumorpatienten sowohl intra- als auch extrazellulär. Bei NK-Zellen gesunder Spender gab es zwischen unstimulierten und stimulierten NK-Zellen kaum einen Unterschied. Aufgrund der hohen Standardabweichungen kann hierzu allerdings keine eindeutige Aussage getroffen werden.

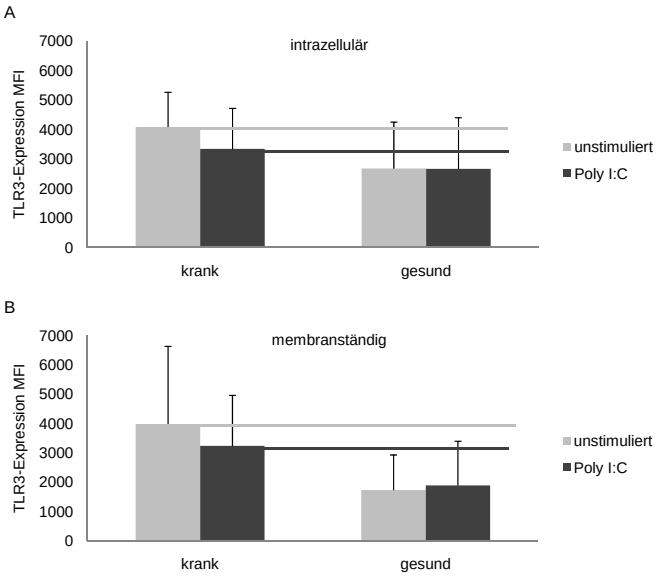

Abbildung 20: TLR3 wird bei Tumorpatienten stärker exprimiert als bei gesunden Patienten
A: Diagramm der intrazellulären TLR3-Expression im FACS. B: Diagramm der membranständigen TLR3-Expression im FACS. A+B: Gezeigt werden Mittelwerte von Tumorpatienten (n=3) und von gesunden Spendern (n=8). Die hellgrauen Säulen stellen die Expression der unstimulierten Zellen und die dunkelgrauen die der mit Poly I:C stimulierten NK-Zellen dar. Durch hell- und dunkelgraue Linien, die bei den Säulen der Tumorpatienten (krank) beginnen, soll der Unterschied bezüglich der Expression von TLR3 verdeutlicht werden. Bei NK-Zellen von Tumorpatienten war die TLR3-Expression intrazellulär und an der Zelloberfläche höher als bei gesunden Spendern. Die TLR3-Expression wurde intrazellulär und an der Zelloberfläche nach Poly I:C-Stimulation bei Tumorpatienten verringert. Bei gesunden Spendern war kein Unterschied durch die Poly I:C-Stimulation festzustellen.

3.3.3 Poly I:C wird über MDA5 erkannt

Nicht nur *Toll-like* Rezeptoren binden RNA. Die Rezeptoren MDA5, RIG-I und LGP2 gehören zur Familie der *RIG-I-like* Rezeptoren (RLRs) und erkennen und binden virale RNA im Zytoplasma (Kawai und Akira, 2008).

MDA5, ein Rezeptor der RLRs, erkennt dsRNA wie beispielsweise Poly I:C und ist somit ein weiterer Rezeptor, der für die Aktivierung von NK-Zellen nach Stimulation mit Poly I:C mitverantwortlich sein kann. Deshalb wurde dieser Rezeptor in den folgenden Versuchen näher betrachtet.

Um den Rezeptor visuell sowohl in HNSCC als auch in NK-Zellen darzustellen, wurden Cytospins von isolierten NK-Zellen, die für 48 h in Medium inkubiert wurden, zusammen mit HNSCC-Zellen (PCI-1) im Verhältnis 10:1 (NK-Zellen:HNSCC) angefertigt. Um die NK-Zellen von den HNSCC-Zellen anhand der Größe unterscheiden zu können, wurden zuvor Einzelpräparate von NK-Zellen und HNSCC-Zellen mittels Cytospin-Technik angefertigt. Auf den mikroskopischen Apotom-Aufnahmen ist deutlich zu erkennen, dass sowohl Tumorzellen als auch NK-Zellen MDA5 und CD56 exprimieren (Abbildung 21).

Drei NK-Zellen haben sich an die größere Tumorzelle angelagert (Abbildung 21). NK-Zellen lassen sich von den Tumorzellen anhand ihrer Größe und der Größe ihres Zellkerns unterscheiden. CD56 wurde als Oberflächenantigen hauptsächlich an der Zelloberfläche exprimiert (Abbildung 21 A und B). Die

MDA5-Expression konnte sowohl an der Oberfläche als auch im Zytoplasma der Zelle nachgewiesen werden (Abbildung 21 A und C).

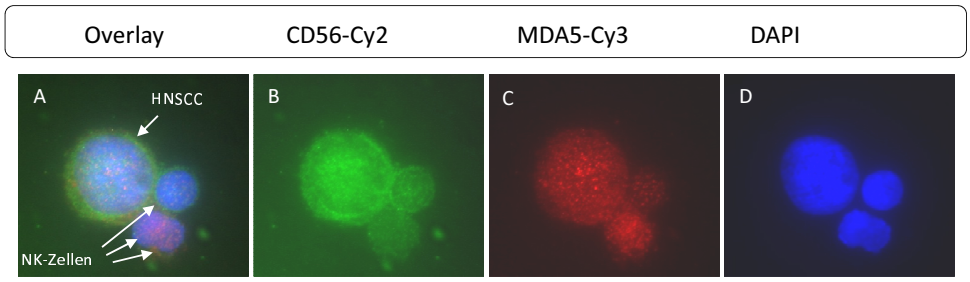

Abbildung 21: MDA5 kann sowohl in Tumorzellen als auch in NK-Zellen nachgewiesen werden
Isolierte NK-Zellen wurden für 48 h in Medium inkubiert und anschließend mit PCI-1-Zellen im Verhältnis 10:1 (NK-Zellen:HNSCC) mit Hilfe einer Cytospinzentrifuge auf Objektträgern fixiert. Die erstellten Cytospins wurden immunhistochemisch mit Anti-CD56 und Anti-MDA5 gefärbt. Die Aufnahme wurde mit dem Apotom-Modus angefertigt. Dargestellt ist eine Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer HNSCC-Zelle und drei angelagerten NK-Zellen. Eine intrazelluläre und membranständige MDA5-Expression wurde bei HNSCC-Zellen und NK-Zellen gezeigt. A: Overlay von Cy2, Cy3 und Dapi B:Cy2 C: Cy3 D: Dapi

Um den optimalen Inkubationszeitraum mit Poly I:C für die MDA5-Expression zu ermitteln, wurden isolierte NK-Zellen mit Medium und mit Medium + Poly I:C für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die NK-Zellen für die FACS-Messung mit Anti-MDA5 und Anti-CD56 gefärbt. Um MDA5 intrazellulär nachzuweisen, wurde zuerst die Färbung mit Anti-CD56 und anschließend die Färbung mit Anti-MDA5 und Permeabilisierungspuffer durchgeführt. Nach 24 Stunden war weder bei der $CD56^{dim}$ -Subpopulation noch bei den $CD56^{bright}$ -Zellen ein Effekt durch Poly I:C zu beobachten. Nach 48-stündiger Inkubation wurde jedoch bei beiden Subpopulationen MDA5 nach Stimulation mit Poly I:C um mehr als das Doppelte exprimiert. Nach 72 h Inkubation der NK-Zellen war bei der $CD56^{bright}$-Population keine Veränderung zu vermerken, bei der Subpopulation $CD56^{dim}$ war die MDA5-Expression im Medium stärker ausgeprägt als mit Poly I:C-Zugabe (Abbildung 22). Deshalb wurden die NK-Zellen in den folgenden Versuchen immer über einen Zeitraum von 48 Stunden inkubiert.

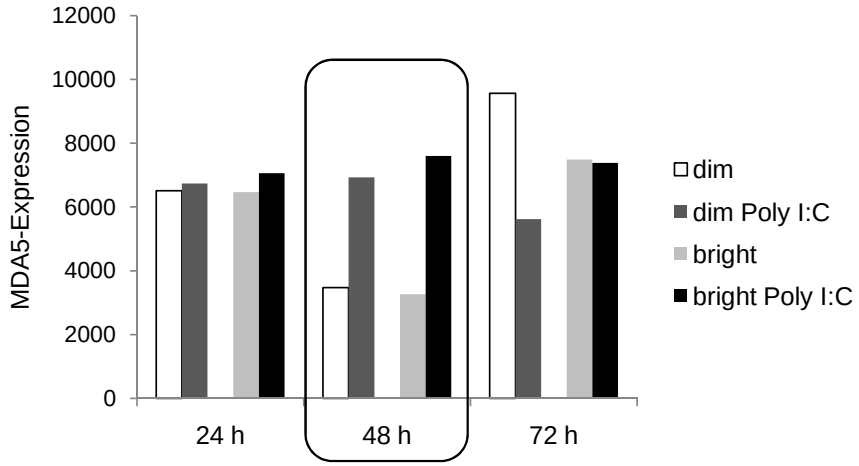

Abbildung 22: Optimale Inkubationszeit mit Poly I:C für die Steigerung der MDA5-Expression
Darstellung eines Säulendiagramms der intrazellulären MDA5-Expression (MFI) isolierter NK-Zellen. Die NK-Zellen wurden über drei unterschiedliche Zeiträume (24 h, 48 h und 72 h) mit Poly I:C stimuliert und mit unstimulierten Kontrollen verglichen. Die MDA5-Expression der verschiedenen Inkubations-Zeiträume wird für unstimulierte $CD56^{dim}$-NK-Zellen (weiß) und $CD56^{bright}$-NK-Zellen (hellgrau) sowie für stimulierte $CD56^{dim}$-NK-Zellen (dunkelgrau) und $CD56^{bright}$-NK-Zellen (schwarz) dargestellt. Der schwarze Kasten zeigt den optimalen Inkubationszeitraum mit Poly I:C für die MDA5-Expression.

Der Einfluss von HNSCC auf die MDA5-Expression in NK-Zellen wurde untersucht, weil die immunsuppressive Wirkung des HNSCC-Überstandes bei der extrazellulären Expression von TLR3 besonders deutlich wurde.

Isolierte NK-Zellen wurden deshalb für 48 Stunden mit PCI-13-Überstand inkubiert, als Kontrolle dienten mit Medium inkubierte Zellen. Die NK-Zellen wurden, wie zuvor beschrieben, für die Durchflusszytometrie mit Anti-CD56 und Anti-MDA5 gefärbt. Für diesen Versuch wurden NK-Zellen von 18 gesunden Spendern verwendet. Um den Einfluss des HNSCC-Milieus der Zelllinie PCI-13 mit dem HNSCC-Milieu im Tumor vergleichen zu können, wurden aus peripherem Blut von zehn Tumorpatienten NK-Zellen isoliert und wie bereits beschrieben inkubiert.

Die Abbildung 23 zeigt die Diagramme der Mittelwerte der FACS-Messungen von MDA5. Die dargestellten Expressionswerte waren in ihrem Verhältnis zueinander ähnlich ausgeprägt, unterschieden sich jedoch intrazellulär und membranständig und jeweils zwischen $CD56^{dim}$ und $CD56^{bright}$. MDA5 wurde sowohl intrazellulär als auch oberflächlich stärker von den $CD56^{bright}$-NK-Zellen exprimiert. Außerdem war die MDA5-Expression intrazellulär wesentlich höher als auf der Zelloberfläche. Die hohen Standardabweichungen bei der FACS-Analyse waren problematisch. In der Abbildung 23 wird deutlich, dass die MDA5-Expression durch das HNSCC-Milieu bei beiden Subpopulationen verringert wurde. Vor allem bei Tumorpatienten war die MDA5-Expression sehr stark vermindert. Interessanterweise war das Level von MDA5 in NK-Zellen erkrankter Spender eindeutig geringer als in NK-Zellen von gesunden Spendern, während bei der TLR3-Expression der gegenteilige Effekt auftrat (siehe Abbildung 20). Die Messung von TLR3 und MDA5 erfolgte gleichzeitig bei denselben Tumorpatienten. MDA5 wurde

demzufolge nicht wie TLR3 durch die Anwesenheit des HNSCC-Milieus internalisiert, sondern generell vermindert exprimiert (Abbildung 23).

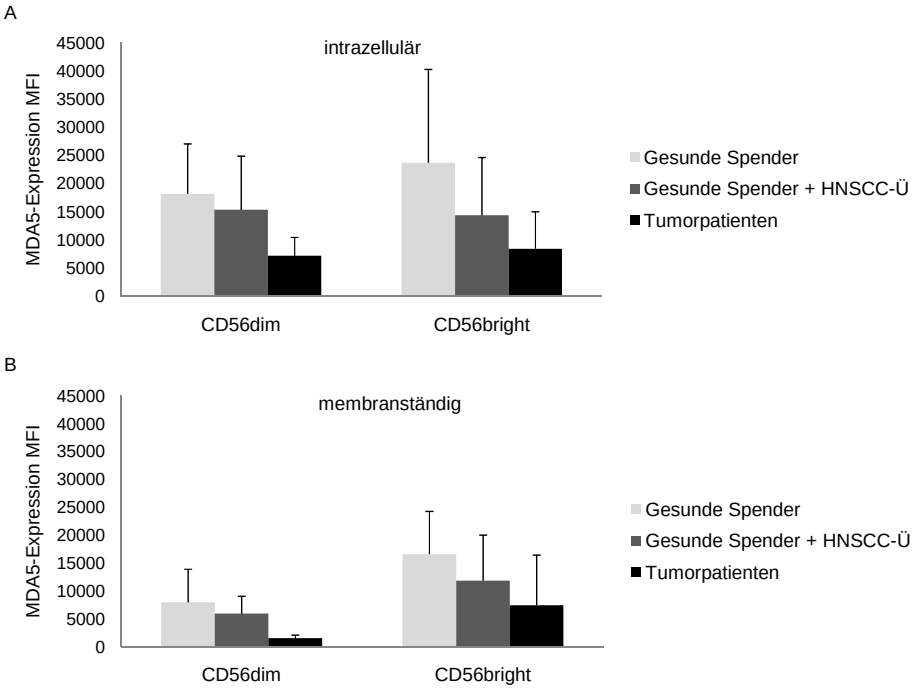

Abbildung 23: MDA5 wird durch HNSCC-Milieu vermindert exprimiert
In dieser Abbildung werden die Diagramme der Mittelwerte (MFI) der intrazellulären (A) und membranständigen (B) Expression von MDA5 gezeigt. In jedem Diagramm wird die Expression in $CD56^{dim}$-NK-Zellen und in $CD56^{bright}$-NK-Zellen (X-Achse) dargestellt. Bei jeder Subpopulation sind drei Balken zu sehen: mit Medium inkubierte NK-Zellen gesunder Spender (hellgrau), mit HNSCC-Überstand (HNSCC-Ü) inkubierte NK-Zellen gesunder Spender (dunkelgrau) und mit Medium inkubierte NK-Zellen von HNSCC-Patienten (schwarz). Die intrazelluläre (A) und die membranständige (B) Expression von MDA5 sind unterschiedlich ausgeprägt, die Expression ist jeweils bei den gesunden Spendern am höchsten und bei den Tumorpatienten am geringsten. Die NK-Zellen gesunder Spender, die mit HNSCC-Überstand inkubiert wurden, exprimierten höhere Level MDA5 als die von Tumorpatienten, aber geringere als NK-Zellen gesunder Spender, die mit Medium inkubiert wurden.

Der Einfluss von Poly I:C auf die MDA5-Expression sollte untersucht werden. NK-Zellen wurden aus *Buffy Coats* isoliert, für 48 h mit Poly I:C inkubiert und im Anschluss für die Durchflusszytometrie vorbereitet. In Abbildung 24 sind vier Diagramme der MDA5-Expression von NK-Zellen (unstimuliert und stimuliert) abgebildet: $CD56^{dim}$ intrazellulär (A), $CD56^{bright}$ intrazellulär (B), $CD56^{dim}$ membranständig (C), $CD56^{bright}$ membranständig (D). Da die MDA5-Expression bereits bei unstimulierten Zellen sehr heterogen war, sah man nach der Poly I:C - Stimulation keinen deutlichen Effekt bei Betrachtung der Mittelwerte. Man konnte erkennen, dass membranständig weniger MDA5 exprimiert wurde als intrazellulär. Wenn man die MFI-Werte der einzelnen Spender, die von eins bis achtzehn durchnummeriert wurden, betrachtet, fällt auf, dass es bei einzelnen Spendern nach Stimulation mit Poly I:C sowohl erhöhte MDA5-Werte gab als auch verminderte. Deshalb war es unmöglich, die Spender direkt zu vergleichen. Es scheint allerdings so, als wenn die Veränderung der MDA5-Expression durch Poly I:C bei den $CD56^{bright}$-NK-Zellen, vor allem membranständig, stärker auftritt als bei der $CD56^{dim}$-Population.

Die Aktivierung von NK-Zell-Funktionen durch Poly I:C zeigte sich nicht in einer eindeutigen Veränderung der MDA5-Expression.

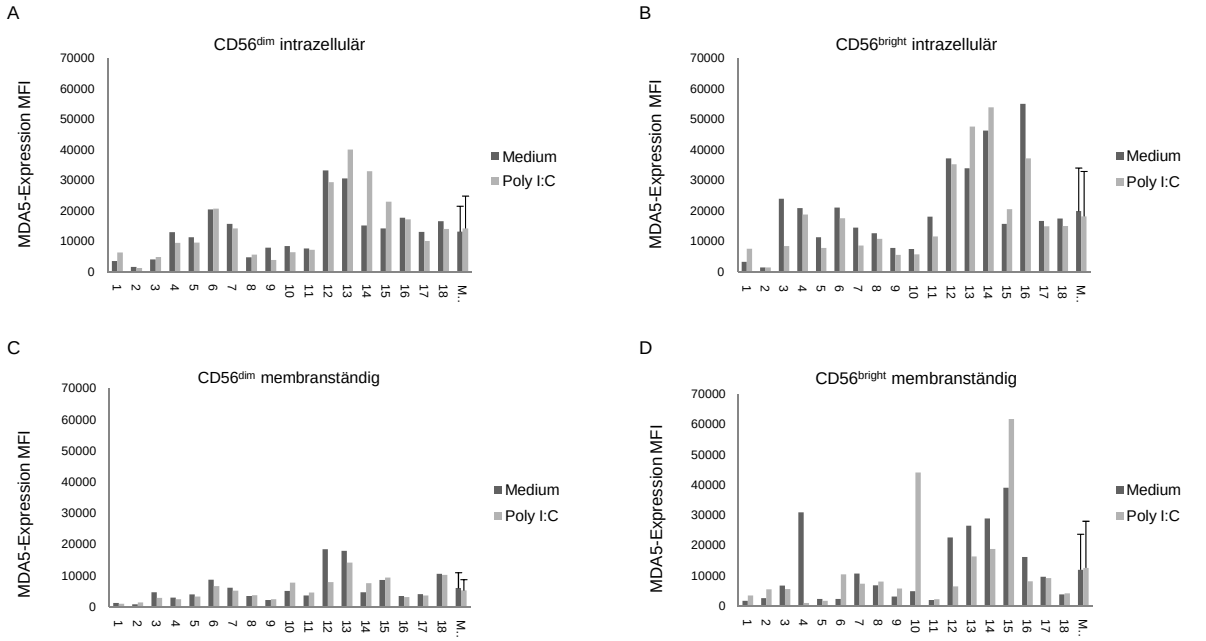

Abbildung 24: Poly I:C hat einen sehr heterogenen Einfluss auf die MDA5-Expression gesunder Spender
Vier Diagramme der MDA5-Expression gesunder Spender (n=18) werden in dieser Abbildung gezeigt. A: CD56^{dim} intrazellulär, B: CD56^{bright} intrazellulär, C: CD56^{dim} membranständig, D: CD56^{bright} membranständig. Die MDA5-Expression von 18 gesunden Spendern war sehr heterogen. Auf der Zelloberfläche wurde weniger MDA5 exprimiert als intrazellulär. Poly I:C wirkte sich eher auf die MDA5-Expression bei den CD56^{bright}-NK-Zellen als bei den CD56^{dim}-NK-Zellen aus.

Der Einfluss von Poly I:C auf die MDA5-Expression wurde ebenfalls durch immunhistochemische Färbungen von Cytospins untersucht. Isolierte NK-Zellen gesunder Spender wurden für 48 h mit Medium sowie mit Medium und Poly I:C inkubiert und anschließend immunhistochemisch gefärbt. In Abbildung 24 werden sowohl die mikroskopischen Aufnahmen der unstimulierten NK- Zellen als auch die der mit Poly I:C stimulierten NK-Zellen gezeigt. NK-Zellen, die mit Poly I:C stimuliert wurden, exprimierten mehr MDA5 an der Zelloberfläche als unstimulierte NK-Zellen (Abbildung 24). Bei den unstimulierten NK-Zellen war die MDA5-Expression intrazellulär ausgeprägter als auf der Zelloberfläche. Bei den stimulierten NK-Zellen hingegen wurde die membranständige Färbung intensiver, dafür wurde die intrazelluläre Expression schwächer. Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass durch die Stimulation mit Poly I:C die MDA5-Expression auf die Zelloberfläche verschoben wurde. Dieser Effekt konnte bei anderen gesunden Spendern ebenfalls beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Diese eindeutige Veränderung der MDA5-Expression konnte bei FACS-Analysen nicht gezeigt werden, da die MDA5-Expression nach Poly I:C-Stimulation bei diesen Versuchen sehr heterogen war.

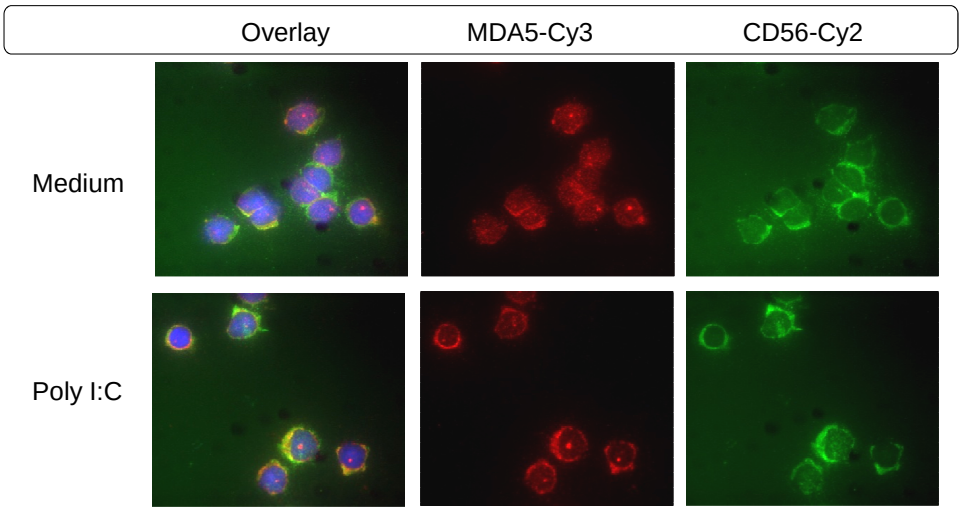

Abbildung 25: MDA5 wird durch Poly I:C vermehrt an der Oberfläche exprimiert
Dargestellt sind die mikroskopischen Aufnahmen von NK-Zellen, die sowohl mit Medium als auch mit Medium und Poly I:C für 48 h inkubiert wurden. Die obere Reihe zeigt die mit Medium inkubierten Zellen, die untere die stimulierten. Dargestellt sind folgende Fluoreszenzen von links nach rechts: Overlay von CD56-Cy2, MDA5-Cy3 sowie Dapi, MDA5-Cy3 und CD56-Cy2. Die MDA5-Expression war bei unstimulierten Zellen intrazellulär stärker ausgeprägt als membranständig. Bei mit Poly I:C stimulierten NK-Zellen wurde MDA5 jedoch vermehrt auf der Zelloberfläche exprimiert.

3.3.4 Poly I:C steigert die Zytokinsekretion durch NK-Zellen

Eine Funktion von NK-Zellen ist die Zytokin- und Chemokinsekretion. Natürliche Killerzellen sind vor allem dafür bekannt, dass sie IFN-γ produzieren. Sie sekretieren aber ebenfalls TNF-α, GM-CSF, IL-5, IL-13, MIP-1 (a und h) und Rantes (Orange und Ballas, 2006). Diese immunregulatorische Funktion wird den $CD56^{bright}$-NK-Zellen zugeordnet (siehe Kapitel 3.2).

Der Einfluss von Poly I:C auf die Zytokinsekretion von NK-Zellen wurde deshalb geklärt. NK-Zellen wurden aus *Buffy Coats* isoliert und mit Medium, HNSCC-Überständen (PCI-13, PCI-1 und BHY) und Poly I:C für 48 h inkubiert, der Überstand der NK-Zellen wurde abgenommen und für die Zytokinanalyse mittels Flex-Set eingesetzt.

Eine 24-stündige Inkubation mit Poly I:C führte zu keiner deutlich erhöhten Zytokinsekretion (Daten nicht gezeigt), deshalb wurden die NK-Zellen wie bei Mian *et al.* (2008) für 48 Stunden mit Poly I:C inkubiert.

Die Zytokine Interferon-γ (IFN-γ), Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) und Interleukin-6 (IL-6) wurden analysiert. Zusätzlich zu den Th1-Zytokinen Interferon-γ (IFN-γ), Tumornekrosefaktor-α (TNF-α), deren Produktion als Antwort auf die NK-Zell-Aktivierung bekannt ist, sollte IL-6 als Th2-Zytokin ebenfalls analysiert werden.

In Abbildung 26 sind die Diagramme der Flex-Set-Messung von drei gesunden Spendern und den dazugehörigen Mittelwerten abgebildet. Die NK-Zellen von „Spender 3“ wurden nur mit Medium sowie mit Medium und Poly I:C inkubiert. Die NK-Zellen der anderen beiden Spender wurden mit Medium,

Medium mit Poly I:C, PCI-13-Überstand sowie PCI-13-Überstand zusammen mit Poly I:C inkubiert. Unstimulierte NK-Zellen sekretierten kaum IFN-γ (durchschnittlich 3,5 pg/ml). Die IFN-γ-Sekretion wurde durch Poly I:C jedoch mit ca. 5300 pg/ml produziertem IFN-γ eindeutig gesteigert (Abbildung 26 A). Das PCI-13-Milieu besaß ebenfalls einen stimulierenden Einfluss auf die Zytokinproduktion von NK-Zellen mit ungefähr 2100 pg/ml, dieser Einfluss wirkte sich jedoch nicht zusätzlich zu der Poly I:C-Stimulation aus. Das bedeutet, dass NK-Zellen, die mit Poly I:C und PCI-13-Überstand inkubiert wurden, ungefähr genauso viel IFN-γ produzierten wie NK-Zellen, die mit Medium und Poly I:C stimuliert wurden. Von den drei gemessenen Zytokinen wurde die IFN-γ-Sekretion durch Poly I:C durchschnittlich am stärksten gesteigert.

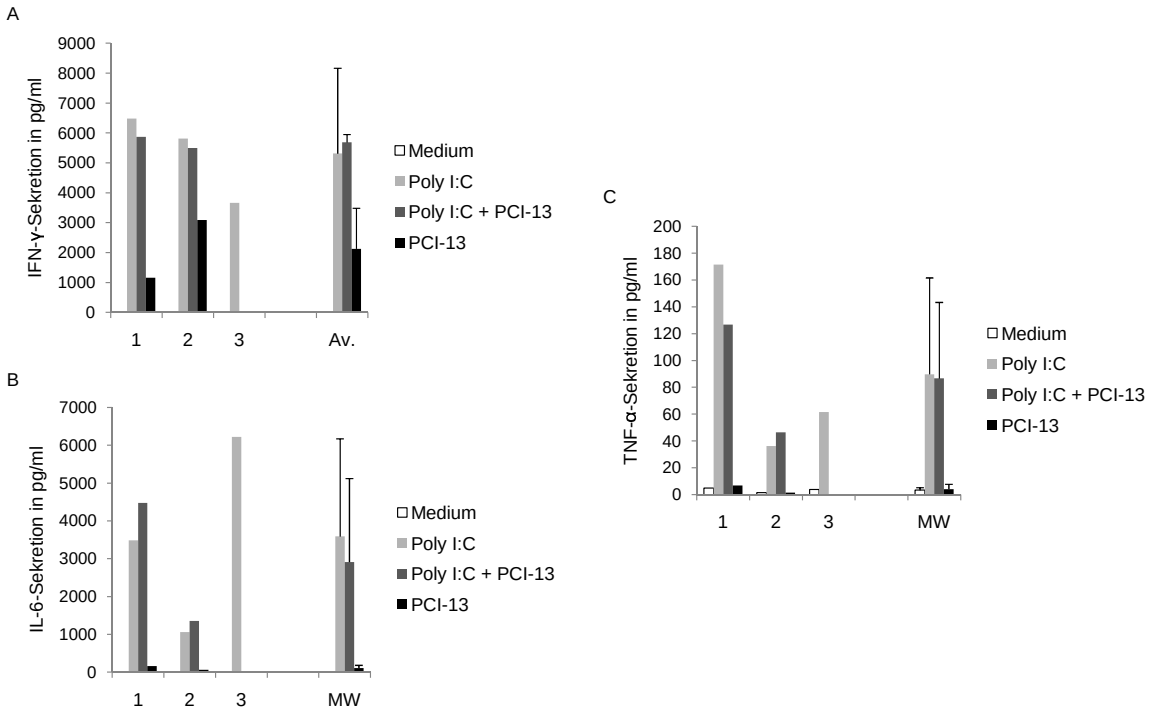

Abbildung 26: Poly I:C wirkt auf die Zytokinsekretion gesunder Spender
Der Überstand isolierter NK-Zellen, die mit Medium, Poly I:C, PCI-13-Überstand und PCI-13-Überstand mit Poly I:C inkubiert waren, wurde für die Zytokinanalyse mit dem Flex-Set-System eingesetzt. Dargestellt sind die Diagramme der Zytokinsekretion von IFN-γ (A), IL-6 (B) und TNF-α (C). Die Y-Achsen der Diagramme, auf der die Zytokinsekretion in pg/ml dargestellt ist, haben unterschiedliche Skalen, da die Level der verschiedenen Zytokine sich stark unterschieden. Auf der X-Achse des jeweiligen Diagramms sind die Spender 1-3 sowie die Mittelwerte aufgetragen. Bei „Spender 3" wurden die NK-Zellen nur mit Medium sowie mit Medium und Poly I:C inkubiert. Weiß: Medium-inkubierte NK-Zellen, Hellgrau: mit Poly I:C stimulierte NK-Zellen, Dunkelgrau: mit Poly I:C und PCI-13-Überstand inkubierte NK-Zellen, Schwarz: mit PCI-13-Überstand inkubierte NK-Zellen. Die Zytokinsekretion von IFN-γ (A), IL-6 (B) und TNF-α (C) wurde durch Poly I:C gesteigert. Die gleichzeitige Inkubation mit Poly I:C und HNSCC-Überstand hatte keinen deutlichen Einfluss auf die Zytokinsekretion. PCI-13 alleine wirkte bei der IFN-γ-Sekretion ebenfalls stimulierend.

Die Abbildung 26 B zeigt die IL-6-Sekretion von NK-Zellen. Die IL-6-Produktion variierte jedoch stark bei den drei Spendern. Durch die Stimulation mit Poly I:C wurde die Produktion von IL-6 deutlich gesteigert, durch Poly I:C und PCI-13-Überstand zusammen wurde dieser Effekt noch verstärkt. Das PCI-13-Milieu hat jedoch allein keinen Einfluss auf die Sekretion dieses Zytokins. Da die Zytokinlevel sich bei den

verschiedenen Spendern so stark unterschieden, wurden die Diagramme mit den Mittelwerten, aber auch mit den Werten jedes einzelnen Spenders, erstellt.

In Abbildung 26 C ist die Sekretion von TNF-α graphisch dargestellt. TNF-α wurde durch die Stimulation mit Poly I:C von durchschnittlich 3,4 pg/ml auf durchschnittlich 90 pg/ml gesteigert, sie blieb bei gleichzeitiger Inkubation mit Poly I:C und PCI-13-Überstand nahezu gleich. Die Inkubation mit PCI-13-Überstand hatte somit keinen Einfluss auf die TNF-α-Sekretion, wie sich auch bei der alleinigen Inkubation mit PCI-13-Überstand zeigte. Die Menge an gebildetem TNF-α in stimulierten NK-Zellen war mit durchschnittlich 90 pg/ml allerdings wesentlich geringer als beispielsweise das Level von IFN-γ mit ca.5300 pg/ml. Die TNF-α-Bildung variierte genauso stark wie die von IL-6.

Um zu zeigen, dass die zuvor beschriebenen Effekte sich nicht nur auf PCI-13 beschränken, sondern auch bei den HNSCC-Zelllinien PCI-1 und BHY auftraten, wurden NK-Zellen ebenfalls mit Überständen dieser Zelllinien und Poly I:C inkubiert. In Abbildung 27 ist das Digramm der Zytokinbestimmung eines gesunden Spenders exemplarisch abgebildet. Die HNSCC-Überstände (von BHY, PCI-1 und PCI-13) steigerten die Zytokinsekretion von IFN-γ (Abbildung 27 A), das PCI-13-Milieu erhöhte die Sekretion am stärksten, PCI-1 am schwächsten. Die NK-Zellen, die mit Poly I:C und Medium oder mit Poly I:C und HNSCC-Überständen inkubiert wurden, zeigten eine starke Zytokinausschüttung mit ca. 5500-5800 pg/ml IFN-γ. Alle drei HNSCC-Überstände wirkten sich nicht auf die Stimulation mit Poly I:C aus, da die Werte sich nicht gravierend von der Kontrolle unterschieden.

Die Abbildung 27 B stellt die Produktion von IL-6 graphisch dar. Il-6 wurde von unstimuliert Zellen kaum gebildet (ca. 5 pg/ml), durch die Inkubation mit den HNSCC-Überständen kam es zu einem leichten Anstieg (PCI-1 und PCI13: 50 - 60 pg/ml), der bei dem BHY-Überstand mit 208,69 pg/ml am deulichsten war. Durch die Stimulation mit Poly I:C wurde IL-6 mit 1061,51 pg/ml vermehrt ausgeschüttet, die Inkubation mit dem BHY-Überstand verstärkte diesen Effekt nicht. Die Anwesenheit der PCI-1 und PCI-13-Überstände bei der Poly I:C-Stimulation führten allerdings zu einer Steigerung der IL-6-Sekretion (1400-1500 pg/ml).

Die Sekretion von TNF-α wurde ebenfalls durch Poly I:C von 1,42 pg/ml (Medium) auf 36,25 pg/ml gesteigert (Abbildung 27 C), wie bereits bei den Mittelwerten dreier Spender beschrieben wurde, war das Zytokinlevel von TNF-α wesentlich geringer als die Level der anderen Zytokine. Durch die gleichzeitige Inkubation mit Poly I:C und HNSCC-Überständen wurde die Produktion von TNF-α leicht gesteigert (PCI-13: 46,5 pg/ml, BHY: 49,13 pg/ml und PCI-1: 38,43 pg/ml).

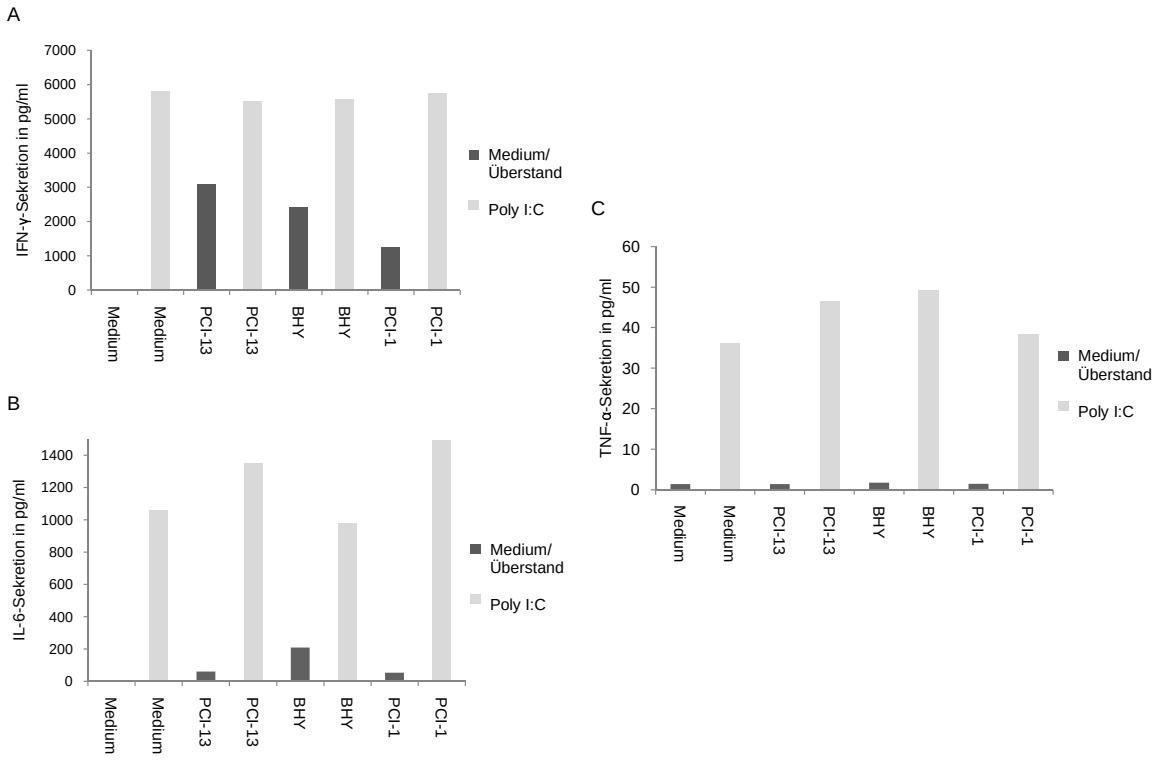

Abbildung 27: Poly I:C steigert die Zytokinsekretion von IFN-γ, IL-6 und TNF-α
Der Überstand isolierter NK-Zellen, die mit Medium, Poly I:C, HNSCC-Überständen von PCI-13, BHY und PCI-1 und HNSCC-Überständen von PCI-13, BHY und PCI-1 mit Poly I:C inkubiert wurden, wurde für die Zytokinmessung mit dem Flex-Set-System eingesetzt. Die Diagramme der Zytokinsekretion von IFN-γ (A), IL-6 (B) und TNF-α (C) sind in dieser Abbildung gezeigt. Die Diagramme, die die Zytokinsekretion in pg/ml darstellen, haben unterschiedliche Skalen, da die Höhe der Zytokinsekretion unterschiedlich war. Die unstimulierten NK-Zellen sind durch dunkelgraue Säulen gekennzeichnet, die mit Poly I:C stimulierten durch hellgraue Säulen. Die Zytokinsekretion der drei gemessenen Zytokine wurde durch Poly I:C gesteigert. A Die HNSCC-Überstände steigern ebenfalls die IFN-γ-Sekretion, aber nicht so stark wie Poly I:C oder Poly I:C mit HNSCC-Überständen. B Die HNSCC-Überstände wirken nur wenig stimulierend auf die IL-6-Sekretion, mit Poly I:C zusammen wirken PCI-13 und PCI-1 sogar stärker stimulierend als Poly I:C alleine. C Poly I:C steigert die TNF-α-Sekretion. Die gleichzeitige Inkubation mit HNSCC-Überständen und Poly I:C führt zu einer leichten Steigerung der TNF-α-Sekretion.

Da gezeigt werden konnte, dass sich Poly I:C positiv auf die Zytokinsekretion von IFN-γ, IL-6 und TNF-α bei NK-Zellen gesunder Spender auswirkt, sollte die Zytokinsekretion auch bei Tumorpatienten überprüft werden.

NK-Zellen wurden aus dem peripheren Blut von Tumorpatienten isoliert und für 48 h mit Medium sowie mit Medium und Poly I:C inkubiert. In Abbildung 28 werden die drei Diagramme der Zytokinmessungen von IFN-γ, IL-6 und TNF-α dargestellt. Poly I:C stimuliert deutlich die Produktion der drei Zytokine bei NK-Zellen von den Tumorpatienten. Vergleicht man jedoch die IFN-γ-Sekretion dieses Tumorpatienten mit der gesunder Spender (Abbildungen 26 A und 27 A) nach Poly I:C-Stimulation, wird deutlich, dass der Tumorpatient weniger als ein Hundertstel der Menge IFN-γ produziert.

Die TNF-α-Produktion ist bei Tumorpatienten sehr gering und wurde durch Poly I:C von 3,7 pg/ml auf 7,8 pg/ml gesteigert. Il-6 wurde bei Tumorpatienten noch deutlich gebildet, im Vergleich zu dem gesunden Spender wurde nach Poly I:C-Stimulation mit 533,8 pg/ml etwa die Hälfte an IL-6 produziert.

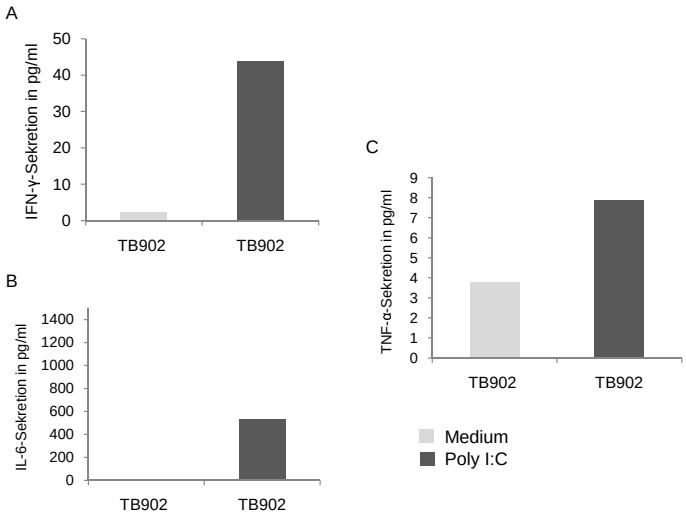

Abbildung 28: Poly I:C steigert die Zytokinsekretion bei Tumorpatienten weniger als bei Gesunden
Gezeigt werden drei Diagramme der Zytokinsekretion (A: IFN-γ,B: IL-6 und C: TNF-α) eines Tumorpatienten. Die unstimulierten NK-Zellen werden als dunkelgraue und die mit Poly I:C stimulierten als hellgraue Balken dargestellt. Die Diagramme wurden anhand der im FACS gemessenen Werte der Zytokinsekretion in pg/ml erstellt. Die Zytokinsekretion wurde auch bei NK-Zellen von dem Tumorpatienten gesteigert, aber zu wesentlich geringeren Leveln als bei NK-Zellen gesunder Spender. Die IL-6-Sekretion wurde noch am stärksten gesteigert (B).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die durch Poly I:C induzierte Zytokinsekretion bei Tumorpatienten stark eingeschränkt war. Poly I:C hatte eine eindeutig immunstimulatorische Wirkung auf NK-Zellen über TLR3 und MDA5 und stellt somit einen potentiellen Stimulus zur Aktivierung von NK-Zellen bei HNSCC dar. Allerdings wirkte Poly I:C auch stimulierend auf HNSCC-Zellen (Pries *et al.*, 2008a; Riebe, 2009). Aus diesem Grund wurde immunstimulatorische RNA, ein weiterer möglicher Stimulus für die Aktivierung von NK-Zellfunktionen, untersucht.

3.4 ss-isRNA aktiviert NK-Zell-Funktionen über TLR7

Im Vordergrund der Untersuchungen stand, ob einzelsträngige immunstimulatorische RNA NK-Zell-Funktionen aktivieren kann. Die bei Hornung *et al.* (2005) beschriebene, immunstimulatorische RNA „RNA9.2s“ (5´-AGCUUAACCUGUCCUUCAA-3´), wurde für die im folgenden Kapitel durchgeführten Versuche verwendet und wurde deshalb immer als ss-isRNA bezeichnet.

Um auszuschließen, dass ss-isRNA das Wachstum von HNSCC-Zellen beeinflusst, wurde ein MTT Zell-Proliferationstest durchgeführt. Die Abbildung 29 zeigt das Wachstum der HNSCC-Zelllinien BHY, PCI-1 und PCI-13 über einen Zeitraum von 72 Stunden mit und ohne Zugabe von 1 μM ss-isRNA. Ss-isRNA beeinflusst das Wachstum der HNSCC-Zelllinien weder eindeutig positiv noch negativ, das wird bei allen drei Zelllinien deutlich.

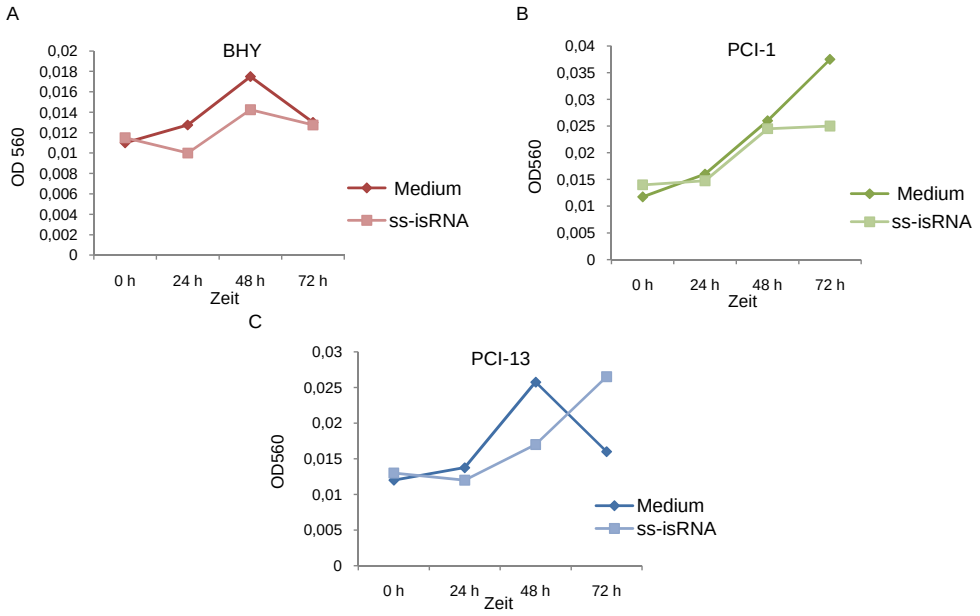

Abbildung 29: ss-isRNA wirkt sich nicht auf das Wachstum von HNSCC-Zellen aus
Dargestellt ist ein Zell-Proliferationstest der drei HNSCC-Zelllinien PCI-1, PCI-13 und BHY. In 96-Well-Platten wurden 2500 Zellen pro Well (PCI-1 und PCI-13) beziehungsweise 5000 Zellen pro Well (BHY) in 100 µl DMEM ausgesät und mit 1 µM ss-isRNA für einen Zeitraum von 72 Stunden stimuliert. Alle 24 Stunden wurde das Zellwachstum mittels MTT-Test bestimmt. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Die Diagramme werden in Abbildung A für BHY, in Abbildung B für PCI-1 und in Abbildung C für PCI-13 dargestellt. Die hellere Linie steht jeweils für die mit ss-isRNA stimulierten Zellen. Die Zellproliferation der drei Zelllinien wurde durch ss-isRNA nicht beeinflusst.

NK-Zellen besitzen eine natürliche Zytotoxizität, indem sie Zielzellen wie z.B. Tumorzellen oder virusinfizierte Zellen ohne vorherige Aktivierung, vorherigen Kontakt oder die Unterstützung von Zytokinen direkt zerstören können (Trinchieri, 1989).

Um die Wirkung von ss-isRNA auf die NK-Zell-Zytotoxizität gegen Tumorzellen zu untersuchen, wurden Zytotoxizitätstests durchgeführt. NK- Zellen wurden frisch aus *Buffy Coats* isoliert und für 24 Stunden mit 100 nM sowie 1 µM ss-isRNA inkubiert. Zusätzlich wurden NK-Zellen mit BHY-Überstand sowie mit Medium als Kontrolle inkubiert. Nach der Inkubation wurden die NK-Zellen mit Hilfe des CytoTox 96® *Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* auf ihre Zytotoxizität untersucht. Die Effektorzellen waren die zuvor inkubierten NK-Zellen, während als Target-Zellen BHY-Zellen eingesetzt wurden. Die NK-Zellen wurden in den Verhältnissen 10:1, 5:1 und 2,5:1 zu den BHY-Zellen eingesetzt.

Die Target-Zelllyse durch unstimulierte NK-Zellen lag zwischen 15 und 25 %. Die mit ss-isRNA stimulierten NK-Zellen zeigten eine deutlich höhere Zytotoxizität als die unstimulierten Zellen. NK-Zellen, die mit 1 µM ss-isRNA stimuliert wurden, töteten zwischen 90 und 95 % der HNSCC-Zellen als Antwort auf die Stimulation (Abbildung 30). Die Zelllyse war bei NK-Zellen, die mit 100 nM ss-isRNA stimuliert wurden, deutlich geringer als bei der Konzentration 1 µM, aber bei den Verhältnissen NK-Zellen zu HNSCC-Zellen von 10:1 und 5:1 mit 30 bis 45 % höher als bei unstimulierten NK-Zellen. Die NK-Zell-Kultur mit HNSCC-Überstand führt zu einer verminderten Zytotoxizität verglichen mit der Mediumkontrolle (Abbildung 30). Nach diesen Versuchen wurde deutlich, dass die ss-isRNA-Konzentration von 1 µM deutlich

immunstimulatorischer ist als die geringere Konzentration (100 nM). Deshalb wurde für weiterführende Versuche die ss-isRNA mit der höheren Konzentration eingesetzt.

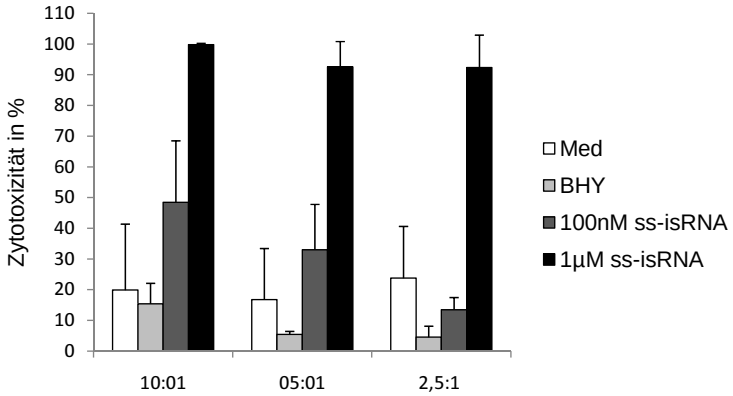

Abbildung 30: NK-Zell-Zytotoxizität gegen HNSCC wird durch ss-isRNA gesteigert
Dargestellt ist das Säulendiagramm der Zytotoxizitätstests. Isolierte NK-Zellen wurden mit 1 µM sowie 100 nM ss-isRNA, BHY-Überstand und DMEM für 12 Stunden inkubiert. Die NK-Zellen wurden in den Verhältnissen 10:1, 5:1 und 2,5:1 zu den BHY-Zellen eingesetzt. Die Zytotoxizität der NK-Zellen konnte durch die Stimulation mit ss-isRNA gesteigert werden, die höhere Konzentration (1 µM) wirkt hierbei immunstimulatorischer als die geringere Konzentration (100 nM). Durch HNSCC wurde die natürliche Zytotoxizität im Vergleich zur Medium-Kontrolle deutlich verringert.

Um diesen Prozess der NK-Zell vermittelten Lyse von HNSCC-Zellen zu visualisieren, wurde *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie angewendet. NK-Zellen wurden aus peripherem Blut gesunder Spender isoliert und für 12 h mit 1 µM ss-isRNA inkubiert. HNSCC-Zellen (PCI-1) wurden mit einem GFP- (*green fluorescent protein*-) markierten doppelsträngigen Nonsens-Oligonukleotid transfiziert, um eine unspezifische zytoplasmatische Fluoreszenz der HNSCC-Zellen zu erreichen, die die Analyse der Zelllyse ermöglicht. Diese transfizierten HNSCC-Zellen wurden mit den stimulierten NK-Zellen für 5 Stunden unter dem Mikroskop inkubiert. In Abbildung 31 sind die mikroskopischen Aufnahmen der ungefärbten, wesentlich kleineren NK-Zellen und den grün fluoreszierenden HNSCC-Zellen dargestellt.
Beim Inkubationsbeginn konnte man die NK-Zellen und die HNSCC-Zellen getrennt voneinander erkennen. Während der fünfstündigen Inkubation setzte zuerst die Wanderung der NK-Zellen zu den HNSCC-Zellen mit anschließender Anlagerung an die Targetzellen ein. Im Anschluss konnte anhand des grün fluoreszierenden Zytoplasmas der HNSCC-Zellen die beginnende Zelllyse mit austretendem Zytoplasma beobachtet werden. Nach ca. 5 Stunden endete dieser Versuch mit einer vollständigen Zelllyse der HNSCC-Zellen durch die NK-Zellen.

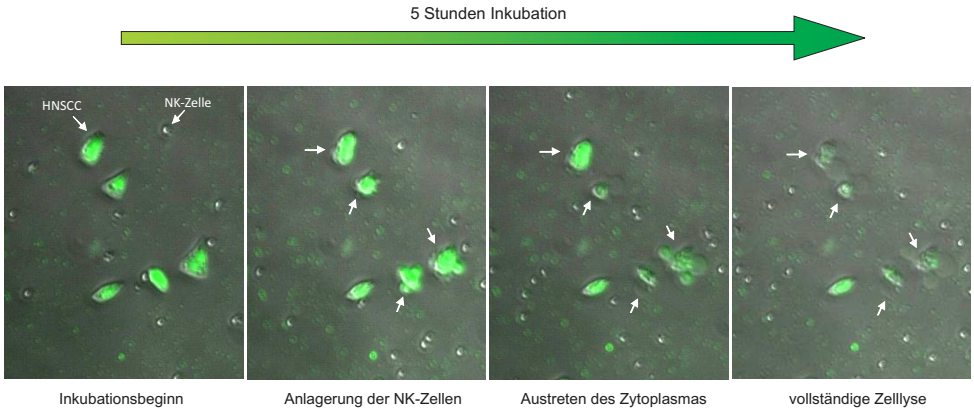

Abbildung 31: In vivo Fluoreszenzmikroskopie - Bildliche Darstellung der Tumor-Zelllyse durch NK-Zellen
NK-Zellen wurden für 12 h mit 1 μM ss-isRNA inkubiert und im Anschluss zu transfizierten PCI-1-Zellen gegeben. Die Zelllyse konnte über einen Zeitraum von 5 h mikroskopisch beobachtet werden. Vier unterschiedliche Zeitpunkte werden hier gezeigt: der Inkubationsstart mit den getrennt voneinander dargestellten farblosen NK-Zellen und den größeren grün fluoreszierenden PCI-1-Zellen, die Anlagerung der NK-Zellen an die Tumorzellen, die beginnende Zelllyse, die durch das Austreten des grün fluoreszierenden Zytoplasmas der HNSCC-Zellen gekennzeichnet ist und die vollständige Zelllyse.

Dieser Versuch wurde ebenfalls mit isolierten NK-Zellen von Patienten mit HNSCC durchgeführt. Hierbei konnte der gleiche Effekt beobachtet werden, aber der Zeitraum in dem die Target-Zellen von den NK-Zellen komplett lysiert wurden, war wesentlich länger (Daten nicht gezeigt).

Der Einfluss des HNSCC-Milieus auf die durch ss-isRNA stimulierte NK-Zell-Zytotoxizität sollte analysiert werden. Isolierte NK-Zellen wurden zu diesem Zweck entweder mit HNSCC-Überstand oder mit ss-isRNA für jeweils 12 Stunden vorinkubiert und anschließend für weitere 12 Stunden mit ss-isRNA beziehungsweise HNSCC-Überstand weiterinkubiert. Mit Hilfe dieser Vorinkubationen sollte untersucht werden, ob NK-Zellen, die vor einer Stimulation mit ss-isRNA dem HNSCC-Milieu ausgesetzt waren, schlechter stimuliert werden können als NK-Zellen, die zuerst mittels ss-isRNA aktiviert wurden und im Anschluss dem HNSCC-Milieu ausgesetzt wurden. Zusätzlich wurden NK-Zellen gleichzeitig für 24 Stunden mit HNSCC-Überstand und mit ss-isRNA inkubiert, um herauszufinden in wieweit das HNSCC-Milieu die Aktivität der NK-Zellen ohne Vorinkubationen beeinträchtigt. Als Kontrolle wurden NK-Zellen, die 24 Stunden mit Medium inkubiert wurden, mitgeführt.

Obwohl die Zytotoxizität durch die Anwesenheit des HNSCC-Milieus verringert wurde, steigt sie im Vergleich zur Mediumkontrolle durch die Stimulation mit 1 μM ss-isRNA nach wie vor an. Den größten Effekt konnte man nach der zwölfstündigen Vorinkubation mit ss-isRNA beobachten (Abbildung 32). Nach der Vorinkubation mit HNSCC-Überstand konnte die Zytotoxizität der NK-Zellen durch ss-isRNA am geringsten gesteigert werden. Das HNSCC-Milieu beeinflusst die NK-Zell-Zytotoxizität, die durch die Inkubation mit ss-isRNA eigentlich gesteigert wird, negativ (Abbildung 32).

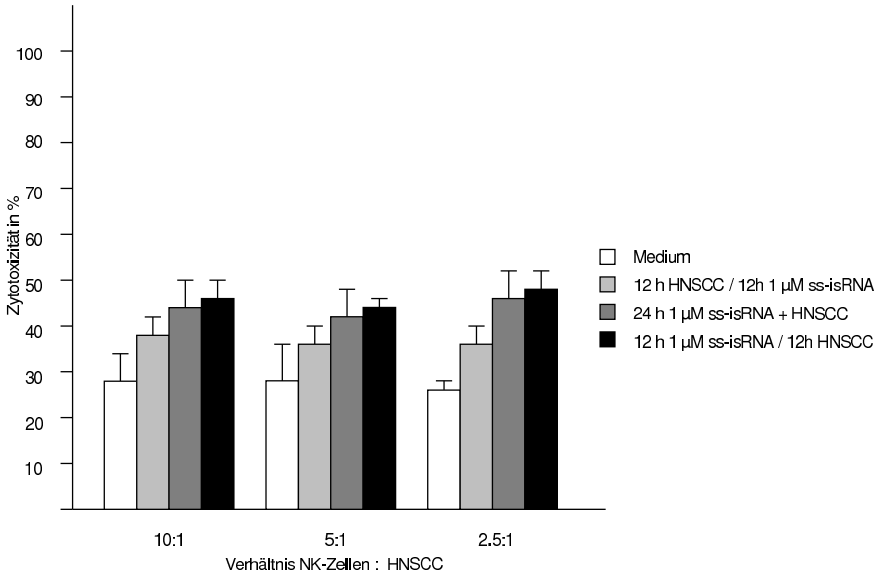

Abbildung 32: HNSCC verringert die durch ss-isRNA induzierte NK-Zell-Zytotoxizität.
Isolierte NK-Zellen wurden mit Medium, nach einer Vorinkubation von 12 h mit HNSCC-Überstand weitere 12 h mit 1 µM ss-isRNA, gleichzeitig für 24 h mit 1 µM ss-isRNA und HNSCC-Überstand sowie nach einer Vorinkubation mit 1 µM ss-isRNA von 12 h mit HNSCC-Überstand weitere 12 h inkubiert. Dargestellt ist ein Zytotoxizitätstest mit den Zellverhältnissen NK-Zellen zu HNSCC von 10:1, 5:1 und 2,5:1. Der HNSCC-Überstand wirkte sich auf die durch ss-isRNA gesteigerte NK-Zell-Zytotoxizität negativ aus. Die Vorinkubation mit HNSCC verminderte die durch ss-isRNA induzierte Zytotoxizität am stäksten.

TLR7 ist für die ss-isRNA vermittelte Aktivierung von PDCs verantwortlich (Hornung *et al.*, 2005), deshalb wurde die TLR7-Expression in humanen NK-Zellen als Antwort auf die Stimulation mit ss-isRNA untersucht. Isolierte NK-Zellen wurden mit ss-isRNA, ss-isRNA und PCI-13-Überstand und Medium für 24 Stunden inkubiert und im Anschluss für die Durchflusszytometrie vorbereitet. Die Zellen wurden mit den Antikörpern Anti-CD56, zur Darstellung der NK-Zellen sowie Anti-TLR7 markiert. Um intrazelluläre Antigene nachzuweisen, wurden die NK-Zellen mit Permeabilisierungspuffer für 15 Minuten zusammen mit den Antikörpern inkubiert. Die TLR7-Expression wurde durch ss-isRNA sowohl intrazellulär als auch auf der Zelloberfläche deutlich gesteigert (Abbildung 33). Durch die Anwesenheit des HNSCC-Milieus wurde die gesteigerte TLR7-Expression leicht reduziert, jedoch nicht aufgehoben.

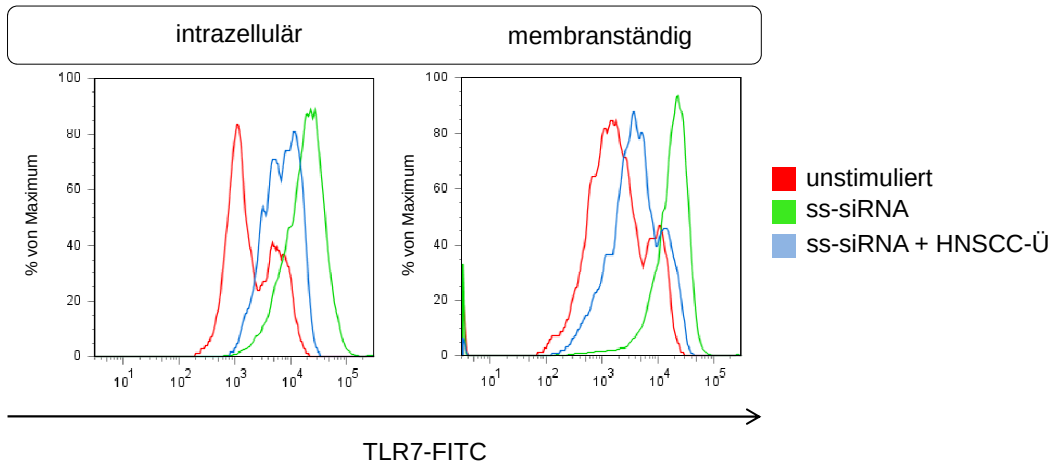

Abbildung 33: Gesteigerte TLR7-Expression als Antwort auf ss-isRNA
Gezeigt werden zwei Histogramme der intrazellulären und membranständigen Färbungen, die mit Hilfe der Flow Jo - Software erstellt wurden. Die Histogramme der einzelnen Messungen: Medium, ss-isRNA und HNSCC + ss-isRNA wurden zur Verdeutlichung der TLR7-Expression übereinandergelegt (Rot: Medium, Grün: ss-isRNA, Blau: HNSCC + ss-isRNA). Isolierte NK-Zellen wurden mit den Antikörpern Anti-CD56 und Anti-TLR7 markiert und für die Messung intrazellulärer Antigene zusätzlich mit Permeabilisierungspuffer inkubiert. TLR7 wurde als Antwort auf die Stimulation mit ss-isRNA vermehrt exprimiert, die durch ss-isRNA erhöhte TLR7-Expression wurde durch die gleichzeitige Inkubation mit HNSCC-Überständen und ss-isRNA reduziert.

Da bereits gezeigt wurde, dass die TLR7-Expression durch ss-isRNA-Stimulation deutlich steigt, wurde untersucht, ob die durch ss-isRNA vermittelte Zytotoxizität gegen HNSCC-Zellen ebenfalls TLR7-abhängig ist. Deshalb wurde TLR7 durch die Inkubation mit einem TLR7-neutralisierenden Antikörper inhibiert. Isolierte NK-Zellen wurden für 1 Stunde mit einem neutralisierenden TLR7-Antikörper vorinkubiert und im Anschluss für 24 Stunden mit ss-isRNA inkubiert. Als Kontrollen dienten mit Medium und mit ss-isRNA inkubierte NK-Zellen. Nach der Inkubation wurde ein Zytotoxizitätstest durchgeführt. In Abbildung 34 werden die Ergebnisse in Form eines Säulendiagramms dargestellt. Überraschenderweise lag die Zytotoxizität der NK-Zellen, die mit neutralisierendem TLR7-Antikörper inkubiert wurden, unter der Zytotoxizität der Mediumkontrolle. Mit ss-isRNA stimulierte NK-Zellen zeigten eine Zytotoxizität von 85 - 90 %. TLR7 ist somit für die Erkennung der ss-isRNA-Moleküle verantwortlich. Hiermit konnte bestätigt werden, dass auch bei NK-Zellen die Aktivierung durch immunstimulatorische RNA über TLR7 läuft.

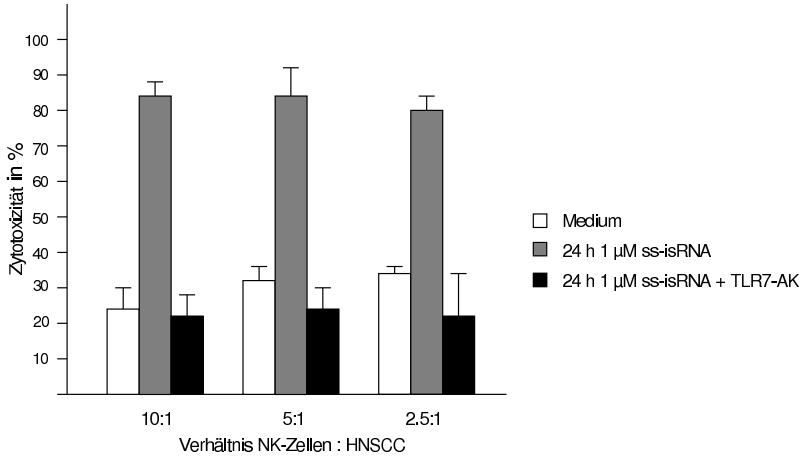

Abbildung 34: Stimulation der NK-Zell vermittelten Zytotoxizität benötigt TLR7
Dargestellt ist ein Säulen-Diagramm eines Zytotoxizitätstests (weiß: Medium, grau: ss-isRNA, schwarz: ss-isRNA + TLR7-AK). Isolierte NK-Zellen wurden mit einem inhibierenden TLR7-Antikörper für 1 h vorinkubiert und im Anschluss mit 1 µM ss-isRNA für 24 h weiterinkubiert. Als Kontrollen wurden NK-Zellen nur mit Medium und ss-isRNA stimuliert. Die NK-Zellen wurden in den Verhältnissen 10:1, 5:1 und 2,5:1 zu den BHY-Zellen für den Zytotoxizitätstest eingesetzt. Die mit TLR7-Antikörper vorinkubierten NK-Zellen konnten mit ss-isRNA nicht stimuliert werden und zeigten im Vergleich mit der Mediumkontrolle keine erhöhte Zytotoxizität.

NK-Zellen können Target-Zellen lysieren, indem sie Granzyme und Perforine aus zytotoxischem Granulat entlassen. Sowohl Granzym B als auch Perforin induzieren Apoptose in Target-Zellen (Chavez-Galan *et al.*, 2009). Deshalb wurde die Expression dieser Effektorproteine in NK-Zellen analysiert. Isolierte NK-Zellen wurden wie zuvor beschrieben stimuliert und anschließend 30 Minuten mit HNSCC-Zellen inkubiert. Um die Effektorproteine Granzym B und Perforin nachweisen zu können, ist ein vorheriger Zell-Zell-Kontakt zwischen NK-Zellen und Tumorzellen notwendig. Die Zellen wurden mit Anti-CD56 sowie mit Anti-Perforin und Anti-Granzym B für die durchflusszytometrische Analyse gefärbt. Im Vergleich zur Mediumkontrolle kann man bei den stimulierten NK-Zellen sowohl einen Anstieg bei der Perforin-Expression als auch bei der Granzym B - Expression erkennen (Abbildung 35). Das ist ein weiterer Beweis dafür, dass immunstimulatorische RNA NK-Zellfunktionen wie beispielsweise die Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen aktiviert. In dem vorher beschriebenen Versuch wurde dies durch die gesteigerte Expression von den Effektorproteinen Perforin und Granzym B hervorgehoben.

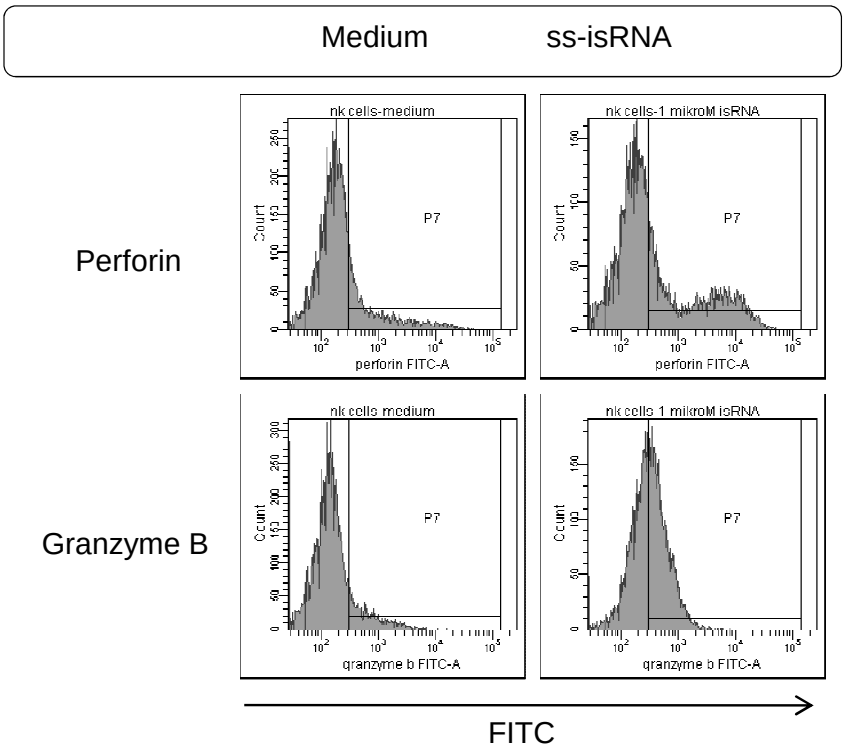

Abbildung 35: Erhöhte Granzym B - und Perforin-Expression durch ss-isRNA-Stimulation
Diese Abbildung zeigt vier Histogramme, die mit der Software BD FACS Diva erstellt wurden. Isolierte NK-Zellen wurden 24 h mit und ohne ss-isRNA inkubiert und im Anschluss 30 Minuten mit PCI-1 - Zellen inkubiert. Nach der Markierung mit Anti-CD56 zur Identifizierung der NK-Zellen und mit Anti-Granzym B und Anti-Perforin wurden die Zellen im FACS Canto durchflusszytometrisch untersucht. Die oberen Histogramme zeigen die Perforin-Expression, die beiden unteren die Expression von Granzym B. Während auf der linken Seite der Abbildung die unstimulierte Kontrolle dargestellt ist, sind auf der rechten Seite die Histogramme der mit ss-isRNA stimulierten Zellen abgebildet. Die NK-Zellen exprimierten nach Stimulation mit ss-isRNA sowohl Perforin als auch Granzym B stärker.

Wie bereits beschrieben wirken NK-Zellen nicht nur zytotoxisch, sondern besitzen auch eine immunregulatorische Funktion, die sich in der Zytokinsekretion äußert (siehe Kapitel 3.3.4). Diese weitere NK-Zell-Funktion sollte durch die IFN-γ-Sekretionslevel in Hinblick auf die Stimulation mit ss-isRNA und den Einfluss von HNSCC untersucht werden.

Isolierte NK-Zellen wurden 24 Stunden mit ss-isRNA in An- und Abwesenheit von HNSCC-Überstand stimuliert. Als Kontrolle dienten in Medium inkubierte NK-Zellen. Die Zytokinlevel wurden mit Hilfe des Bioplex-Systems und eines Th1/Th2-*Assay Kits* bestimmt. Außer IFN-γ waren bei NK-Zellen mit Hilfe der Bioplex-Messung keine weiteren Zytokine nachweisbar. Deutlich erhöhte Level der IFN-γ-Sekretion konnten durch die Stimulation mit ss-isRNA im Vergleich mit der Mediumkontrolle nachgewiesen werden. Die NK-Zell-Stimulation in Anwesenheit des HNSCC-Milieus führte zu einer geringeren Steigerung der IFN-γ-Sekretion (Abbildung 36), im Vergleich zur Mediumkontrolle wurde allerdings vermehrt IFN-γ produziert.

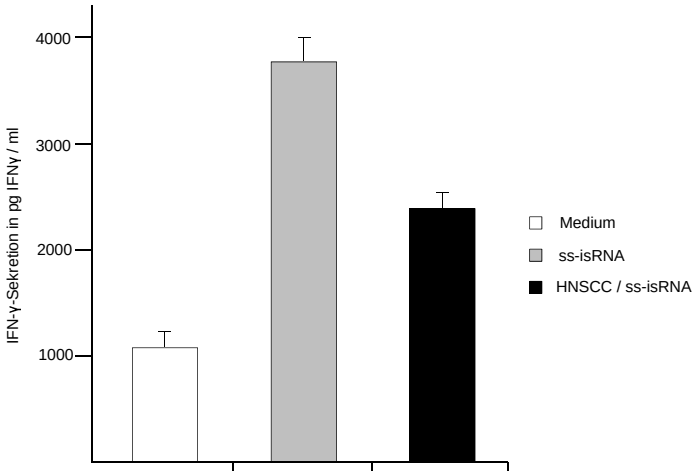

Abbildung 36: Ss-isRNA induziert die IFN-γ-Sekretion
Dargestellt wird ein Diagramm einer IFN-γ-Zytokinmessung. Auf der Y-Achse wird die IFN-γ-Sekretion in pg/ml angezeigt, die X-Achse stellt die Inkubationsbedingungen dar. Die unstimulierten NK-Zellen sind durch die weiße Säule gekennzeichnet, die mit 1 μM ss-isRNA stimulierten durch eine hellgraue. Die schwarze Säule steht für die NK-Zellen, die in Anwesenheit des HNSCC-Milieus mit ss-isRNA stimuliert wurden. Im Vergleich zu den mit Medium inkubierten NK-Zellen produzierten die stimulierten NK-Zellen verstärkt IFN-γ, das HNSCC-Milieu verminderte diesen Effekt.

Ss-isRNA stellt ein potentielles immunstimulatorisches Werkzeug gegen HNSCC dar, weil sie einerseits NK-Zell-Funktionen sogar in Anwesenheit des HNSCC-Milieus aktivieren konnte und andererseits nicht auf die Proliferation der HNSCC-Zellen wirkte.

4 Diskussion

Zellen von Kopf-Hals-Karzinomen (*head and neck squamous cell carcinoma*) sind dafür bekannt, molekulare Immun-Escape Strategien zu entwickeln, um einer effektiven Antitumor-Immunantwort zu entgehen. Es wurden drei Arten der Abwehr beschrieben: die Flucht vor der Erkennung durch das Immunsystem, direkte Inhibierung der Immunabwehr sowie indirekte Immuninhibierung durch die Induktion von Immunsuppressor Mechanismen (Young, 2006). Einige dieser Immun-Escape-Mechanismen konnten in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Da HNSCC diese vielfältigen Strategien entwickelt haben, gilt es, diesen durch die Anwendung immunstimulatorischer Reagenzien wie Poly I:C oder ss-isRNA entgegenzuwirken.

4.1 Toll-like Rezeptoren

4.1.1 Toll-like Rezeptoren in HNSCC

Toll-like Rezeptoren kommen nicht nur auf Immunzellen vor, Tumorzellen exprimieren ebenfalls TLRs. TLR4 wird auf HNSCC-Zellen von permanenten Zelllinien und von Primärgewebe exprimiert. Die TLR4-Expressionsdichte korelliert mit dem Tumorgrad. Die Bindung an TLR4, beispielsweise von LPS, unterstützt das Fortschreiten der HNSCC-Erkrankung durch Zellproliferation und erhöht die Zytokinsekretion von IL-6, IL-8, VEGF und GM-CSF (Szczepanski *et al.*, 2009). Chen *et al.* (2008) beschrieb die TLR4-Expression in Tumorzellen ebenfalls für andere Tumoren wie beispielsweise für humanen Lungenkrebs. Durch LPS wird darüber hinaus die Umgehung der Überwachung durch das Immunsystem induziert. Bei Kehlkopfkarzinomen konnten die *Toll-like* Rezeptoren TLR2, TLR3 und TLR4 im Gewebe intrazellulär sowie auf der Oberfläche von Tumorzellen und von infiltrierenden Immunzellen identifiziert werden (Chen *et al.*, 2008).

In unserer Arbeitsgruppe wurde TLR3 in HNSCC nachgewiesen (Abbildung 18; Pries *et al.* (2008a)). Poly I:C wirkte auf HNSCC-Zellen stimulierend. Dies äußerte sich in gesteigerter Zytokinsekretion von IL-6 und IL-8 (Riebe, 2009). Darüber hinaus wurde bei HNSCC-Zelllinien beobachtet, dass Poly I:C die Proliferation induziert (Pries *et al.*, 2008a).

Pries *et al.* (2008a) wiesen für einige HNSCC-Zelllinien und Primärtumoren ausschließlich TLR3 der zehn humanen TLRs in durchflusszytometrischen Analysen und Western-Hybridisierungen nach.

4.1.2 Toll-like Rezeptoren in Immunzellen

Toll-like-Rezeptoren nehmen im angeborenen Immunsystem eine wichtige Schlüsselposition ein. TLRs erkennen PAMPs und es wurden bereits viele spezifische Liganden entdeckt, die in Tabelle 4 (Kapitel 1.4) aufgelistet sind. Die Toll-like Rezeptoren TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 werden als intrazelluläre Rezeptoren beschrieben, hingegen gelten die *Toll-like* Rezeptoren TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 als Oberflächenrezeptoren (Kawai und Akira, 2008).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in Natürlichen Killer-Zellen alle *Toll-like* Rezeptoren außer TLR4 exprimiert wurden (Abbildungen 8, 9 und Xie *et al.* (2007)). Von TLR3 und TLR7 wurden sowohl intrazelluläre als auch membranständige Expressionslevel nachgewiesen, obwohl sie in erster Linie als intrazelluläre Rezeptoren beschrieben wurden. Die membranständige Expression von TLR3 und TLR7 lässt sich damit erklären, dass Rezeptoren an der Oberfläche der NK-Zellen Viren und Pathogene schneller erkennen und diese somit umgehend aktiviert werden können. Bei Immunzellen oder anderen Zellen, die über TLRs aktiviert werden, könnte dieser Effekt der vermehrten oberflächlichen Expression eines eigentlich intrazellulären Rezeptors einen Teil des Aktivierungsmechanismus darstellen. Hingegen konnten die als Oberflächenrezeptor bekannten TLR1 und TLR6 durch die in dieser Arbeit durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen nicht an der Oberfläche nachgewiesen werden - sie wurden in den NK-Zellen eindeutig intrazellulär exprimiert. Eine Aktivierung der NK-Zellen über TLR1 und TLR6 wurde bis zu diesem Zeitpunkt nicht beschrieben. TLR9 war in diesen Messungen eindeutig intrazellulär. TLR8 wurde auf der Zelloberfläche kaum exprimiert, konnte in den NK-Zellen jedoch stärker nachgewiesen werden. Die Expression der *Toll-like* Rezeptoren scheint sich hinsichtlich der intrazellulären und membranständigen Expression innerhalb der Immunzellen zu unterscheiden. Diese Unterschiede beschrieben Iwasaki und Medzhitov (2004). Humane mDCs exprimieren zum Beispiel TLR3 in ihren intrazellulären Kompartimenten, Fibroblasten hingegen auf der Zelloberfläche (Iwasaki und Medzhitov, 2004).

Hornung *et al.* (2002) analysierten TLR1-10 mRNA mittels *real-time* PCR in PBMCs. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Die TLR-Expression war auf mRNA-Ebene ebenfalls unterschiedlich stark ausgeprägt. TLR7 konnte auf mRNA-Ebene nicht nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde die TLR7-Expression jedoch eindeutig durchflusszytometrisch gezeigt (Abbildungen 8 und 9). Die Level der TLR7-Expression unterscheiden sich wahrscheinlich auf der Transkriptions- und der Translationsebene.

Tabelle 10: mRNA-Analysen der Toll-like Rezeptoren in Immunzellen erstellt nach Hornung *et al.* (2002)

TLR	Vorkommen
TLR1	PDCs, Monozyten, NK-Zellen, T-Zellen, B-Zellen
TLR2	Monozyten, B-Zellen, NK-Zellen
TLR3	NK-Zellen
TLR4	Monozyten, B-Zellen
TLR5	Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen
TLR6	PDCs, Monozyten, NK-Zellen, T-Zellen, B-Zellen
TLR7	PDCs, B-Zellen
TLR8	Monozyten
TLR9	PDCs, B-Zellen
TLR10	B-Zellen, PDCs

Es besteht darüber hinaus ein Unterschied zwischen der *Toll-like*-Rezeptor-Expression auf mRNA-Ebene und der Zuständigkeit für die TLR-Agonisten (Iwasaki und Medzhitov, 2004). Obwohl NK-Zellen zum Beispiel TLR9 intrazellulär exprimieren, sind sie nicht in die Erkennung von CPG, einem TLR9-Liganden, involviert (Hornung *et al.*, 2002). NK-Zellen, die zusammen mit PBMCs kultiviert werden, können durch CPG-ODN aktiviert werden. Ohne die Anwesenheit der PBMCs reagieren die NK-Zellen nicht auf die CPG-Stimulation. Nicht der Zell-Zell-Kontakt zu anderen Zellen, sondern die löslichen Faktoren der PBMCs sind für die NK-Zell-Aktivierung verantwortlich. PDC-spezifische Zytokine verursachen den gleichen Effekt (Hornung *et al.*, 2002). TLR9 und TLR7 in humanen PDCs hingegen sind für die Erkennung von CPG-Motiven und die anschließende Aktivierung der pDCs verantwortlich (Hornung *et al.*, 2002). Humane Blut-Monozyten exprimieren TLR1, TLR2, TLR4 und TLR5, verlieren jedoch diese Rezeptoren, wenn sie zu unreifen DCs und der Anwesenheit von GM-CSF und IL-4 differenzieren; unreife DCs exprimieren hingegen TLR3. Die TLR-Expression unterscheidet sich ebenfalls zwischen PDCs und MDCs. PDCs exprimieren TLR6, TLR7 und TLR9, MDCs jedoch TLR1, TLR2, TLR3, TLR6 und TLR8 (Iwasaki und Medzhitov, 2004).

4.2 Die NK-Zell-Subpopulationen

CD56-positive NK-Zellen machen circa 10 % der humanen Lymphozytenpopulation und bis zu 30 % von intrahepatischen mononukleären Zellen aus und sind entscheidend für die angeborene antivirale und antitumorale Abwehr. Die Subpopulationen $CD56^{dim}$ und $CD56^{bright}$ werden nicht nur anhand ihrer CD56-Expressionslevel unterschieden, sie besitzen darüber hinaus unterschiedliche Rezeptorprofile

und verschiedene Funktionen. Die CD56^{dim}-NK-Zellen sind zytolytisch, während die CD56^{bright}-NK-Zellen immunregulatorisch durch die Sekretion von Zytokinen wirken. Die CD56^{bright}-NK-Zellen besitzen Rezeptoren, die für die Migration in sekundäre Lymphknoten benötigt werden (Cooper *et al.* 2001a und Cooper *et al.* 2001b).

4.2.1 Abnahme der CD56^{bright}-Level bei HNSCC-Patienten

Bei Jacobs *et al.* (2001) wurden die CD56^{dim}- und die CD56^{bright}-NK-Zellen durch *magnetic cell sorting* getrennt voneinander auf ihre Rezeptorprofile und zytotoxische Eigenschaften untersucht. Beide Subpopulationen exprimieren KLRs (*c-type lectin-like receptors*) CD94/NKG2 und CD161. Nur die CD56^{dim}-NK-Zellen exprimieren die KIRs (*killer cell immunoglobulin-like receptors*) CD158a, CD158b und NKB1. Außerdem enthält das Granulat dieser Subpopulation verglichen mit den CD56^{bright}-NK-Zellen das zehnfache Level an Perforin und Granzym B und ermöglicht somit die effizientere Zelllyse. Die CD56^{bright}-NK-Zellen exprimieren deutlich erhöhte Level an IFN-γ und TNF-α und regulieren Immunantworten. Diese Untersuchungen bestätigten die unterschiedlichen Funktionen der NK-Zell-Subpopulationen.

CD16 wird auf der Oberfläche von NK-Zellen exprimiert und kann an mit Antikörpern bedeckte Zielzellen binden, um direkte antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) auszulösen. Den meisten CD56^{bright}-NK-Zellen fehlt die Expression von CD16 (50-70 %); die übrigen Zellen besitzen eine geringe Dichte dieses Rezeptors. Dahingegen sind etwa 95 % der CD56^{dim}-NK-Zellen CD16 positiv (Cooper *et al.*, 2001a), was in dieser Arbeit ebenfalls beobachtet werden konnte (Abbildungen 11 und 12).

Cooper *et al.* (2001b) beschrieb die immunregulatorische Funktion der CD56^{bright}-NK-Zellen. Gereinigte CD56^{bright}-NK-Zellen produzieren nach der Aktivierung mit Monokinen (*monozyte-derived cytokines*) signifikante Mengen von IFN-γ, TNF-α, GMCSF (*granulocyte macrophage-colony-stimulating factor*), IL-10 und IL-13. Die CD56^{dim}-NK-Zellen sekretieren als Antwort auf die Stimulation durch die Monokine nur geringfügige Mengen dieser Zytokine (Cooper *et al.*, 2001b). Vitale *et al.* (2004) demonstrierte Interaktionen der CD56^{bright}-NK-Zellen mit dendritischen Zellen. Isolierte NK-Zellen wurden mittels „Cell Sorter“ voneinander getrennt und zusammen mit DCs mit und ohne LPS kultiviert. Die CD56^{bright}-NK-Zellen konnten als Antwort auf den DC-Stimulus proliferieren und IFN-γ produzieren.

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit HNSCC die Häufigkeit zirkulierender NK-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut in Hinblick auf verschiedene Tumorstadien und Tumorlokalisationen moduliert. Patienten mit HNSCC wiesen eine geringere Häufigkeit an CD56^{bright}-NK-Zellen auf als gesunde Spender, allerdings existierten starke individuelle Abweichungen bei den Tumorpatienten und bei den gesunden Spendern. Bei Untersuchungen von Patientinnen mit Brustkrebs konnten von Bauernhofer *et al.* (2003) ebenfalls erhöhte Level an CD56^{dim}-NK-Zellen und verringerte Level an CD56^{bright}-NK-Zellen

nachgewiesen werden. In Patienten mit koronaren Herzkrankheiten ist tendenziell eine geringere Anzahl der $CD56^{bright}$-NK-Zellen vorhanden (Hak *et al.*, 2007). Bei anderen Krankheiten, wie beispielsweise allergische Rhinitis, jugendliche rheumatische Artritis und Makrophagen-Aktivierungssyndrom, konnte dieser Effekt ebenfalls beobachtet werden. Von Poli *et al.* (2009) wurde vermutet, dass die $CD56^{bright}$-NK-Zellen an die Orte der Entzündungen wandern. Das Verhältnis der NK-Zell-Subpopulationen $CD56^{dim}$ zu $CD56^{bright}$ hat sich in der vorliegenden Arbeit im peripheren Blut von Tumorpatienten zu Gunsten der $CD56^{dim}$-NK-Zellen verschoben. Dieser Effekt könnte mit der Funktion dieser Subpopulation erklärt werden, da die $CD56^{dim}$-NK-Zellen für die natürliche Zytotoxizität gegen Tumorzellen verantwortlich sind und für die Abwehr gegen diese benötigt werden (Penack *et al.*, 2005). Bauernhofer *et al.* (2003) zeigte darüber hinaus, dass ein höherer Prozentsatz der $CD56^{dim}$-Subpopulation bei Tumorpatienten im Vergleich zu den Kontrollen apoptotisch ist und zu geringerer NK-Zell-Aktivität führt. Trotzdem stellten Bauernhofer *et al.* (2003) ein verändertes Verhältnis der NK-Zellsubpopulationen zu Gunsten der $CD56^{dim}$-Subpopulation fest. Bose *et al.* (2008) bestätigte, dass die $CD56^{dim}$-Subpopulation in PBMCs von Patienten mit HNSCC im Vergleich zu gesunden Spendern signifikant verringert wird. Dadurch wird deutlich, dass $CD56^{dim}$-NK-Zellen vermutlich eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunität gegen Tumoren und Viren spielen. Obwohl der Anteil zytotoxischer NK-Zellen ($CD56^{dim}$) aufgrund der erhöhten Apoptose geringer wird, sinkt die Anzahl immunregulatorischer NK-Zellen ($CD56^{bright}$) im Verhältnis $CD56^{dim}$ zu $CD56^{bright}$ dennoch. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die $CD56^{bright}$-NK-Zellen aus dem peripheren Blut in die lymphatischen Organe (Fehniger *et al.*, 2003) oder in den Tumor wandern. Es wurde bereits beschrieben, dass Immunzellen in den Tumor einwandern und diesen infiltrieren. Sind es dendritische Zellen oder CD8+-T-Zellen, die Tumoren infiltrieren, hat dies positive Folgen für den Krankheitsverlauf. Bei CD4+-Zellen oder Makrophagen hat diese Infiltration negative Auswirkungen (Talmadge *et al.*, 2007). $CD56^{bright}$-NK-Zellen sind im Tumorgewebe von NSCLC (*nonsmall-cell infiltrating lung cancer*) angereichert und zeigen Aktivierungsmarker wie NKp44, CD69 und HLA-DR. NK-Zellen, die aus Tumorgewebe von NSCLC isoliert wurden, zeigen weniger zytolytische Aktivität als NK-Zellen, die aus peripherem Blut von Tumorpatienten isoliert wurden (Carrega *et al.*, 2008). Diese Studie könnte ebenfalls eine Erklärung dafür sein, dass die $CD56^{bright}$-NK-Zellen in den Tumor abwandern und deshalb im peripheren Blut von Tumorpatienten prozentual abnehmen. Eine weitere Erklärung wäre die Annahme, dass $CD56^{dim}$-NK-Zellen im Falle einer Erkrankung einen hohen Umsatz haben und die vorhandenen $CD56^{bright}$-NK-Zellen zu $CD56^{dim}$-NK-Zellen differenzieren. Die Vorläuferzellen müssen dann folglich vermehrt vom Knochenmark oder Lymphknoten abgegeben werden (Poli *et al.*, 2009). Dies würde die große Anzahl an $CD56^{bright}$-NK-Zellen zum Beispiel in den Lymphknoten erklären.

Die Abnahme der immunregulatorischen NK-Zellen im peripheren Blut von Tumorpatienten im Vergleich zu gesunden Spendern in der vorliegenden Arbeit schien vollkommen unabhängig von den Tumorstadi-

en und der Tumorlokalisation zu sein (Abbildungen 14 und 15). Abgesehen davon ist sie vielmehr durch individuelle Parameter der Erkrankung, Therapie oder der genetischen Prädisposition bestimmt.
Bereits bei Nagler *et al.* (1989) wurde vermutet, dass die $CD56^{bright}$- und $CD56^{dim}$-NK-Zellen verschiedene Stadien der NK-Zell-Reifung verkörpern. Die $CD56^{dim}$-Zellen würden den mehr differenzierten Zelltyp darstellen (Nagler *et al.*, 1989), da sie zytotoxischer sind, eine höhere Oberflächendichte der Rezeptoren KIR und CD16 aufweisen (Cooper *et al.*, 2001a) und nicht als Antwort auf IL-2 proliferieren (Caligiuri *et al.*, 1990). Ein weiteres Indiz für die Theorie, dass $CD56^{bright}$-NK-Zellen die Vorläuferzellen von $CD56^{dim}$-NK-Zellen darstellen, ist die Erkenntnis von Romagnani *et al.* (2007), dass $CD56^{bright}$-NK-Zellen längere Telomere aufweisen als $CD56^{dim}$-NK-Zellen. Diese Vermutung konnte bestätigt werden, indem Chan *et al.* (2007) zeigte, dass $CD56^{bright}$-NK-Zellen in Anwesenheit von Gelenkfibroblasten zu $CD56^{dim}$-NK-Zellen differenzieren. Die daraus resultierende neue $CD56^{dim}$-Population wird zwar zytotoxisch, offenbart aber eine geringere Zytotoxizität als die natürliche $CD56^{-dim}$-NK-Zell-Population. Nach 10 Tagen differenzierte die Mehrheit von $CD56^{bright}$ zu $CD56^{dim}$ (Chan *et al.*, 2007).
Wie bereits beschrieben machen die $CD56^{dim}$-NK-Zellen im peripheren Blut circa 90 % der NK-Zellen aus, in der Milz sind es mehr als 85 % der NK-Zellen. In Lymphknoten kommen jedoch hauptsächlich $CD56^{bright}$-NK-Zellen vor. Die $CD56^{bright}$-NK-Zellen können auf Dendritische Zellen mit Zytokinsekretion reagieren, die die Th-Differenzierung reguliert (Ferlazzo *et al.*, 2004a). Diese Lymphknoten-NK-Zellen können nach Inkubation mit IL-2 zu zytotoxischen NK-Zellen differenzieren, die dann CD16, KIRs und Perforin exprimieren und in der Lage sind, NK-Zell-sensitive Zielzellen zu lysieren (Ferlazzo *et al.*, 2004b). Ob die in dieser Arbeit beobachtete Verschiebung der zirkulierenden NK-Zell-Subpopulationen von $CD56^{bright}$ zu $CD56^{dim}$ in Patienten mit HNSCC auf die Stressfaktoren im HNSCC-Milieu erfolgten, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

4.3 Poly I:C als potentieller Stimulus von NK-Zellen

Synthetisch hergestellte doppelsträngige RNA „*polyinosinic-polycitydilic acids* (Poly I:C)“ ist viraler dsRNA nachempfunden, die ein bekanntes Produkt viraler Infektionen darstellt. Alexopoulou *et al.* (2001) zeigte, dass TLR3 ds-RNA erkennt und dass die Aktivierung über TLR3 zu einer NF-κB- und Typ-I-Interferon-Produktion führt. Poly I:C aktiviert humane NK-Zellen in Anwesenheit von IL-12, das zeigte Sivori *et al.* (2004) durch die Oberflächenexpression der typischen Aktivierungsmarker CD69 und CD25. Außerdem konnte durch die gleichzeitige Inkubation von Poly I:C mit suboptimalen Dosen von IL-12 eine deutlich erhöhte IFN-γ- und TNF-α-Produktion sowie eine gesteigerte NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität gegen Tumorzellen induziert werden. In der Abwesenheit von IL-12 konnte kein Effekt von Poly I:C auf die NK-Zellen festgestellt werden (Sivori *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit wurde ebenfalls die Aktivierung von NK-Zellen über den Aktivierungsmarker CD69 nach Poly I:C-Stimulation jedoch ohne die gleichzeitige Inkubation mit suboptimalen Dosen von IL-12 gezeigt. Das HNSCC-Milieu hatte hierbei keinen eindeutigen Einfluss auf die Aktivierbarkeit von NK-Zellen (Kapitel 3.3.1). Obwohl Sivori *et al.* (2004) zeigte, dass NK-Zellen nur in Anwesenheit von IL-12 durch die 20-stündige Inkubation mit Poly I:C aktiviert werden können, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Aktivierung nach 24-stündiger alleiniger Inkubation mit Poly I:C demonstriert. Girart *et al.* (2007) beschrieb ebenfalls die Stimulation gereinigter NK-Zellen mit Poly I:C und suboptimalen Dosen von IL-12, IL-15, IFN-α sowie die anschließende Analyse der IFN-γ-Sekretion, der Zytotoxizität und der Expression des NKG2D-Rezeptors. Die Inkubation mit Poly I:C und IL-12 oder IFN-α führten zu einer erhöhten IFN-γ- und TNF-α-Produktion. Bei NK-Zellen, die mit Poly I:C allein stimuliert wurden, konnte keine bemerkenswerte IFN-γ-Sekretion festgestellt werden. In dieser Arbeit konnte dementgegen genau diese erhöhte IFN-γ-Sekretion als Antwort auf die alleinige Poly I:C-Stimulation nachgewiesen werden (Abbildung 26 A). Die IFN-γ-Produktion war im Vergleich zur Mediumkontrolle eindeutig erhöht. Das immunsuppressive HNSCC-Milieu hatte bei gleichzeitiger Poly I:C-Stimulation keinen deutlichen Einfluss auf die Zytokin-Sekretion. Die Inkubation mit PCI-13-Überstand (Abbildung 26 A) und BHY- sowie PCI-1-Überstand allein (Abbildung 27 A) steigerte aber im Vergleich zur Mediumkontrolle die IFN-γ-Produktion. Dieser Effekt des HNSCC-Milieus auf die Sekretion von IFN-γ könnte auf der Erkennung und Bindung von Faktoren im HNSCC-Milieu durch das intakte Immunsystem gesunder Spender beruhen. Die Erkennung von körperfremden Bestandteilen durch die NK-Zellen führte somit zur Aktivierung der NK-Zell-Funktionen. Die Aktivierung der IFN-γ-Sekretion wurde durch Poly I:C + HNSCC-Überstand nicht gesteigert. Eventuell ist durch die Poly I:C-Stimulation die maximale Immunantwort über die entsprechenden Rezeptoren erreicht worden, weshalb kein zusätzlicher Effekt gesehen werden konnte. Diese beobachtete erhöhte Zytokinsekretion durch die Poly I:C-Simulation lag zu hoher Wahrscheinlichkeit an der Inkubationsdauer von 48 h, Girart *et al.* (2007) inkubierte die NK-Zellen nur für 24 h. Bei Mian *et al.* (2008) wurden frisch isolierte NK-Zellen für 24 - 72 h unter anderem mit Poly I:C stimuliert. Die IFN-γ-Sekretion wurde gemessen und erstaunlicherweise konnten nach 24 h kaum IFN-γ, nach 48 h und 72 h jedoch deutlich erhöhte Level nachgewiesen werden. Eine 24-stündige alleinige Inkubation mit Poly I:C reicht somit nicht aus, um eine Veränderung der Zytokinsekretion zu beobachten. Wirken jedoch zusätzlich andere Immunzellen stimulierend auf die NK-Zellen ein, reicht eine Inkubation von 24 h aus (Girart *et al.*, 2007).

Zusätzlich zur gesteigerten IFN-γ-Sekretion konnte durch die Poly I:C-Stimulation sowohl IL-6 als auch TNF-α vermehrt produziert werden. Die alleinige Inkubation mit HNSCC-Überständen wirkte nicht stimulierend auf die Zytokinsekretion von IL-6 als auch TNF-α. Des Weiteren wurde die Stimulation mit Poly I:C durch die gleichzeitige Inkubation mit HNSCC-Überständen nicht beeinflusst (Abbildungen

26 und 27). IFN-γ ist ein bekanntes Zytokin der ersten Abwehr von NK-Zellen und wurde auch hier am stärksten nachgewiesen. Die anderen Zytokine wurden vermutlich nicht vom HNSCC-Milieu allein stimuliert, weil sie nach Erkennung von Tumorzellen und pathogen-infizierten Zellen vielleicht nicht sofort sekretiert werden. Die Sekretion der Zytokine IFN-γ, IL-6 als auch TNF-α stellten eine eindeutige Immunantwort auf die alleinige Stimulation mit Poly I:C dar, sogar in Anwesenheit des immunsupprimierenden HNSCC-Milieus *in vitro*.

Somit wurde durch diese Arbeit gezeigt, dass Poly I:C auch ohne andere Immunzellen oder Zytokine als Immunstimulus *in vitro* eingesetzt werden kann. Der beobachtete Einfluss von Poly I:C auf NK-Zellen soll durch ein Modell verdeutlicht werden. Gesunde NK-Zellen exprimierten nach Poly I:C-Stimulation vermehrt CD69 auf der Zelloberfläche. Außerdem konnten TLR3 und MDA5 sowohl intrazellulär als auch membranständig Poly I:C binden und NK-Zell-Funktionen wie die Zytokinsekretion aktivieren (Abbildung 37).

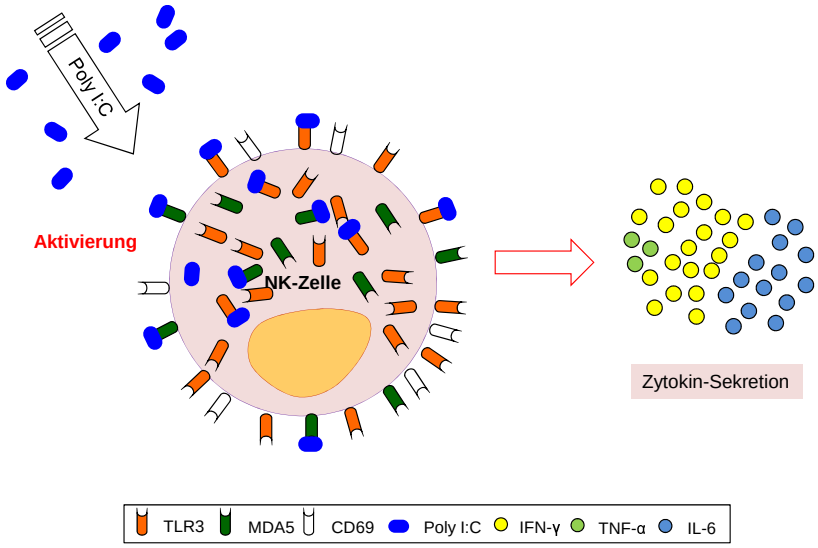

Abbildung 37: Modell - Einfluss von Poly I:C
In diesem Modell ist der in dieser Arbeit gezeigte Einfluss der Poly I:C-Stimulation auf NK-Zellen dargestellt. Auf der Oberfläche der Zelle wurde CD69 als Zeichen der Aktivierung exprimiert. MDA5 und TLR3 konnten Poly I:C-Moleküle intrazellulär und membranständig erkennen und binden. Dieser Erkennung folgte die Aktivierung von NK-Zellfunktionen. In dieser Arbeit wurde die gesteigerte Zytokinsekretion von IFN-γ, TNF-α und IL-6 gezeigt. Die Anzahl der Zytokinmoleküle (TNF-α: hellgrün, IL-6: hellblau, IFN-γ: gelb) soll das Verhältnis der Sekretionsmenge darstellen. Poly I:C-Moleküle sind blau , die TLR3-Rezeptoren sind orange, die MDA5-Rezeptoren grün und die CD69-Rezeptoren weiß gefärbt.

Bei einem Tumorpatienten wurde die IFN-γ-Sekretion durch die Inkubation mit Poly I:C im Vergleich zu gesunden Spendern nur sehr gering gesteigert und entsprach weniger als einem Hundertstel der IFN-γ-Produktion von gesunden Spendern (Abbildung 28). TNF-α war kaum nachweisbar und konnte durch Poly I:C geringfügig gesteigert werden. IL-6 hingegen wurde durch die Poly I:C-Stimulation noch eindeutig verstärkt produziert, jedoch ebenfalls in geringerem Maß als bei den gesunden Kontrollen. Diese durch Poly I:C eindeutig erhöhte IL-6-Sekretion der NK-Zellen des Tumorpatienten lässt sich da-

durch erklären, dass IL-6 sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften besitzt. Darüber hinaus wirkt eine Fehlregulation der IL-6 Zytokin-Signalgebung bei verschiedenen Krebsarten mit, indem IL-6 als Differenzierungs- und Wachstumsfaktor von Tumorzellen eine wichtige Rolle spielt (Pries und Wollenberg 2006; Heinrich *et al.* 2003).

Es ist bereits bekannt, dass Th1-Zytokine wie IFN-γ, IL-2 und IL-12 zelluläre Immunantworten stimulieren und in Patienten mit HNSCC geringe Level von Th1-Zytokinen vorhanden sind. Die Herunterregulierung der Th1-Zytokinsekretion wurde als ein *Tumor-Escape*-Mechanismus bei HNSCC beschrieben (Pries und Wollenberg, 2006). Dieser Effekt konnte hier mit der IFN-γ-Sekretion gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl die intrazelluläre Expression als auch die Oberflächen-Expression von TLR3 in humanen NK-Zellen bestätigt (Kapitel 3.3.2).

Die Inkubation isolierter NK-Zellen mit HNSCC-Überständen resultiert in einer stark reduzierten Oberflächenexpression von TLR3. Antagonistische Effekte treten bei der gleichzeitigen Stimulation mit Poly I:C und HNSCC-Überständen auf (Xie *et al.*, 2007). Diese Internalisierung von TLR3 in Anwesenheit des immunsuppressiven HNSCC-Milieus konnte in dieser Arbeit ebenfalls beobachtet werden (Abbildung 19). In humanen epithelialen Lungenzellen hingegen wird TLR3 in den intrazellulären Kompartimenten exprimiert. Exogene DNA muss erst in die Zelle eingebracht werden, um von TLR3 erkannt zu werden (Guillot *et al.*, 2005). Sowohl die Beobachtung, dass die TLR3-Expression von NK-Zellen in der Anwesenheit des HNSCC-Milieus ins Zellinnere verschoben wird, als auch die Studie von Guillot *et al.* (2005) verstärken die Annahme, dass NK-Zellen einen Vorteil haben, intrazelluläre Rezeptoren auch auf der Zelloberfläche zu exprimieren. Der Vorteil könnte in der schnelleren Erkennung von Viren und Pathogenen liegen.

Nicht nur TLRs, sondern auch RLRs , die zusammen zur Familie der PRRs gehören, erkennen virale RNA im Zytoplasma (Kawai und Akira, 2008). Zu den RLRs gehören RIG-I , MDA5 und LGP2. Die bisher beschriebenen Studien zielten auf die strukturelle Analyse der RLRs und ihrer Liganden sowie auf die Beschreibung der Signalwege ab (Fujita *et al.*, 2007; Kawai und Akira, 2009; Yoneyama und Fujita, 2007). Die Poly I:C-Erkennung über MDA5 und die Aktivierung von Immunzellen wurde zwar mehrfach beschrieben, jedoch kaum in NK-Zellen. Eine Studie (Miyake *et al.*, 2009) beschäftigte sich mit der Aktivierung von murinen NK-Zellen über MDA5 durch Poly I:C. Der IPS-1- und der TRIF-abhängige Signalweg sind für die Poly I:C vermittelte Aktivierung von NK-Zellen in Mäusen notwendig, die sich in der IFN-γ-Sekretion, der Granzym B- und der CD69-Expression zeigt. Die Aktivierung der IPS-1- und der TRIF-abhängigen Signalwege erfolgt in cD8α (+) - konventionellen dendritischen Zellen (cDCs) durch Poly I:C , die wiederum die NK-Zellen aktivieren (Miyake *et al.*, 2009). Eine direkte Aktivierung von NK-Zellen durch Poly I:C über MDA5 wurde jedoch bis heute noch nicht geschildert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MDA5 sowohl intrazellulär als auch auf der Oberfläche von NK-Zellen exprimiert wurde (Kapitel 3.3.3). Die MDA5-Expression konnte bei gesunden Spendern und bei HNSCC-Patienten nachgeweisen werden, wobei die Expression bei erkrankten Spendern allerdings wesentlich niedriger als bei gesunden Spendern war (Abbildung 23). Das HNSCC-Milieu *in vitro* hatte einen nicht so stark supprimierenden Einfluss auf die MDA5-Expression wie das Tumormilieu im HNSCC-Patienten. Da die MDA5-Expression durch das HNSCC-Milieu sowohl intrazellulär als auch auf der Zelloberfläche reduziert wurde, konnte keine Internalisierung, sondern eine generell verminderte Expression beobachtet werden. Obwohl die Expression von MDA5 bei den gesunden Spendern sehr heterogen war, exprimierten die $CD56^{bright}$-NK-Zellen deutlich mehr MDA5 als die $CD56^{dim}$-NK-Zellen intrazellulär und membranständig. Da die $CD56^{bright}$-NK-Zellen immunregulatorisch wirken, wäre dieser Effekt dadurch zu erklären, dass MDA5 in viele Signaltransduktionswege verwickelt ist und dass nach einer Aktivierung der NK-Zellen über MDA5 die Zytokinsekretion folgt (Kawai und Akira, 2009). Die NK-Zell-Rezeptoren von gesunden Spendern und Tumorpatienten unterscheiden sich oft stark, da jede Infektion oder Unregelmäßigkeit im Körper sich auf die Rezeptoren und die Funktionalität der NK-Zellen auswirkt. Die NK-Zellen verschiedener Spender unterscheiden sich anhand ihrer NCR-Oberflächendichte und ihrer Fähigkeit, verschiedenartige Tumoren zu zerstören (Biassoni *et al.*, 2001). Diese Unterschiede in der Expression könnten auch auf andere Rezeptoren wie beispielsweise MDA5 und die dazugehörigen NK-Zell-Funktionen zutreffen. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass NK-Zellen MDA5 exprimieren und dass Poly I:C auf NK-Zellen über MDA5 wirkt, wäre es aufschlussreich, die Erkennungsmechanismen sowie die über MDA5 vermittelten Funktionen weiter zu verfolgen. Der immunsuppressive Einfluss von HNSCC auf NK-Zellen wurde in einem Modell veranschaulicht. Sowohl die Internalisierung von TLR3 und die verminderte Expression von MDA5 als auch die verringerte Aktivierbarkeit von NK-Zellen über diese Rezeptoren in Anwesenheit des immunsuppressiven HNSCC-Milieus wurden dargestellt (Abbildung 38).

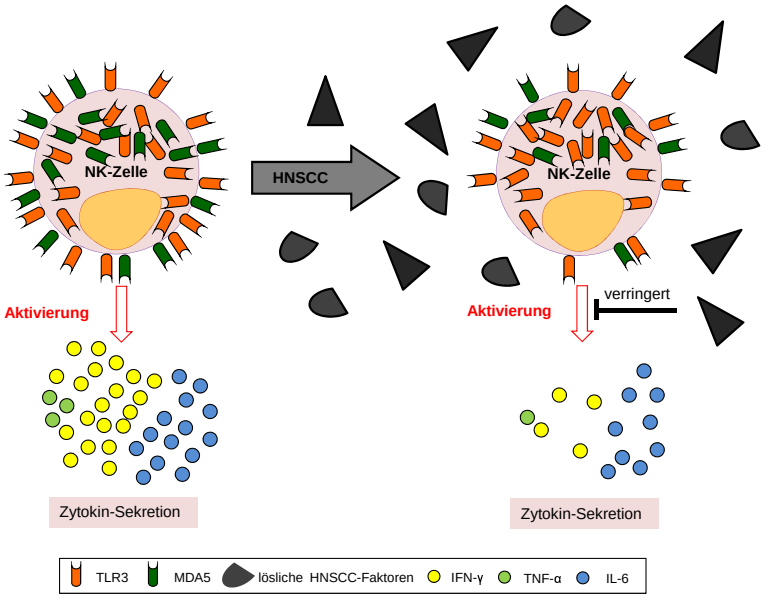

Abbildung 38: Modell - Einfluss von HNSCC auf NK-Zellen
In diesem Modell sind die in dieser Arbeit beobachteten negativen Einflüsse von HNSCC auf NK-Zellen zusammengefasst. Auf der linken Seite der Abbildung ist eine gesunde Zelle zu sehen, die TLR3 und MDA5 sowohl intrazellulär als auch auf der Zelloberfläche exprimierte und in der Lage war auf Stimulationen mit einer Zytokinantwort zu reagieren. Auf der rechten Seite ist eine NK-Zelle in Anwesenheit des HNSCC-Milieus dargestellt. Die TLR3-Expression wurde ins Zellinnere verschoben, MDA5 hingegen wurde intrazellulär und membranständig vermindert exprimiert. Die NK-Zellfunktion, insbesondere die hier untersuchte Zytokinsekretion, wurde verringert. Die bei Tumorpatienten gesteigerte TLR3-Expression wurde in diesem Modell nicht berücksichtigt. Die löslichen Faktoren des HNSCC-Milieus sind durch grau-schwarze Figuren dargestellt. In orange sind die TLR3-Rezeptoren und in grün die MDA5-Rezeptoren abgebildet.

4.4 ss-isRNA als immunstimulatorisches Werkzeug gegen HNSCC

Hornung *et al.* (2005) beschrieb mehrere siRNA- („small interfering RNAs“)- Sequenzen, die die Interferon-α-Sekretion bei PDCs auslösen und als einzelsträngige (ss) immunstimmulatorische (is-) RNAs bezeichnet werden. Eine dieser ss-isRNA-Sequenzen „RNA9.2s“ (5´-AGCUUAACCUGUCCUUCAA-3´) wurde für die Stimulation von NK-Zellen in dieser Arbeit eingesetzt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass humane NK-Zell-Funktionen durch einzelsträngige (ss) immunstimulatorische (is) RNA aktiviert werden konnten. Die Stimulation humaner NK-Zellen mit ss-isRNA führte zu einer stark aktivierten NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität gegen Tumorzellen von Kopf-Hals-Karzinomen (Kapitel 3.4).

Hornung *et al.* (2005) beschrieben, dass die Erkennung von isRNA in humanen PDCs TLR7-abhängig ist, was auch in dieser Arbeit für NK-Zellen bestätigt werden konnte (Abbildung 34, Kapitel 3.4). Hart *et al.* (2005) beschrieben, dass NK-Zellen TLR7 und TLR8 exprimieren und dass sie von viralen ssRNAs aktiviert werden können. NK-Zellen reagieren auf die Stimulation mit dem TLR7/8 Agonisten R848 mit erhöhter Zytotoxizität gegen Daudi-Zellen. Die Stimulation mit R848 resultiert in einer erhöhten Zytokinsekretion, allerdings nur in Anwesenheit zusätzlicher Zellen wie Monozyten. Bei dieser Studie

von Hart *et al.* (2005) wurde keine ss-isRNA verwendet, sondern R848, eine weitere synthetisch hergestellte Agenz. Die unterschiedlichen Wirkmechanismen der Agenzien könnten die unterschiedlichen Bedingungen (in An- und Abwesenheit zusätzlicher Immunzellen) bei der Stimulation mit Poly I:C erklären. Außerdem ist die nur 18-stündige Inkubation eventuell nicht ausreichend, um NK-Zell-Funktionen ohne die Hilfe von anderen Immunzellen zu aktivieren. Mian *et al.* (2008) beschrieben für die alleinige Stimulation der NK-Zellen mit Poly I:C, dass die Inkubationszeit einen Einfluss auf die Aktivierbarkeit der NK-Zellen hat und erst nach 48 Stunden eine deutliche Steigerung der IFN-γ-Sekretion gemessen werden konnte. In dieser Arbeit waren für die Stimulation mit ss-isRNA 24 Stunden ausreichend, um eine effektive Immunantwort der NK-Zellen auszulösen. Dennoch spielen Zellen wie zum Beispiel Monozyten (Berger *et al.*, 2009; Hart *et al.*, 2005) oder PDCs (Fernandez *et al.*, 1999) eine wichtige und manchmal auch eine essentielle Rolle bei NK-Zell-Funktionen. Einige immunstimulatorischen RNAs wurden beschrieben, die zwar NK-Zellen aktivieren können, aber nur in Anwesenheit von anderen Immunzellen. Eine dieser RNAs ist die ssRNA40, eine uridinreiche RNA, die ebenfalls NK-Zellen über TLR7/8 stimulieren kann. Die NK-Zellen wurden durch ssRNA40 in PBMCs aktiviert, gereinigte NK-Zellen hingegen nicht. Alter *et al.* (2007) demonstrierte, dass die Aktivierung von NK-Zellen von dem direkten Kontakt mit PDCs oder CD14-Monozyten abhängig ist. In diesen Versuchen wurde jedoch nur eine Inkubationszeit mit der ssRNA40 von 18 Stunden eingesetzt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit eingesetzte ss-isRNA sich auch ohne Zell-Zell-Kontakt zu anderen Zellen für die Aktivierung von NK-Zell-Funktionen wie die Zytokinsekretion und die natürliche Zytotoxizität eignet und dass diese ss-isRNA aufgrund dieser Eigenschaften als immunstimulatorische Agenz *in vitro* in Frage kommt. Die Ergebnisse der Aktivierung durch ss-isRNA wurden in einem Modell zusammengefasst. Die Inkubation von NK-Zellen mit ss-isRNA führte zu einer erhöhten TLR7-Expression und zur Aktivierung der natürlichen Zytotoxizität sowie der Zytokinsekretion. Die Anwesenheit des HNSCC-Milieus bei der Stimulation mit ss-isRNA verminderte die Hochregulierung der TLR7-Expression und führte zu einer geringeren Aktivierung der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität und der IFN-γ-Sekretion (Abbildung 39).

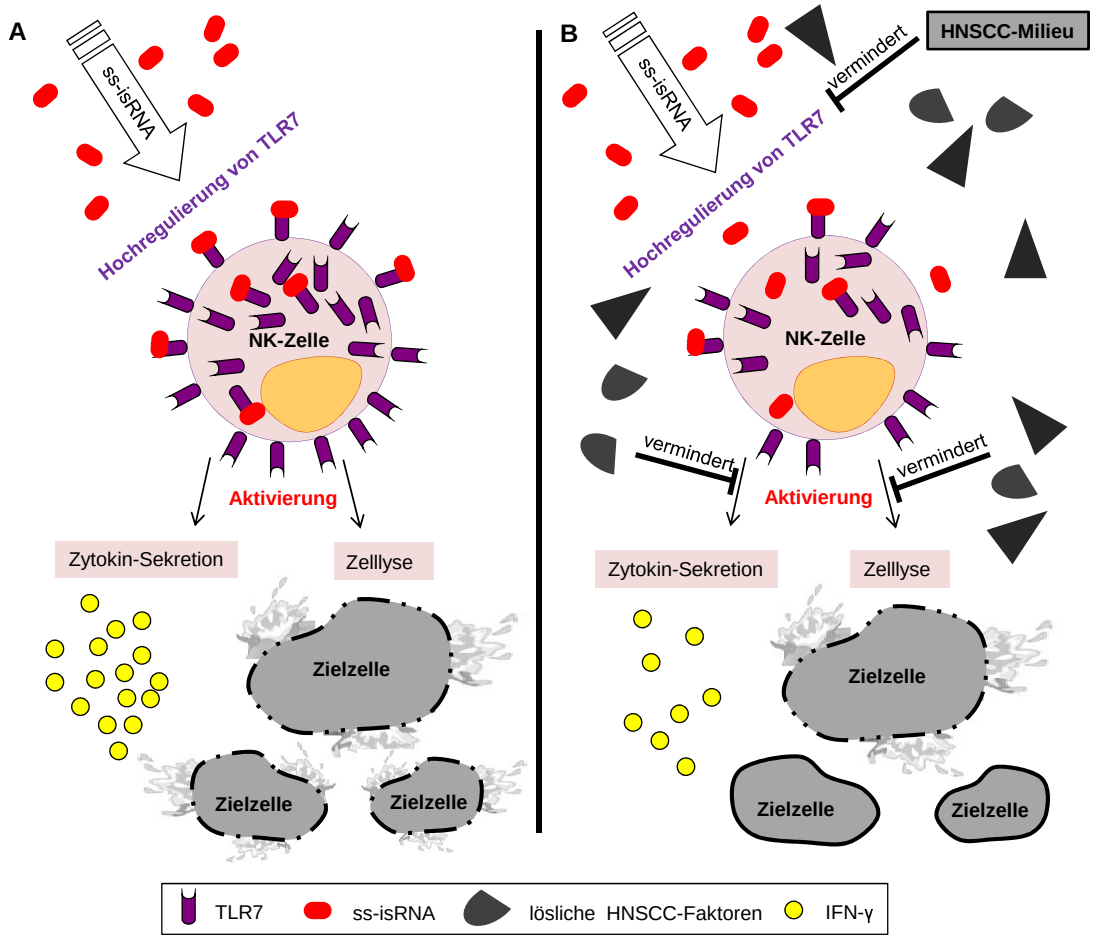

Abbildung 39: Modell - Aktivierung von NK-Zellen durch ss-isRNA
Die Aktivierung von NK-Zellen durch ss-isRNA und die negativen Einflüsse des HNSCC-Milieus sind in einem Modell dargestellt. In Abbildung **A** ist die ss-isRNA-Stimulation einer normalen Zelle abgebildet. Die TLR7-Expression wurde hochreguliert, außerdem wurde ss-isRNA über TLR7 erkannt. Die NK-Zellfunktionen, die Targetzelllyse und die IFN-γ-Sekretion, wurden durch ss-isRNA aktiviert. **B** zeigt die NK-Zell-Stimulation mit ss-isRNA in Anwesenheit des HNSCC-Milieus. Die NK-Zellfunktionen konnten zwar durch ss-isRNA aktiviert werden, allerdings wurde die IFN-γ-Sekretion sowie die Zytotoxizität gegen HNSCC-Zellen vermindert. Die TLR7-Expression wurde ebenfalls nicht so stark hochreguliert wie bei NK-Zellen, die nicht von HNSCC beeinflusst wurden. Die löslichen Faktoren des HNSCC-Milieus werden durch grau-schwarze Figuren verkörpert. Die TLR-Rezeptoren werden in lila dargestellt, ss-isRNA-Moleküle sind rot.

4.5 Der Einfluss von HNSCC auf NK-Zellen

4.5.1 Tumor-Escape

In Patienten mit HNSCC werden die Funktionen des Immunsystems stark unterdrückt, da viele immunsuppressive Zytokine im HNSCC-Milieu für die stark beeinträchtigten Immunfunktionen verantwortlich sind (Chin *et al.*, 2004; Douglas *et al.*, 2004). Bei Malmberg und Ljunggren (2006) wurden drei Gruppen von *Tumor-Escape*-Mechanismen beschrieben - die fehlende Erkennung durch Immunzellen, die mangelnde Anfälligkeit des Tumors und die Induktion von Immun-Dysfunktionen (Immunsuppression). Verschiedene humane Tumoren exprimieren den Serin Protease Inhibitor (PI-9), welcher dafür bekannt ist, Granzym B zu inhibieren. Cathepsin B ist eine Cystein Proteinase, die ebenfalls von Tumoren gebildet

wird und Perforin inaktiviert (Malmberg und Ljunggren, 2006). Durch die Inhibierung dieser Effektorproteine, wird die Zytotoxizität gegen Tumorzellen vermindert und diese entgehen der Zerstörung durch Immunzellen. Ein Beispiel für die Veränderungen von Immunzellen durch die Tumoreinwirkung lieferte Hartmann *et al.* (2003). Das HNSCC-Milieu führt zu einer Herunterregulierung der TLR9-Expression von PDCs, dies wiederum führt zu einer verminderten Fähigkeit der PDCs CPG-DNA zu erkennen und IFN-α zu produzieren.

In dieser Arbeit konnten ebenfalls einige *Tumor-Escape*-Mechanismen gezeigt werden. Zum einen stellt die Internalisierung von TLR3 durch das HNSCC-Milieu einen neuen *Tumor-Escape*-Mechanismus dar (Kapitel 3.3.2). Durch die Verschiebung der Rezeptoren ins Zellinnere wurde wahrscheinlich die Effektivität der Immunantwort verringert. Zum anderen wurde bei einem Patienten mit HNSCC die IFN-γ-Sekretion im Vergleich zu gesunden Spendern deutlich reduziert. Diese Strategie der Herunterregulierung der Zytokinsekretion durch Tumoren ist bereits bekannt und konnte hier beobachtet werden (Kapitel 3.3.4). Außerdem konnte bei der MDA5-Expression von NK-Zellen von Tumorpatienten im Vergleich mit gesunden Spendern beobachtet werden, dass die MDA5-Expression sowohl intrazellulär als auch membranständig zu wesentlich geringeren Leveln exprimiert wurde (Abbildung 23). Das HNSCC-Milieu wirkte sich ebenfalls negativ auf die durch ss-isRNA aktivierten NK-Zellfunktionen wie die IFN-γ-Sekretion und die Zytotoxizität gegen Tumorzellen aus. Das *in vitro*-HNSCC-Milieu und somit die löslichen Faktoren der Tumorzellen reichten aus, um immunsupprimierend auf Immunzell-Funktionen zu wirken.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die HNSCC-Zellen viele Strategien entwickelt haben, um einer effizienten Immunantwort zu entkommen. Bei den hier beschriebenen beobachteten *Tumor-Escape*-Mechanismen handelt es sich um Induktionen der Immunsuppression.

4.5.2 NK-Zellen und RNA in Immuntherapien gegen HNSCC

Natürliche Killer-Zellen spielen als Effektorzellen des angeborenen Immunsystems eine sehr wichtige Rolle. Sie sind in der Lage, schnell und effizient pathogen-infizierte Zellen oder Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren. NK-Zellen lösen Apoptose über den Perforin/Granzym-Signalweg aus (Ghiringhelli *et al.*, 2006). Darüber hinaus produzieren sie verschiedene Zytokine und Chemokine und interagieren mit anderen Zellen des Immunsystems, um eine antigenspezifische oder adaptive Immunantwort einzuleiten (Moretta *et al.* 2005, Farag und Caligiuri 2006). Diese Effektormechanismen von NK-Zellen konnten in dieser Arbeit verdeutlicht werden (Kapitel 3.3, 3.4). NK-Zellen identifizieren ihre Ziele über ein Set von aktivierenden oder inhibierenden Rezeptoren, die pathogen-kodierte Moleküle oder eigene Proteine, die verändert in transformierten oder infizierten Zellen vorliegen, erkennen (Ghiringhelli *et al.*, 2006). NK-Zellen sind für die Behandlung von Tumoren interessant, weil ihre Anti-Tumor-

Aktivität im Gegensatz zu T-Zellen nicht von der Erkennung tumorspezifischer Antigene abhängt (Farag und Caligiuri, 2006). Es ist darüber hinaus bekannt, dass IFN-γ eine wichtige Rolle bei der Tumorüberwachung spielt. Unter anderem sind es die NK-Zellen, die früh große Mengen IFN-γ produzieren und somit andere Zellen aktivieren können (Malmberg und Ljunggren, 2006). Einige therapeutische Zytokine wie IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 und Interferone wirken vor allem auf NK-Zellen. Viele Studien haben bereits gezeigt, dass die Aktivierung von NK-Zell-Differenzierungen und -Funktionen zu einer effizienten Abschaltung des Tumorwachstums führt (Wallace und Smyth, 2005). Terme *et al.* (2008) beschrieben neben dem Einsatz therapeutischer Zytokine, Impfstoffe und Antikörper-Therapien, die die Aktivierung von NK-Zell-Funktionen, wie die gesteigerte Zytotoxizität und die erhöhte IFN-γ-Sekretion, zur Folge haben. Außerdem beschrieben sie die klinische Relevanz von NK-Zellen. Chan *et al.* (2008) fasste die Möglichkeiten, NK-Zellen in Therapien gegen humane Tumoren einzusetzen, zusammen und kam ebenfalls zu dem Schluss, dass NK-Zellen für die Behandlung von Tumoren geeignet sind.

Für eine effektive Therapie von HNSCC wäre es sinnvoll, die natürlichen Funktionen von NK-Zellen zu erhalten und den Tumor auf möglichst natürliche Weise zu zerstören. Ein Hindernis bei Immuntherapien ist jedoch die lokale oder generelle Immunsupression vieler Tumoren (Malmberg und Ljunggren, 2006). Es wurden bereits Therapieansätze vorgestellt, die die natürlichen Funktionen der Immunzellen wiederherstellen sollen. Es gibt einige Studien, die über die Stimulation der körpereigenen NK-Zellen von Tumorpatienten durch Interkeukin-2 die Anti-Tumoraktivität von NK-Zellen steigern wollen. Es kommt bei der Gabe von IL-2 allerdings zur Toxizität, indem Zytokine und andere kleine Moleküle von IL-2-aktivierten Effektorzellen produziert werden (Smyth *et al.*, 2002). In einer anderen Studie wurde unbehandelten Patienten mit HNSCC mehrfach 100 ng beziehungsweise 300 ng IL-12 pro kg in den Primärtumor injiziert. Im Vergleich zu Kontrollpatienten erhöhte sich die Anzahl der CD56+-NK-Zellen im Primärtumor. Patienten, die im Primärtumor ein hohes Level CD56+-Zellen aufwiesen, hatten unabhängig von der IL-12-Behandlung eine höhere Überlebenschance. Außerdem führte die IL-12-Behandlung zu einer erhöhten IFN-γ-Sekretion in Lymphknoten, besonders von NK-Zellen. IL-12 besaß zusätzlich Effekte auf B-Zellen und T-Zellen. Bei höheren Dosen von 300 ng/kg wurde Toxizität beobachtet (van Herpen *et al.*, 2005). Scheel *et al.* (2006) konnte in Mäusen zeigen, dass intra-tumorale Injektionen von stabilisierter einzelsträngiger RNA den Tumor-Rückgang sowie Anti-Tumor-Immunität induzieren. Es konnten keine unkontrollierten Immunstimulationen beobachtet werden. Whiteside (2005) beschrieb zwei Hauptprobleme bei der immunbasierten Krebstherapie, zum einen die aktiven *Tumor-Escape* Mechanismen und zum anderen die fehlende Tumorüberwachung.

Agada *et al.* (2009) erläuterte verschiedene Immuntherapien in Patienten von HNSCC, unter anderem die T-Zell spezifische Immuntherapie, die DC-basierende Immuntherapie, DNA-Impfstoffe, P53-Impfstoffe, monoklonale Antikörper und Zytokine. Erste Versuche, Zytokine in Immuntherapien einzu-

setzen, wurden bereits oben beschrieben. Der Einsatz von DNA-Impfstoffen befindet sich bei einigen Krebsarten in klinischen Studien. Monoklonale Antikörper, beispielsweise Cetuximab (Erbitux, Merck), werden unterstützend bei Strahlentherapien von HNSCC-Patienten eingesetzt. DC-basierte Impfstoffe werden bei einigen Krebsarten getestet, jedoch zur Zeit noch nicht in HNSCC (Agada *et al.*, 2009). RNA-Impfstoffe wurden bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht in klinischen Studien verwendet.

Weitere mögliche immunstimulatorisches Agenzien gegen HNSCC stellen die in dieser Arbeit verwendeten ss-isRNA und Poly I:C dar. Ss-isRNA eignet sich besonders als immunstimulatorisches Mittel, weil keine Effekte von ss-isRNA auf HNSCC-Zellen beobachtet wurden und ss-isRNA auch in Anwesenheit von HNSCC NK-Zell-Funktionen erfolgreich aktivieren konnte.

Obwohl sich sowohl Poly I:C als auch ss-isRNA für die *in vitro*-Aktivierung von NK-Zellen eignen, ist der Weg zu einer Therapie mit ss-isRNA oder Poly I:C noch weit. Es müssen noch zahlreiche Versuche folgen, um mögliche Nebenwirkungen von ss-isRNA oder Poly I:C wie eine Toxizität ausschließen zu können. Die bereits beschriebene Immunsuppression sowie ein schneller Abbau oder Modifikationen der RNA im Patienten müssen ebenfalls ausgeschlossen werden können. Auch NK-Zellen eignen sich darüber hinaus für Immuntherapien, da sie schnell aktivierbar sind und Tumorzellen, wie zuvor beschrieben, ohne vorherigen Kontakt erkennen und eliminieren können.

4.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden NK-Zell-Funktionen mittels ss-isRNA oder Poly I:C aktiviert. Außerdem wurde der immunsuppressive Einfluss von HNSCC auf NK-Zellen, insbesondere auf das Verhältnis $CD56^{dim}$ zu $CD56^{bright}$, untersucht. In weiterführenden Studien sollten die Stimulationen von NK-Zellen sowohl mit ss-isRNA als auch mit Poly I:C verfolgt werden. Interessant wäre hierbei die getrennte Analyse der NK-Zell-Subpopulationen, eventuell wären Unterschiede in der Aktivierbarkeit von $CD56^{dim}$ und $CD56^{bright}$ nachweisbar. Diese unterschiedliche Aktivierbarkeit durch $CD56^{dim}$ und $CD56^{bright}$ wäre von Nutzen, wenn beispielsweise nur die zytotoxische Funktion der NK-Zellen zur Eliminierung von HNSCC-Zellen angeschaltet werden sollte. Unterschiedliche NCR-Rezeptoren, die bei der NK-Zell vermittelten Zytotoxizität mitwirken, könnten auf den NK-Zell-Subpopulationen, auch in Anwesenheit von HNSCC und den RNA-Stimulanzien, analysiert werden. So könnte man einen ersten Eindruck bekommen, ob die Rezeptoren, die bei der Zytotoxizität mitwirken, hauptsächlich auf den zytotoxischen NK-Zellen exprimiert und von den RNAs oder dem HNSCC-Milieu beeinflusst werden. Des Weiteren wären Versuche notwendig, die eine Aktivierung des Tumors durch ss-isRNA und Poly I:C ausschließen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen den Tumor infiltrieren und dass HNSCC-Patienten ein geringeres Level zirkulierender $CD56^{bright}$-NK-Zellen aufweisen als gesunde Spender.

Der Grund dieser Verschiebung des Verhältnisses $CD56^{dim}$ zu $CD56^{bright}$ blieb unklar. Deshalb müsste ergründet werden, ob die $CD56^{bright}$-NK-Zellen in das Tumorgewebe abwandern oder in Anwesenheit einer Tumorerkrankung zu $CD56^{dim}$-NK-Zellen differenzieren. Mit Hilfe von Migrationsassays mit HNSCC-Zellen oder Tumorgewebe könnte untersucht werden, welche Subpopulation der isolierten NK-Zellen vermehrt in Tumorzellen- oder gewebe infiltriert. Mittels „Cell-Sorter" Experimente oder „*magnetic cell sorting*" könnten die NK-Zell-Subpopulationen getrennt betrachtet werden. Die Inkubation mit dem HNSCC-Milieu oder mit HNSCC-Zellen könnte die Vermutung entweder bestätigen oder widerlegen, dass die $CD56^{bright}$-NK-Zellen zur zytotoxischen Subpopulation differenzieren können. Um zu zeigen, ob die $CD56^{bright}$-NK-Zellen in den Tumor abwandern, müssten entweder immunhistochemische Färbungen von Tumorgewebe durchgeführt werden, die im Anschluss mittels einer Quantifizierungssoftware ausgewertet werden oder es müssten Einzelzellsuspensionen von Tumoren mit anschließender Isolierung der NK-Zellen erstellt werden. Die den Tumor infiltrierenden NK-Zellen könnten dann mittels FACS-Analysen auf ihre Rezeptorprofile untersucht werden. Ein möglicher Vorteil für die Tumorprogression durch die geringere Anzahl an $CD56^{bright}$-NK-Zellen im peripheren Blut von Tumorpatienten müsste ebenfalls geklärt werden.

HNSCC hat einen Einfluss auf die Zytokinsekretion bei Immunzellen (Pries *et al.*, 2008b), dies konnte anhand der Poly I:C-Stimulation von NK-Zellen mit anschließender Zytokinbestimmung der Überstände für einen Tumorpatienten gezeigt werden. Die Zytokinbestimmung mittels Flex Set müsste mehrfach wiederholt werden, um dieses Ergebnis zu verifizieren.

Durch den Einfluss der ss-isRNA wurde die IFN-γ-Sekretion in NK-Zellen stark gesteigert. In Anwesenheit des Tumor-Milieus wurde dieser Effekt vermindert, er war jedoch deutlich nachweisbar. Interessant wäre es hier, die Zytokinanalysen nach ss-isRNA-Stimulation ebenfalls mit Überständen von NK-Zellen aus Tumorpatienten durchzuführen. Ein weiterer interessanter Aspekt wären vergleichende Zytotoxizitätstests mit NK-Zellen von Tumorpatienten und gesunden Spendern nach Stimulation mit Poly I:C oder ss-isRNA. Der immunsuppressive Einfluss des *in vivo* HNSCC-Milieus ist vielleicht größer als das HNSCC-Milieu der HNSCC-Zelllinien. In dieser Arbeit konnte dieser Effekt bei der MDA5-Expression gezeigt werden, die MDA5-Expression wurde durch das *in vitro* -HNSCC-Milieu herunterreguliert, diese Herunterregulierung war jedoch bei dem *in vivo*-Milieu von Tumorpatienten wesentlich ausgeprägter.

Wie bereits beschrieben ist bis zu diesem Zeitpunkt wenig über die Bindung von Poly I:C über MDA5 bekannt. Deshalb wären Experimente zur Entschlüsselung dieses Prozesses sehr bereichernd. Die Erkennung von Poly I:C über TLR3 wurde bereits des Öfteren erforscht und diskutiert. Da bezüglich NK-Zellen nicht bekannt ist, welcher Signalweg bei der Stimulation mit Poly I:C bevorzugt eingeschlagen wird, könnten hierzu verschiedene Experimente durchgeführt werden. Die Behandlung mit einer Transfektionsreagenz wie beispielsweise Dotap könnte bei der Stimulation mit Poly I:C hilfreich sein,

da sowohl TLR3 als auch MDA5 vermehrt intrazellulär exprimiert wurden. Einerseits könnten siRNA-Experimente mit MDA5-siRNA oder TLR3-siRNA der NKL-Zelllinie (Robertson *et al.*, 1996) durchgeführt werden, um festzustellen welcher Rezeptor bei der Poly I:C-Bindung essentiell ist. Andererseits könnten Western-Hybridisierungen der NKL-Zelllinie nach Poly I:C-Stimulation mit IPS-1 und TRIF angefertigt werden. Erste Vorversuche wurden bereits vorgenommen (Daten nicht gezeigt), diese Experimente müssen aber weiterhin verfolgt werden.

Die Interaktion von NK-Zellen mit anderen Immunzellen wurde mehrfach beschrieben (Fernandez *et al.*, 1999), interessant wäre es deshalb, diese Interaktionen *in vitro* von NK-Zellen mit pDCs bei der ss-isRNA-Stimulation zu untersuchen. Dabei wäre besonders aufschlussreich, ob sich die Zellen gegenseitig beeinflussen und die beobachteten erhöhten NK-Zell-Funktionen noch zu steigern sind.

Ein zukünftiges Ziel sollte sein, den immunsuppressiven Effekt von HNSCC auf NK-Zellen mit immunstimulatorischen Agenzien wie ss-isRNA oder Poly I:C aufzuheben. Immunstimulatorische Agenzien könnten daher bei der Bekämpfung von Tumorerkrankungen einen erfolgversprechenden Ansatz darstellen.

5 Zusammenfassung

Natürliche Killer- (NK-) Zellen spielen als Effektorzellen des angeborenen Immunsystems in der Erkennung und direkten Zelllyse von Tumorzellen sowie pathogen-infizierten Zellen eine große Rolle. Humane NK-Zellen können in zwei funktionelle Subpopulationen eingeteilt werden, die zytotoxischen $CD56^{dim}$-NK-Zellen und die immunregulatorischen $CD56^{bright}$-NK-Zellen. Die NK-Zell vermittelte Abwehr gegen Tumorzellen ist in Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen (*head and neck squamous cell carcinoma* - HNSCC) stark vermindert.

In dieser Arbeit wurden einerseits NK-Zellen über TLR3, TLR7 und MDA5 mit einzelstängigen und doppelsträngigen immmunstimulatorischen RNAs (ss-isRNA und Poly I:C) stimuliert, andererseits wurde der Einfluss von HNSCC auf NK-Zellen analysiert.

Der Einsatz von ss-isRNA zur Stimulation von NK-Zellen führte zu einer deutlich gesteigerten Zytotoxizität gegenüber HNSCC-Zellen und erhöhte die Produktion von IFN-γ. Das immunsuppressive HNSCC-Milieu verringerte diese Effekte, inhibierte sie aber nicht. Die TLR7-Abhängigkeit der gesteigerten Zytotoxizität konnte mit Hilfe eines neutralisierenden TLR7-Antikörpers nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde eine erhöhte Expression von TLR7 durch die ss-isRNA-Stimulation beobachtet. Die Stimulation mit Poly I:C führte zu einer Aktivierung von NK-Zellen, die Anwesenheit des HNSCC-Milieus beeinflusste diesen Effekt jedoch nicht. Durch die Stimulation mit Poly I:C konnte in isolierten NK-Zellen die Zytokinsekretion von IFN-γ, IL-6 und TNF-α gesteigert werden. Sowohl Poly I:C als auch ss-isRNA eignen sich für die Aktivierung von NK-Zell-Funktionen, sogar in Anwesenheit von HNSCC.

Tumoren haben vielfältige Mechanismen entwickelt, um der Tumorüberwachung zu entgehen, die unter anderem zu bedeutsamen Dysfunktionen in Immunzellen führen. In dieser Arbeit konnten einige Tumor-*Escape*-Mechanismen beobachtet werden. Der immunsuppressive Einfluss von HNSCC führte zu einer Internalisierung von TLR3, dieser Effekt führte zu einer weniger effizienten Immunantwort. Außerdem konnten geringere Level an MDA5 bei NK-Zellen von Tumorpatienten als bei gesunden Spendern nachgewiesen werden. Auch die IFN-γ-Sekretion von NK-Zellen war in Patienten mit HNSCC im Vergleich zu gesunden Spendern eindeutig geringer. Das HNSCC-Milieu wirkte sich darüber hinaus negativ auf die durch ss-isRNA gesteigerten NK-Zellfunktionen aus. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die

Population der zirkulierenden $CD56^{bright}$-NK-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit HNSCC geringer war, unabhängig von den individuellen Tumorstadien und Tumorlokalisationen.

Diese Ergebnisse unterstreichen, dass Tumoren vielfältige Strategien entwickelt haben, um einer effektiven Immunantwort zu entgehen. Darüber hinaus können immunstimulatorische RNAs NK-Zell-Funktionen, sogar in der Anwesenheit von HNSCC, aktivieren.

6 Abstract

Natural Killer (NK) cells play an important role in innate immunity as effectors in recognition and direct cytolysis of tumor cells and pathogen-infected cells. Human NK cells can be devided into two functional subsets, the cytotoxic $CD56^{dim}$-NK cells and the immunoregulatory $CD56^{bright}$-NK cells. NK cell mediated defence against tumor cells is strongly impaired in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). In this study the ability of single stranded and double stranded immunostimulatory RNAs (ss-isRNA and poly I:C) to stimulate NK cells via TLR3, TLR7 and MDA5 as well as the influence of HNSCC on NK cells was investigated.

Application of ss-isRNA led to a distinct increased cytotoxicity against HNSCC cells and increased the production of IFN-γ. The immunosuppressive HNSCC microenvironment decreased these effects, but did not inhibit them. The TLR7-dependency of increased cytotoxicity was demonstrated, by means of a neutalizing TLR7-antibody. Furthermore, an increased expression of TLR7 after stimulation with ss-isRNA was observed. Stimulation with poly I:C resulted in an activation of NK cells, the presence of HNSCC microenvironment did not influence this effect. Via stimulation with poly I:C the cytokine release of IFN-γ, IL-6 und TNF-α in isolated NK cells was enhanced. Both poly I:C and ss-isRNA are competent activators of NK cell functions even in the presence of HNSCC.

Tumors have developed several mechanisms to escape immune surveillance that lead to significant dysfunctions of immune cells. In this work several immune escape mechanisms were detected. The immunosuppressive influence of HNSCC resulted in internalization of TLR3, which leads to a less effective immune response. Lower expression levels of MDA5 in NK cells of tumor patients were also observed compared to healthy donors. IFN-γ secretion of NK cells in HNSCC patients was clearly decreased in comparison to healthy donors. The HNSCC microenvironment negatively affected the increased NK cell functions via ss-isRNA. In addition, albeit the individual tumor stage or tumor type in the peripheral blood of patients with HNSCC the population of circulating $CD56^{bright}$-NK cells was lower in contrast to healthy donors.

These findings underline the fact that tumors have developed a variety of strategies to escape effective immune response. Furthermore immunostimulatory RNAs are able to activate NK cell functions even in the presence of HNSCC.

7 Literaturverzeichnis

Agada, F. O., Alhamarneh, O., Stafford, N. D., und Greenman, J. (2009). Immunotherapy in head and neck cancer: current practice and future possibilities. *J Laryngol Otol*, 123(1):19–28.

Akira, S. und Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 4(7):499–511.

Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., und Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded rna and activation of nf-kappab by toll-like receptor 3. *Nature*, 413(6857):732–738.

Aliprantis, A. O., Yang, R. B., Mark, M. R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J. D., Klimpel, G. R., Godowski, P., und Zychlinsky, A. (1999). Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science*, 285(5428):736–739.

Alter, G., Suscovich, T. J., Teigen, N., Meier, A., Streeck, H., Brander, C., und Altfeld, M. (2007). Single-stranded rna derived from hiv-1 serves as a potent activator of nk cells. *J Immunol*, 178(12): 7658–66.

Andoniou, C. E., Andrews, D. M., und Degli-Esposti, M. A. (2006). Natural killer cells in viral infection: more than just killers. *Immunol Rev*, 214:239–250.

Arancibia, S. A., Beltrain, C. J., Aguirre, I. M., Silva, P., Peralta, A. L., Malinarich, F., und Hermoso, M. A. (2007). Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res*, 40(2): 97–112.

Ballas, Z. K. (2007). Modulation of nk cell activity by cpg oligodeoxynucleotides. *Immunol Res*, 39(1-3): 15–21.

Bauer, S., Kirschning, C. J., Haecker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H., und Lipford, G. B. (2001). Human tlr9 confers responsiveness to bacterial dna via species-specific cpg motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(16):9237–9242.

Bauernhofer, T., Kuss, I., Henderson, B., Baum, A. S., und Whiteside, T. L. (2003). Preferential apoptosis of cd56dim natural killer cell subset in patients with cancer. *Eur J Immunol*, 33(1):119–24.

Bell, J. K., Mullen, G. E. D., Leifer, C. A., Mazzoni, A., Davies, D. R., und Segal, D. M. (2003). Leucine-rich repeats and pathogen recognition in toll-like receptors. *Trends Immunol*, 24(10):528–533.

Berger, M., Ablasser, A., Kim, S., Bekeredjian-Ding, I., Giese, T., Endres, S., Hornung, V., und Hartmann, G. (2009). Tlr8-driven il-12-dependent reciprocal and synergistic activation of nk cells and monocytes by immunostimulatory rna. *J Immunother*, 32(3):262–271.

Bernier, J. (2006). Head and neck oncology: what the past decade has taught us. *Expert Rev Anticancer Ther*, 6(9):1133–1136.

Biassoni, R., Cantoni, C., Pende, D., Sivori, S., Parolini, S., Vitale, M., Bottino, C., und Moretta, A. (2001). Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol Rev*, 181:203–14.

Biassoni, R. (2009). Human natural killer receptors, co-receptors, and their ligands. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 14:Unit 14.10.

Bose, A., Chakraborty, T., Chakraborty, K., Pal, S., und Baral, R. (2008). Dysregulation in immune functions is reflected in tumor cell cytotoxicity by peripheral blood mononuclear cells from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer Immun*, 8:10.

Bottino, C., Castriconi, R., Moretta, L., und Moretta, A. (2005). Cellular ligands of activating nk receptors. *Trends Immunol*, 26(4):221–6.

Bottino, C., Moretta, L., Pende, D., Vitale, M., und Moretta, A. (2004). Learning how to discriminate between friends and enemies, a lesson from natural killer cells. *Mol Immunol*, 41(6-7):569–575.

Bourquin, C., Schmidt, L., Hornung, V., Wurzenberger, C., Anz, D., Sandholzer, N., Schreiber, S., Voelkl, A., Hartmann, G., und Endres, S. (2007). Immunostimulatory rna oligonucleotides trigger an antigen-specific cytotoxic t-cell and igg2a response. *Blood*, 109(7):2953–60.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–254.

Bradley, T. P. und Bonavida, B. (1982). Mechanism of cell-mediated cytotoxicity at the single cell level. iv. natural killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity can be mediated by the same human effector cell as determined by the two-target conjugate assay. *J Immunol*, 129(5):2260–2265.

Bulut, Y., Faure, E., Thomas, L., Karahashi, H., Michelsen, K. S., Equils, O., Morrison, S. G., Morrison, R. P., und Arditi, M. (2002). Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through toll-like receptor 4 and md2 in a myd88-dependent pathway. *J Immunol*, 168 (3):1435–1440.

Byrd-Leifer, C. A., Block, E. F., Takeda, K., Akira, S., und Ding, A. (2001). The role of myd88 and tlr4 in the lps-mimetic activity of taxol. *Eur J Immunol*, 31(8):2448–2457.

Caligiuri, M. A., Zmuidzinas, A., Manley, T. J., Levine, H., Smith, K. A., und Ritz, J. (1990). Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J Exp Med*, 171(5):1509–1526.

Caligiuri, M. A. (2008). Human natural killer cells. *Blood*, 112(3):461–469.

Campoli, M. und Ferrone, S. (2008). Tumor escape mechanisms: potential role of soluble hla antigens and nk cells activating ligands. *Tissue Antigens*, 72(4):321–334.

Campos, M. A., Almeida, I. C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E. P., Procopio, D. O., Travassos, L. R., Smith, J. A., Golenbock, D. T., und Gazzinelli, R. T. (2001). Activation of toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol*, 167(1):416–423.

Carrega, P., Morandi, B., Costa, R., Frumento, G., Forte, G., Altavilla, G., Ratto, G. B., Mingari, M. C., Moretta, L., und Ferlazzo, G. (2008). Natural killer cells infiltrating human nonsmall-cell lung cancer are enriched in cd56 bright cd16(-) cells and display an impaired capability to kill tumor cells. *Cancer*, 112(4):863–75.

Cerwenka, A. und Lanier, L. L. (2001). Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol*, 1(1): 41–49.

Chan, A., Hong, D. L., Atzberger, A., Kollnberger, S., Filer, A. D., Buckley, C. D., McMichael, A., Enver, T., und Bowness, P. (2007). Cd56bright human nk cells differentiate into cd56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol*, 179(1):89–94.

Chan, C. J., Andrews, D. M., und Smyth, M. J. (2008). Can nk cells be a therapeutic target in human cancer? *Eur J Immunol*, 38(11):2964–2968.

Chavez-Galan, L., Angel, M. C. A.-D., Zenteno, E., Chavez, R., und Lascurain, R. (2009). Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol*, 6(1):15–25.

Chen, R., Alvero, A. B., Silasi, D.-A., Steffensen, K. D., und Mor, G. (2008). Cancers take their toll–the function and regulation of toll-like receptors in cancer cells. *Oncogene*, 27(2):225–233.

Childs, K., Stock, N., Ross, C., Andrejeva, J., Hilton, L., Skinner, M., Randall, R., und Goodbourn, S. (2007). mda-5, but not rig-i, is a common target for paramyxovirus v proteins. *Virology*, 359(1): 190–200.

Chin, D., Boyle, G. M., Theile, D. R., Parsons, P. G., und Coman, W. B. (2004). Molecular introduction to head and neck cancer (hnscc) carcinogenesis. *Br J Plast Surg*, 57(7):595–602.

Chin, D., Boyle, G. M., Porceddu, S., Theile, D. R., Parsons, P. G., und Coman, W. B. (2006). Head and neck cancer: past, present and future. *Expert Rev Anticancer Ther*, 6(7):1111–1118.

Coban, C., Ishii, K. J., Kawai, T., Hemmi, H., Sato, S., Uematsu, S., Yamamoto, M., Takeuchi, O., Itagaki, S., Kumar, N., Horii, T., und Akira, S. (2005). Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med*, 201(1):19–25.

Colucci, F., Caligiuri, M. A., und Santo, J. P. D. (2003). What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol*, 3(5):413–425.

Cooper, M. A., Fehniger, T. A., und Caligiuri, M. A. (2001)a. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*, 22(11):633–40.

Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Turner, S. C., Chen, K. S., Ghaheri, B. A., Ghayur, T., Carson, W. E., und Caligiuri, M. A. (2001)b. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the cd56(bright) subset. *Blood*, 97(10):3146–51.

Cragg, M. S., French, R. R., und Glennie, M. J. (1999). Signaling antibodies in cancer therapy. *Curr Opin Immunol*, 11(5):541–547.

Delves, P. J. und Roitt, I. M. (2000). The immune system. first of two parts. *N Engl J Med*, 343(1): 37–49.

Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., und Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of tlr7-mediated recognition of single-stranded rna. *Science*, 303(5663):1529–31.

Diebold, S. S., Massacrier, C., Akira, S., Paturel, C., Morel, Y., und e Sousa, C. R. (2006). Nucleic acid agonists for toll-like receptor 7 are defined by the presence of uridine ribonucleotides. *Eur J Immunol*, 36(12):3256–3267.

Douglas, W. G., Tracy, E., Tan, D., Yu, J., Hicks, W. L., Rigual, N. R., Loree, T. R., Wang, Y., und Baumann, H. (2004). Development of head and neck squamous cell carcinoma is associated with altered cytokine responsiveness. *Mol Cancer Res*, 2(10):585–593.

Ensley, J. F., Gutkind, S., Jacobs, J. A., und Lippman, S. (2003), *Head and Neck Cancer: Emerging Perspectives*. Elsevier Science (USA), 1 edition.

Farag, S. S. und Caligiuri, M. A. (2006). Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev*, 20(3):123–37.

Farina, C., Krumbholz, M., Giese, T., Hartmann, G., Aloisi, F., und Meinl, E. (2005). Preferential expression and function of toll-like receptor 3 in human astrocytes. *J Neuroimmunol*, 159(1-2): 12–19.

Fehniger, T. A., Shah, M. H., Turner, M. J., VanDeusen, J. B., Whitman, S. P., Cooper, M. A., Suzuki, K., Wechser, M., Goodsaid, F., und Caligiuri, M. A. (1999). Differential cytokine and chemokine gene expression by human nk cells following activation with il-18 or il-15 in combination with il-12: implications for the innate immune response. *J Immunol*, 162(8):4511–4520.

Fehniger, T. A., Cooper, M. A., Nuovo, G. J., Cella, M., Facchetti, F., Colonna, M., und Caligiuri, M. A. (2003). Cd56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by t cell-derived il-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood*, 101(8): 3052–7.

Ferlazzo, G., Pack, M., Thomas, D., Paludan, C., Schmid, D., Strowig, T., Bougras, G., Muller, W. A., Moretta, L., und Munz, C. (2004)a. Distinct roles of il-12 and il-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(47): 16606–11.

Ferlazzo, G., Thomas, D., Lin, S.-L., Goodman, K., Morandi, B., Muller, W. A., Moretta, A., und Munz, C. (2004)b. The abundant nk cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol*, 172(3):1455–1462.

Fernandez, N. C., Lozier, A., Flament, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Bellet, D., Suter, M., Perricaudet, M., Tursz, T., Maraskovsky, E., und Zitvogel, L. (1999). Dendritic cells directly trigger nk cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med*, 5(4):405–11.

Forastiere, A., Koch, W., Trotti, A., und Sidransky, D. (2001). Head and neck cancer. *N Engl J Med*, 345 (26):1890–1900.

Forastiere, A. A., Ang, K.-K., Brizel, D., Brockstein, B. E., Burtness, B. A., Cmelak, A. J., Colevas, A. D., Dunphy, F., Eisele, D. W., Goepfert, H., Hicks, W. L., Kies, M. S., Lydiatt, W. M., Maghami, E., Martins, R., McCaffrey, T., Mittal, B. B., Pfister, D. G., Pinto, H. A., Posner, M. R., Ridge, J. A., Samant, S., Schuller, D. E., Shah, J. P., Spencer, S., Trotti, A., Weber, R. S., Wolf, G. T., und Worden, F. (2008). Head and neck cancers. *J Natl Compr Canc Netw*, 6(7):646–695.

Fujita, T., Onoguchi, K., Onomoto, K., Hirai, R., und Yoneyama, M. (2007). Triggering antiviral response by rig-i-related rna helicases. *Biochimie*, 89(6-7):754–60. 0300-9084 (Print) Journal Article Review.

Ghiringhelli, F., MÃ©nard, C., Martin, F., und Zitvogel, L. (2006). The role of regulatory t cells in the control of natural killer cells: relevance during tumor progression. *Immunol Rev*, 214:229–238.

Girart, M. V., Fuertes, M. B., Domaica, C. I., Rossi, L. E., und Zwirner, N. W. (2007). Engagement of tlr3, tlr7, and nkg2d regulate ifn-gamma secretion but not nkg2d-mediated cytotoxicity by human nk cells stimulated with suboptimal doses of il-12. *J Immunol*, 179(6):3472–9.

Gitlin, L., Barchet, W., Gilfillan, S., Cella, M., Beutler, B., Flavell, R. A., Diamond, M. S., und Colonna, M. (2006). Essential role of mda-5 in type i ifn responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(22):8459–8464.

Greene, F. L., Balch, C. M., Haller, D. G., und Morrow, M. (2002), *AJCC Cancer Staging Manual (6th Edition)*. Springer, 6th edition. ISBN 9780387952710.

Guillot, L., Goffic, R. L., Bloch, S., Escriou, N., Akira, S., Chignard, M., und Si-Tahar, M. (2005). Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded rna and influenza a virus. *J Biol Chem*, 280(7):5571–5580.

Hak, L., Mysliwska, J., Wieckiewicz, J., Szyndler, K., Trzonkowski, P., Siebert, J., und Mysliwski, A. (2007). Nk cell compartment in patients with coronary heart disease. *Immun Ageing*, 4:3.

Hardisson, D. (2003). Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 260(9):502–508.

Harris, S. L. und Levine, A. J. (2005). The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 24(17):2899–2908.

Hart, O. M., Athie-Morales, V., O'Connor, G. M., und Gardiner, C. M. (2005). Tlr7/8-mediated activation of human nk cells results in accessory cell-dependent ifn-gamma production. *J Immunol*, 175(3): 1636–42.

Hartmann, E., Wollenberg, B., Rothenfusser, S., Wagner, M., Wellisch, D., Mack, B., Giese, T., Gires, O., Endres, S., und Hartmann, G. (2003). Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res*, 63(19):6478–87.

Hartmann, G. und Krieg, A. M. (2000). Mechanism and function of a newly identified cpg dna motif in human primary b cells. *J Immunol*, 164(2):944–53.

Hashimoto, C., Hudson, K. L., und Anderson, K. V. (1988). The toll gene of drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, 52(2):269–279.

Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., und Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by toll-like receptor 5. *Nature*, 410(6832):1099–1103.

Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., und Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded rna via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 303(5663):1526–9.

Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., Dietrich, H., Lipford, G., Takeda, K., Akira, S., Wagner, H., und Bauer, S. (2003). The toll-like receptor 7 (tlr7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the tlr7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol*, 33(11):2987–2997.

Heimdal, J. H., Aarstad, H. J., Klementsen, B., und 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(2):281–284.

Heine, H. und Lien, E. (2003). Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. *Int Arch Allergy Immunol*, 130(3):180–192.

Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G., und Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (il)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*, 374(Pt 1): 1–20.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., und Akira, S. (2000). A toll-like receptor recognizes bacterial dna. *Nature*, 408 (6813):740–5.

Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., und Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the tlr7 myd88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol*, 3(2):196–200.

Heo, D. S., Snyderman, C., Gollin, S. M., Pan, S., Walker, E., Deka, R., Barnes, E. L., Johnson, J. T., Herberman, R. B., und Whiteside, T. L. (1989). Biology, cytogenetics, and sensitivity to immunological effector cells of new head and neck squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res*, 49(18): 5167–5175.

Hirschfeld, M., Weis, J. J., Toshchakov, V., Salkowski, C. A., Cody, M. J., Ward, D. C., Qureshi, N., Michalek, S. M., und Vogel, S. N. (2001). Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun*, 69(3):1477–1482.

Hoffman, H. T., Karnell, L. H., Funk, G. F., Robinson, R. A., und Menck, H. R. (1998). The national cancer data base report on cancer of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 124 (9):951–962.

Hopkins, P. A. und Sriskandan, S. (2005). Mammalian toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin Exp Immunol*, 140(3):395–407.

Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S., und Hartmann, G. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mrna in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to cpg oligodeoxynucleotides. *J Immunol*, 168(9):4531–7.

Hornung, V., Guenthner-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougerolles, A., Endres, S., und Hartmann, G. (2005). Sequence-specific potent induction of ifn-alpha by short interfering rna in plasmacytoid dendritic cells through tlr7. *Nat Med*, 11(3):263–70.

Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.-K., Schlee, M., Endres, S., und Hartmann, G. (2006). 5'-triphosphate rna is the ligand for rig-i. *Science*, 314(5801):994–997.

Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., und Akira, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (tlr4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for tlr4 as the lps gene product. *J Immunol*, 162(7):3749–3752.

Ishii, K. J., Coban, C., und Akira, S. (2005). Manifold mechanisms of toll-like receptor-ligand recognition. *J Clin Immunol*, 25(6):511–521.

Iwasaki, A. und Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*, 5(10):987–995.

Jacobs, R., Hintzen, G., Kemper, A., Beul, K., Kempf, S., Behrens, G., Sykora, K. W., und Schmidt, R. E. (2001). Cd56bright cells differ in their kir repertoire and cytotoxic features from cd56dim nk cells. *Eur J Immunol*, 31(10):3121–3127.

Janeway, C. A. (1989). Approaching the asymptote? evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 54 Pt 1:1–13.

Johnson, G. B., Brunn, G. J., Kodaira, Y., und Platt, J. L. (2002). Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by toll-like receptor 4. *J Immunol*, 168 (10):5233–5239.

Judge, A. D., Sood, V., Shaw, J. R., Fang, D., McClintock, K., und MacLachlan, I. (2005). Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic sirna. *Nat Biotechnol*, 23(4):457–62.

Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A. M., Wagner, H., Lipford, G., und Bauer, S. (2002). Human tlr7 or tlr8 independently confer responsiveness to the antiviral compound r-848. *Nat Immunol*, 3(6):499.

Kaerre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G., und Kiessling, R. (1986). Selective rejection of h-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*, 319(6055):675–678.

Kariko, K., Bhuyan, P., Capodici, J., und Weissman, D. (2004)a. Small interfering rnas mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. *J Immunol*, 172(11):6545–6549.

Kariko, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M., und Weissman, D. (2004)b. mrna is an endogenous ligand for toll-like receptor 3. *J Biol Chem*, 279(13):12542–12550.

Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K. J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C. S., Reis e Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T., und Akira, S. (2006). Differential roles of mda5 and rig-i helicases in the recognition of rna viruses. *Nature*, 441(7089):101–5.

Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T. S., Fujita, T., und Akira, S. (2008). Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-i and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med*, 205(7):1601–1610.

Kawai, T. und Akira, S. (2007). Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *J Biochem*, 141(2):137–145.

Kawai, T. und Akira, S. (2008). Toll-like receptor and rig-i-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci*, 1143:1–20.

Kawai, T. und Akira, S. (2009). The roles of tlrs, rlrs and nlrs in pathogen recognition. *Int Immunol*, 21 (4):317–337.

Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K. J., Takeuchi, O., und Akira, S. (2005). Ips-1, an adaptor triggering rig-i- and mda5-mediated type i interferon induction. *Nat Immunol*, 6(10):981–988.

Kim, R., Emi, M., und Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121(1):1–14.

Klinman, D. M., Currie, D., Gursel, I., und Verthelyi, D. (2004). Use of cpg oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol Rev*, 199:201–16.

Krishnegowda, G., Hajjar, A. M., Zhu, J., Douglass, E. J., Uematsu, S., Akira, S., Woods, A. S., und Gowda, D. C. (2005). Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of plasmodium falciparum: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (gpi) structural requirement, and regulation of gpi activity. *J Biol Chem*, 280(9):8606–8616.

Krug, A., French, A. R., Barchet, W., Fischer, J. A. A., Dzionek, A., Pingel, J. T., Orihuela, M. M., Akira, S., Yokoyama, W. M., und Colonna, M. (2004). Tlr9-dependent recognition of mcmv by ipc and dc generates coordinated cytokine responses that activate antiviral nk cell function. *Immunity*, 21 (1):107–119.

Kurt-Jones, E. A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L. M., Jones, L. P., Tripp, R. A., Walsh, E. E., Freeman, M. W., Golenbock, D. T., Anderson, L. J., und Finberg, R. W. (2000). Pattern recognition receptors tlr4 and cd14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol*, 1(5):398–401.

Kuss, I., Hathaway, B., Ferris, R. L., Gooding, W., und 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(11):3755–3762.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227(5259):680–685.

Lanier, L. L., Le, A. M., Civin, C. I., Loken, M. R., und Phillips, J. H. (1986). The relationship of cd16 (leu-11) and leu-19 (nkh-1) antigen expression on human peripheral blood nk cells and cytotoxic t lymphocytes. *J Immunol*, 136(12):4480–4486.

Lanier, L. L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol*, 9(5): 495–502.

Lathers, D. M. R. und Young, M. R. I. (2004). Increased aberrance of cytokine expression in plasma of patients with more advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cytokine*, 25(5): 220–228.

Ljunggren, H. G. und Kaerre, K. (1990). In search of the 'missing self': Mhc molecules and nk cell recognition. *Immunol Today*, 11(7):237–244.

Loose, D. und de Wiele, C. V. (2009). The immune system and cancer. *Cancer Biother Radiopharm*, 24(3):369–376.

Lund, J. M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N. C., Gale, N. W., Iwasaki, A., und Flavell, R. A. (2004). Recognition of single-stranded rna viruses by toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(15):5598–603.

Malmberg, K. J. und Ljunggren, H. G. (2006). Escape from immune- and nonimmune-mediated tumor surveillance. *Semin Cancer Biol*, 16(1):16–31.

Marques, J. T. und Williams, B. R. (2005). Activation of the mammalian immune system by sirnas. *Nat Biotechnol*, 23(11):1399–405.

Matsumoto, M., Funami, K., Tanabe, M., Oshiumi, H., Shingai, M., Seto, Y., Yamamoto, A., und Seya, T. (2003). Subcellular localization of toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol*, 171 (6):3154–62.

Matsumoto, M. und Seya, T. (2008). Tlr3: interferon induction by double-stranded rna including poly(i:c). *Adv Drug Deliv Rev*, 60(7):805–812.

Matsumoto, M., Kikkawa, S., Kohase, M., Miyake, K., und Seya, T. (2002). Establishment of a monoclonal antibody against human toll-like receptor 3 that blocks double-stranded rna-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 293(5):1364–1369.

Medzhitov, R. und Janeway, C. (2000). Innate immunity. *N Engl J Med*, 343(5):338–344.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., und Janeway, C. A. (1997). A human homologue of the drosophila toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640):394–397.

Mian, M. F., Lauzon, N. M., Stämpfli, M. R., Mossman, K. L., und Ashkar, A. A. (2008). Impairment of human nk cell cytotoxic activity and cytokine release by cigarette smoke. *J Leukoc Biol*, 83(3): 774–784.

Miettinen, M. (1993). Immunohistochemistry in tumour diagnosis. *Ann Med*, 25(3):221–233.

Miettinen, M., Sareneva, T., Julkunen, I., und Matikainen, S. (2001). Ifns activate toll-like receptor gene expression in viral infections. *Genes Immun*, 2(6):349–355.

Miyake, T., Kumagai, Y., Kato, H., Guo, Z., Matsushita, K., Satoh, T., Kawagoe, T., Kumar, H., Jang, M. H., Kawai, T., Tani, T., Takeuchi, O., und Akira, S. (2009). Poly i:c-induced activation of nk cells by cd8alpha+ dendritic cells via the ips-1 and trif-dependent pathways. *J Immunol*, 183(4): 2522–2528.

Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M. C., Biassoni, R., und Moretta, L. (2001). Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytolysis. *Annu Rev Immunol*, 19:197–223.

Moretta, L., Bottino, C., Pende, D., Vitale, M., Mingari, M. C., und Moretta, A. (2005). Human natural killer cells: Molecular mechanisms controlling nk cell activation and tumor cell lysis. *Immunol Lett*, 100(1):7–13.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2):55–63.

Nagler, A., Lanier, L. L., Cwirla, S., und Phillips, J. H. (1989). Comparative studies of human fcriii-positive and negative natural killer cells. *J Immunol*, 143(10):3183–3191.

O'Connor, G. M., Hart, O. M., und Gardiner, C. M. (2006). Putting the natural killer cell in its place. *Immunology*, 117(1):1–10.

Okamoto, M. und Sato, M. (2003). Toll-like receptor signaling in anti-cancer immunity. *J Med Invest*, 50 (1-2):9–24.

Okamoto, M., Gohda, H., Ohe, G., Yoshida, H., Matsuno, T., Saito, M., und Sato, M. (2000). Cytokine-inducing activity and antitumor effect of a liposome-incorporated interferon-gamma-inducing molecule derived from ok-432, a streptococcal preparation. *J Immunother (1997)*, 23(1):94–103.

Okamoto, M., Oshikawa, T., Tano, T., Ohe, G., Furuichi, S., Nishikawa, H., Ahmed, S. U., Akashi, S., Miyake, K., Takeuchi, O., Akira, S., Moriya, Y., Matsubara, S., Ryoma, Y., Saito, M., und Sato, M. (2003). Involvement of toll-like receptor 4 signaling in interferon-gamma production and antitumor effect by streptococcal agent ok-432. *J Natl Cancer Inst*, 95(4):316–26.

Okamoto, M., Furuichi, S., Nishioka, Y., Oshikawa, T., Tano, T., Ahmed, S. U., Takeda, K., Akira, S., Ryoma, Y., Moriya, Y., Saito, M., Sone, S., und Sato, M. (2004). Expression of toll-like receptor 4 on dendritic cells is significant for anticancer effect of dendritic cell-based immunotherapy in combination with an active component of ok-432, a streptococcal preparation. *Cancer Res*, 64 (15):5461–70.

Okamura, Y., Watari, M., Jerud, E. S., Young, D. W., Ishizaka, S. T., Rose, J., Chow, J. C., und Strauss, J. F. (2001). The extra domain a of fibronectin activates toll-like receptor 4. *J Biol Chem*, 276(13): 10229–10233.

Orange, J. S. und Ballas, Z. K. (2006). Natural killer cells in human health and disease. *Clin Immunol*, 118(1):1–10.

Penack, O., Gentilini, C., Fischer, L., Asemissen, A. M., Scheibenbogen, C., Thiel, E., und Uharek, L. (2005). Cd56dimcd16neg cells are responsible for natural cytotoxicity against tumor targets. *Leukemia*, 19(5):835–840.

Perussia, B., Chen, Y., und Loza, M. J. (2005). Peripheral nk cell phenotypes: multiple changing of faces of an adapting, developing cell. *Mol Immunol*, 42(4):385–395.

Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C. P., Naslund, T. I., Liljestrom, P., Weber, F., und Reis e Sousa, C. (2006). Rig-i-mediated antiviral responses to single-stranded rna bearing 5'-phosphates. *Science*, 314 (5801):997–1001.

Poli, A., Michel, T., Theresine, M., Andres, E., Hentges, F., und Zimmer, J. (2009). Cd56bright natural killer (nk) cells: an important nk cell subset. *Immunology*, 126(4):458–465.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Huffel, C. V., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., und Beutler, B. (1998). Defective lps signaling in c3h/hej and c57bl/10sccr mice: mutations in tlr4 gene. *Science*, 282(5396): 2085–2088.

Pries, R. und Wollenberg, B. (2006). Cytokines in head and neck cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 17(3):141–146.

Pries, R., Nitsch, S., und Wollenberg, B. (2006). Role of cytokines in head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther*, 6(9):1195–1203.

Pries, R., Hogrefe, L., Xie, L., Frenzel, H., Brocks, C., Ditz, C., und Wollenberg, B. (2008)a. Induction of c-myc-dependent cell proliferation through toll-like receptor 3 in head and neck cancer. *Int J Mol Med*, 21(2):209–215.

Pries, R., Wulff, S., und Wollenberg, B. (2008)b. Toll-like receptor modulation in head and neck cancer. *Crit Rev Immunol*, 28(3):201–213.

Rassa, J. C., Meyers, J. L., Zhang, Y., Kudaravalli, R., und Ross, S. R. (2002). Murine retroviruses activate b cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(4):2281–2286.

Raulet, D. H. (2004). Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat Immunol*, 5(10):996–1002.

Raulet, D. H., Vance, R. E., und McMahon, C. W. (2001). Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol*, 19:291–330.

Riebe, C. (2009). *TLR3 und p38 MAP Kinase vermittelte Signaltransduktionskaskaden in Kopf-Hals-Karzinomen*. Doktorarbeit, Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Technisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Institut für Biologie der Universität zu Lübeck.

Robertson, M. J. und Ritz, J. (1990). Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*, 76(12):2421–2438.

Robertson, M. J., Cochran, K. J., Cameron, C., Le, J. M., Tantravahi, R., und Ritz, J. (1996). Characterization of a cell line, nkl, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia. *Exp Hematol*, 24(3):406–415.

Romagnani, C., Juelke, K., Falco, M., Morandi, B., D'Agostino, A., Costa, R., Ratto, G., Forte, G., Carrega, P., Lui, G., Conte, R., Strowig, T., Moretta, A., Munz, C., Thiel, A., Moretta, L., und Ferlazzo, G. (2007). Cd56brightcd16- killer ig-like receptor- nk cells display longer telomeres and acquire features of cd56dim nk cells upon activation. *J Immunol*, 178(8):4947–55.

Ryoma, Y., Moriya, Y., Okamoto, M., Kanaya, I., Saito, M., und Sato, M. (2004). Biological effect of ok-432 (picibanil) and possible application to dendritic cell therapy. *Anticancer Res*, 24(5C): 3295–301.

Scheel, B., Aulwurm, S., Probst, J., Stitz, L., Hoerr, I., Rammensee, H. G., Weller, M., und Pascolo, S. (2006). Therapeutic anti-tumor immunity triggered by injections of immunostimulating single-stranded rna. *Eur J Immunol*, 36(10):2807–16.

Schroeder, N. W. J., Morath, S., Alexander, C., Hamann, L., Hartung, T., Zaehringer, U., GÃ¶bel, U. B., Weber, J. R., und Schumann, R. R. (2003). Lipoteichoic acid (lta) of streptococcus pneumoniae and staphylococcus aureus activates immune cells via toll-like receptor (tlr)-2, lipopolysaccharide-binding protein (lbp), and cd14, whereas tlr-4 and md-2 are not involved. *J Biol Chem*, 278(18):15587–15594.

Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., und Kirschning, C. J. (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem*, 274(25): 17406–17409.

Sioud, M. (2006). Single-stranded small interfering rna are more immunostimulatory than their double-stranded counterparts: a central role for 2'-hydroxyl uridines in immune responses. *Eur J Immunol*, 36(5):1222–30.

Sivori, S., Falco, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Vitale, M., Moretta, L., und Moretta, A. (2004). Cpg and double-stranded rna trigger human nk cells by toll-like receptors: induction of cytokine

release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(27): 10116–21.

Smiley, S. T., King, J. A., und Hancock, W. W. (2001). Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol*, 167(5):2887–2894.

Smyth, M. J., Hayakawa, Y., Takeda, K., und Yagita, H. (2002). New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2(11):850–861.

Sparano, A., Lathers, D. M. R., Achille, N., Petruzzelli, G. J., und Young, M. R. I. (2004). Modulation of th1 and th2 cytokine profiles and their association with advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 131(5):573–576.

Spits, H., Lanier, L. L., und Phillips, J. H. (1995). Development of human t and natural killer cells. *Blood*, 85(10):2654–2670.

Sugiyama, T., Gursel, M., Takeshita, F., Coban, C., Conover, J., Kaisho, T., Akira, S., Klinman, D. M., und Ishii, K. J. (2005). Cpg rna: identification of novel single-stranded rna that stimulates human cd14+cd11c+ monocytes. *J Immunol*, 174(4):2273–9.

Szczepanski, M. J., Czystowska, M., Szajnik, M., Harasymczuk, M., Boyiadzis, M., Kruk-Zagajewska, A., Szyfter, W., Zeromski, J., und Whiteside, T. L. (2009). Triggering of toll-like receptor 4 expressed on human head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor development and protects the tumor from immune attack. *Cancer Res*, 69(7):3105–3113.

Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., Alexopoulou, L., Flavell, R. A., und Beutler, B. (2004). Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(10):3516–3521.

Takasugi, M., Mickey, M. R., und Terasaki, P. I. (1973). Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumor cells. *Cancer Res*, 33(11):2898–2902.

Takeda, K. und Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, 17(1):1–14.

Takeshita, F., Leifer, C. A., Gursel, I., Ishii, K. J., Takeshita, S., Gursel, M., und Klinman, D. M. (2001). Cutting edge: Role of toll-like receptor 9 in cpg dna-induced activation of human cells. *J Immunol*, 167(7):3555–3558.

Takeuchi, O., Kawai, T., Mühlradt, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K., und Akira, S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by toll-like receptor 6. *Int Immunol*, 13(7): 933–940.

Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L., und Akira, S. (2002). Cutting edge: role of toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol*, 169(1):10–14.

Talmadge, J. E., Donkor, M., und Scholar, E. (2007). Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or hyde. *Cancer Metastasis Rev*, 26(3-4):373–400.

Tapping, R. I. und Tobias, P. S. (2003). Mycobacterial lipoarabinomannan mediates physical interactions between tlr1 and tlr2 to induce signaling. *J Endotoxin Res*, 9(4):264–268.

Terme, M., Ullrich, E., Delahaye, N. F., Chaput, N., und Zitvogel, L. (2008). Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nat Immunol*, 9(5):486–94.

Timar, J., Ladanyi, A., Forster-Horvath, C., Lukits, J., Doeme, B., Remenar, E., Godany, M., Kasler, M., Bencsik, B., Repassy, G., Szabo, G., Velich, N., Suba, Z., Elo, J., Balatoni, Z., Pocza, K., Zemplen, B., Chretien, P., und Talor, E. (2005). Neoadjuvant immunotherapy of oral squamous cell carcinoma modulates intratumoral cd4/cd8 ratio and tumor microenvironment: a multicenter phase ii clinical trial. *J Clin Oncol*, 23(15):3421–3432.

Trinchieri, G. (1989). Biology of natural killer cells. *Adv Immunol*, 47:187–376.

Uehori, J., Fukase, K., Akazawa, T., Uematsu, S., Akira, S., Funami, K., Shingai, M., Matsumoto, M., Azuma, I., Toyoshima, K., Kusumoto, S., und Seya, T. (2005). Dendritic cell maturation induced by muramyl dipeptide (mdp) derivatives: monoacylated mdp confers tlr2/tlr4 activation. *J Immunol*, 174(11):7096–7103.

Underhill, D. M., Ozinsky, A., Hajjar, A. M., Stevens, A., Wilson, C. B., Bassetti, M., und Aderem, A. (1999). The toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*, 401(6755):811–815.

van Herpen, C. M. L., van der Laak, J. A. W. M., de Vries, I. J. M., van Krieken, J. H., de Wilde, P. C., Balvers, M. G. J., Adema, G. J., und Mulder, P. H. M. D. (2005). Intratumoral recombinant human interleukin-12 administration in head and neck squamous cell carcinoma patients modifies locoregional lymph node architecture and induces natural killer cell infiltration in the primary tumor. *Clin Cancer Res*, 11(5):1899–1909.

Vitale, M., Chiesa, M. D., Carlomagno, S., Romagnani, C., Thiel, A., Moretta, L., und Moretta, A. (2004). The small subset of cd56brightcd16- natural killer cells is selectively responsible for both cell proliferation and interferon-gamma production upon interaction with dendritic cells. *Eur J Immunol*, 34(6):1715–1722.

Wallace, M. E. und Smyth, M. J. (2005). The role of natural killer cells in tumor control–effectors and regulators of adaptive immunity. *Springer Semin Immunopathol*, 27(1):49–64.

Wang, T., Town, T., Alexopoulou, L., Anderson, J. F., Fikrig, E., und Flavell, R. A. (2004). Toll-like receptor 3 mediates west nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med*, 10 (12):1366–1373.

Warren, H. S. und Smyth, M. J. (1999). Nk cells and apoptosis. *Immunol Cell Biol*, 77(1):64–75.

Weatherill, A. R., Lee, J. Y., Zhao, L., Lemay, D. G., Youn, H. S., und Hwang, D. H. (2005). Saturated and polyunsaturated fatty acids reciprocally modulate dendritic cell functions mediated through tlr4. *J Immunol*, 174(9):5390–5397.

Werts, C., Tapping, R. I., Mathison, J. C., Chuang, T. H., Kravchenko, V., Girons, I. S., Haake, D. A., Godowski, P. J., Hayashi, F., Ozinsky, A., Underhill, D. M., Kirschning, C. J., Wagner, H., Aderem, A., Tobias, P. S., und Ulevitch, R. J. (2001). Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a tlr2-dependent mechanism. *Nat Immunol*, 2(4):346–352.

Whiteside, T. L. (2005). Immunobiology of head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 24(1): 95–105.

Wilk, E., Kalippke, K., Buyny, S., Schmidt, R. E., und Jacobs, R. (2008). New aspects of nk cell subset identification and inference of nk cells' regulatory capacity by assessing functional and genomic profiles. *Immunobiology*, 213(3-4):271–283.

Wörnle, M., Sauter, M., Kastenmüller, K., Ribeiro, A., Röder, M., Schmid, H., Krötz, F., Mussack, T., Ladurner, R., und Sitter, T. (2009). Novel role of toll-like receptor 3, rig-i and mda5 in poly (i:c) rna-induced mesothelial inflammation. *Mol Cell Biochem*, 322(1-2):193–206.

Xie, L., Pries, R., Kesselring, R., Wulff, S., und Wollenberg, B. (2007). Head and neck cancer triggers the internalization of tlr3 in natural killer cells. *Int J Mol Med*, 20(4):493–9.

Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J. F., Bannenberg, G. L., Serhan, C. N., Hayden, M. S., Hieny, S., Sutterwala, F. S., Flavell, R. A., Ghosh, S., und Sher, A. (2005). Tlr11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*, 308(5728):1626–1629.

Yoneyama, M. und Fujita, T. (2007). Rig-i family rna helicases: cytoplasmic sensor for antiviral innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev*, 18(5-6):545–51.

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y.-M., Gale, M., Akira, S., Yonehara, S., Kato, A., und Fujita, T. (2005). Shared and unique functions of the dexd/h-box helicases rig-i, mda5, and lgp2 in antiviral innate immunity. *J Immunol*, 175(5): 2851–2858.

Young, J. D. und Cohn, Z. A. (1987). Cellular and humoral mechanisms of cytotoxicity: structural and functional analogies. *Adv Immunol*, 41:269–332.

Young, M. R. I. (2006). Protective mechanisms of head and neck squamous cell carcinomas from immune assault. *Head Neck*, 28(5):462–470.

8 Abbildungsverzeichnis

1 Modell - Aktivierung und Inhibierung von NK-Zellen 5

2 Humane NK-Zell-Subpopulationen 8

3 TLRs und ihre Liganden 12

4 TLR- und RLR-Erkennung viraler Nukleinsäuren und ihre Signalwege 14

5 Tumor-*Escape*-Mechanismen 18

6 Bestimmung von Zytokinkonzentrationen 37

7 FACS-Analyse zur Charakterisierung und Identifizierung von NK-Zellen 41

8 Die intrazelluläre TLR-Expression in humanen NK-Zellen 43

9 Die membranständige TLR-Expression in humanen NK-Zellen 44

10 Die NK-Zell-Subpopulationen können im FACS getrennt voneinander betrachtet werden . 45

11 CD16-Expression bei NK-Zellen 46

12 CD16-Expression bei sortierten NK-Zellen 47

13 Lokalisation von NK-Zellen im Tumorgewebe 48

14 Anzahl zirkulierender NK-Zellen in peripherem Blut 49

15 Anzahl zirkulierender $CD56^{bright}$-NK-Zellen verschiedener Tumorlokalisationen 50

16 HNSCC hat keinen Einfluss auf CD69 51

17 Aktivierung von NK-Zellen durch Poly I:C 52

18 TLR3 wird intrazellulär und an der Zelloberfläche exprimiert 53

19 TLR3 wird durch das HNSCC-Milieu internalisiert 54

20 TLR3 wird bei Tumorpatienten stärker exprimiert als bei gesunden Patienten 55

21 MDA5 kann sowohl in Tumorzellen als auch in NK-Zellen nachgewiesen werden 56

22 Optimale Inkubationszeit mit Poly I:C für die Steigerung der MDA5-Expression 57

23 MDA5 wird durch HNSCC-Milieu vermindert exprimiert 58

24 Poly I:C hat einen sehr heterogenen Einfluss auf die MDA5-Expression gesunder Spender 59

25 MDA5 wird durch Poly I:C vermehrt an der Oberfläche exprimiert 60

26 Poly I:C wirkt auf die Zytokinsekretion gesunder Spender 61

27 Poly I:C steigert die Zytokinsekretion von IFN-γ, IL-6 und TNF-α 63
28 Poly I:C steigert die Zytokinsekretion bei Tumorpatienten weniger als bei Gesunden . . . 64
29 ss-isRNA wirkt sich nicht auf das Wachstum von HNSCC-Zellen aus 65
30 NK-Zell-Zytotoxizität gegen HNSCC wird durch ss-isRNA gesteigert 66
31 In vivo Fluoreszenzmikroskopie 67
32 HNSCC verringert die durch ss-isRNA induzierte NK-Zell-Zytotoxizität 68
33 Gesteigerte TLR7-Expression als Antwort auf ss-isRNA 69
34 Stimulation der NK-Zell vermittelten Zytotoxizität benötigt TLR7 70
35 Erhöhte Granzym B - und Perforin-Expression durch ss-isRNA-Stimulation 71
36 Ss-isRNA induziert die IFN-γ-Sekretion 72

37 Modell - Einfluss von Poly I:C auf NK-Zellen 80
38 Modell - Einfluss von HNSCC auf NK-Zellen 83
39 Modell - Aktivierung von NK-Zellen durch ss-isRNA 85

9 Tabellenverzeichnis

1 UICC- Einteilung der HNSCC-Stadien 2

2 Rezeptoren von Natürlichen-Killer-Zellen 7

3 Rezeptor-Unterschiede bei den NK-Zell-Subpopulationen 9

4 *Toll-like* Rezeptoren und ihre Liganden 10

5 Zelllinien 26

6 Antikörper für die Durchflusszytometrie 27

7 Antikörper für die Immunhistochemie 27

8 Blut- und Gewebeproben 28

9 Stimulation NK-Zellen 33

10 mRNA-Analysen der *Toll-like* Rezeptoren in Immunzellen 75

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Barbara Wollenberg für die Überlassung des interessanten und aktuellen Promotionsthemas und ihr großes Interesse am Fortschritt dieser Arbeit.

Ich danke weiterhin Prof. Dr. Jürgen Rohwedel für die Übernahme des Erstgutachtens meiner Dissertation und für das große Interesse, das er meiner Arbeit entgegengebracht hat.

Ein sehr großes Dankeschön gilt Herrn Dr. Ralph Pries für die Betreuung und die vielen aufmunternden Worte während der gesamten Zeit meiner Promotion sowie für die konstruktive Kritik am Manuskript dieser Arbeit.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei den jetzigen und früheren Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Wollenberg für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.
Ich danke besonders Christina Crusius und Christine Riebe für ihre freundschaftliche Zusammenarbeit, die stets vorhandene Diskussionsbereitschaft und moralische Unterstützung sowie für die kritische Durchsicht meines Manuskripts.
Für die technische Unterstützung bedanke ich mich insbesondere bei Brigitte Wollmann sowie bei Birgit Hüsing, Ewelina Szymanski und Britta Dannenberg.
Auch danke ich Kirsten Börngen und Vincent Ivo Schuhmann, die als Master beziehungsweise Bachelor an Teilen meiner Arbeit mitgewirkt haben.

Kristin Roßdeutscher danke ich sehr herzlich für die freundschaftliche Unterstützung und das Lesen des Manuskripts dieser Arbeit.
Meiner Familie danke ich sehr dafür, mich in der Zeit meines Studiums und der anschließenden Promotion immer unterstützt zu haben. Insbesondere danke ich meinem Freund Michael Minge für sein unendliches Verständnis und seine moralische Unterstützung.

Präsentationen und Veröffentlichungen

Präsentationen

Wulff S., Pries R., Wollenberg B., Network of TLR3 mediated NK cell activation in Head and Neck Cancer, 2nd European Congress of Immunology, Berlin 2009

Wulff S., Idel C., Pries R., Wollenberg B., Einfluss von HNSCC auf die Aktivität humaner NK Zellen, 80. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie e. V., Rostock 2009

Wulff S., Pries R., Wollenberg B., Function and regulation of human NK cells in Head and Neck Cancer, Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies, Wien 2008

Wulff S., Pries R., Kesselring R., Wollenberg B., ss-isRNA induziert eine erhöhte Zytotoxizität Natürlicher Killerzellen gegen Kopf-Hals-Karzinome, 79. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie e. V., Bonn 2008

Kesselring R., Pries R., Wulff S., Wollenberg B., Kopf-Hals Karzinome bewirken die Internalisierung von TLR3 in Natürlichen Killer Zellen, 79. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie e. V., Bonn 2008

Wulff S., Pries R., Kesselring R., Wollenberg B., Funktion und Regulation humaner NK Zellen bei Kopf-Hals-Karzinomen, 78. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie e. V., München 2007

Veröffentlichungen

Wulff S., Pries R., Börngen K., Trenkle T., Wollenberg B., Decreased levels of circulating regulatory NK Cells in Patients with Head and Neck Cancer throughout all Tumor Stages, Anticancer research 2009, 29(8), 3053-7, PMID: 19661315

Pries R., Wulff S., Wollenberg B., Toll-like receptor modulation in head and neck cancer, Crit Rev Immunol. 2008; 28(3), 201-13, Review, PMID: 19024345

Pries R., Wulff S., Kesselring R., Börngen K., Xie L., Wollenberg B., Up-regulation of NK cell function against head and neck cancer in response to ss-isRNA requires TLR7, Int J Oncol. 2008; 33(5), 993-1000, PMID: 18949362

Xie L., Pries R., Kesselring R., Wulff S., Wollenberg B., Head and neck cancer triggers the internalization of TLR3 in natural killer cells, Int J Mol Med, 2007, 20 (4), 493-9, PMID: 17786279