

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde,
Kopf- und Halschirurgie „Otto Körner“
Medizinische Fakultät der Universität zu Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. H. W. Pau

**Vergleichende Genexpressionsanalyse Natürlicher
Killerzellen von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinom
mittels Microarraytechnik**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Arne Böttcher

geboren am 13. Mai 1980 in Güstrow

Rostock 2010

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 29.03.2010
Öffentliche Verteidigung: 20.07.2010

Dekan: Prof. Dr. med. E. C. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. B. Kramp, Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. J. A. Werner, Marburg

3. Gutachter: Prof. Dr. B. Müller-Hilke, Rostock

- Inhaltsverzeichnis -

Kapitel	Seite
<i>I. Abkürzungsverzeichnis</i>	5
<i>II. Abbildungsverzeichnis</i>	9
<i>III. Tabellenverzeichnis</i>	11
<i>IV. Herstellerverzeichnis</i>	12
1. Einleitung	14
1.1 Kopf-Hals-Karzinome	14
1.1.1 Allgemeines	14
1.1.2 Rolle des Immunsystems	16
1.2 Natürliche Killerzellen	18
1.2.1 Definition	18
1.2.2 Entwicklung und Verteilung	18
1.2.3 Subpopulationen	19
1.2.4 Funktion	20
1.2.4.1 Natürliche Zytotoxizität	22
1.2.4.2 Antikörper abhängige Zytotoxizität, ADCC	23
1.2.5 Killerzell-aktivierende Rezeptoren	23
1.3 Zielstellung	24
2. Material und Methoden	25
2.1 Material	25
2.1.1 Geräte	25
2.1.2 Verbrauchsmaterial	26
2.1.3 Chemikalien	27
2.1.4 Puffer und Lösungen	29
2.1.5 Antikörper	31
2.1.6 Primer	31
2.1.7 Software	31
2.1.8 Internet	32
2.2 Methoden	33
2.2.1 Blutgewinnung	33

2.2.2 Isolierung peripher-mononukleärer Zellen	33
2.2.3 Zelldepletion mittels MACS-Technologie	34
2.2.4 Immunphänotypisierung mittels FACS-Technologie	36
2.2.5 Isolierung der Gesamt-RNA und chromatographische Aufreinigung	40
2.2.6 Qualitätsanalyse mittels nativer TBE- Agarosegelelektrophorese	41
2.2.7 Qualitätsanalyse mittels Spektralphotometrie	43
2.2.8 Präparation der Gesamt-RNA zur Genchipanalyse	44
2.2.8.1 Erststrang-cDNA-Synthese und Einführung einer T7 Promoter Signalsequenz	44
2.2.8.2 Zweitstrangsynthese	45
2.2.8.3 <i>In vitro</i> Transkription und Qualitätskontrolle	45
2.2.8.4 Hybridisierung	46
2.2.8.5 Waschung, Färbung und Antikörperamplifikation	46
2.2.9 Genexpressionsanalyse mittels Microarray-Technik	48
2.2.9.1 Funktionsweise der Affymetrix GeneChips	48
2.2.9.2 Durchführung	50
2.2.10 Basisdatenanalyse, Statistische Algorithmen und Datenübergabe	50
2.2.11 Funktionelle Interpretation	51
2.2.12 Probandenkategorisierung	52
2.2.13 Archivarbeit	52
2.2.14 Studiendesign	53
3. Ergebnisse	54
3.1 Patientengut	54
3.2 Deskriptive Statistik	54
3.2.1 Alters- und Geschlechtsverteilung	54
3.2.2 Tumorlokalisierung und Ausdehnung	55
3.2.3 Histologische Ausprägung der Tumore	58
3.2.4 Therapiearten und rezidivfreie Zeit	60
3.3 Ergebnisse der FACS-Analyse	62
3.4 Korrelationsanalyse	64
3.5 Probenauswahl für die Chipanalyse	66

3.6 Expressionsprofiling	67
3.6.1 Gruppenvergleich „Therapiert vs. Krank“	67
3.6.2 Gruppenvergleich „Krank vs. Gesund“	69
3.6.3 Gruppenvergleich „Therapiert vs. Gesund“	73
3.6.4 Differenziell exprimierte Gene in mehr als einem Gruppenvergleich	77
4. Diskussion	79
4.1 Diskussion der Methodik	79
4.2 Diskussion der Ergebnisse	81
4.2.1 Deskriptive Statistik	81
4.2.2 Genexpressionsanalyse	83
4.2.2.1 Gruppenvergleich „Therapiert vs. Krank“	83
4.2.2.2 Gruppenvergleich „Krank vs. Gesund“	85
4.2.2.3 Gruppenvergleich „Therapiert vs. Gesund“	87
4.2.2.4 Differenziell exprimierte Gene in mehr als einem Gruppenvergleich	88
4.3 Klinische Perspektive	90
5. Zusammenfassung	92
6. Literatur	94
7. Anhang	109
7.1 Charakterisierung der Probanden der Genchipanalyse	109
7.2 Lebenslauf	110
7.3 Danksagung	111
7.4 Selbständigkeitserklärung	112
8. Thesen	113

I. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
%	Prozent
A	<i>absent</i> , abwesend
Abb.	Abbildung
ADCC	<i>antibody dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
Ak	Antikörper
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
BK	Berufskrankheit
B-Zellen	Bursa-abgeleitete Lymphozyten, B-Lymphozyten
C	1. Komplement, 2. Kohlenstoff
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary</i> DNA
χ	<i>Chi</i> , Mittelwert
CMV	Zytomegalievirus
cRNA	<i>complementary</i> RNA
CUP	<i>cancer of unknown primary</i>
D	<i>decrease</i> , erniedrigt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DISC	<i>death inducing signal complex</i>
dsDNA	<i>doublestranded</i> DNA
E. coli	Escherichia coli
$E_{\lambda, \max}$	Emissionsmaximum
ELISA	<i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
et al.	<i>et alii</i>
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
FACS	<i>fluorescent activated cell sorting</i>
Fc	<i>fragment cristalline</i> , Fc-Fragment
FC	Fold Change
FITC	Fluoreszinisothiocyanat

FL	Fluoreszenz
FSC	<i>forward light scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
g	1. Gramm, 2. Erdbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$)
GO	Gene Ontology
h	Stunde
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
HPV	humanes Papillomavirus
I	<i>increase</i> , erhöht
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
IVT	<i>in vitro</i> Transkription
KAR	<i>killer cell activating receptor</i>
Kap.	Kapitel
KIR	<i>killer cell immunoglobulin-like receptors</i>
l	Liter
M	1. mol/l, 2. Marginal, grenzwertig
m	1. Milli- (Faktor 10^{-3}), 2. Meter 3. männlich
μ	Mikro- (Faktor 10^{-6})
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
M-CSF	Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
MD	<i>marginal decrease</i> , grenzwertig erniedrigt
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MI	<i>marginal increase</i> , grenzwertig erhöht
min	Minute
mind.	mindestens
MM	<i>mismatch</i>
mol	Mol, molekulare Einheit einer Stoffmenge

mRNA	<i>messenger</i> -RNA
n	1. Nano (Faktor 10^{-9}), 2. numerische Variable
nm	Nanometer
NC	<i>no change</i> , kein Unterschied
NNH	Nasennebenhöhlen
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
P	<i>present</i> , anwesend
p	1. Piko (Faktor 10^{-12}), 2. Irrtumswahrscheinlichkeit
PE	1. Phycoerythrin, 2. Probeexzision
PET-CT	Positronenemissionstomographie-Computertomographie
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PM	<i>perfect match</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
py	<i>pack years</i>
r	Korrelationskoeffizient
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rotations per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
s	Sekunde
s.	siehe
S.	Seite
σ	<i>Sigma</i> , Standardabweichung
SLR	<i>signal log ratio</i>
s. o.	siehe oben
SOP	<i>standardized operating protocoll</i>
SSC	<i>side scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zellrezeptor
TGF-β	<i>transforming growth factor beta</i>

TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRAIL	<i>tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand</i>
T-Zellen	thymusabhängige Lymphozyten, T-Lymphozyten
u. a.	unter anderem
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UV	ultraviolett
V	Volt
v. a.	vor allem
vs.	versus
w	weiblich
x	Malzeichen
z. B.	zum Beispiel

II. Abbildungsverzeichnis

Abb.-Nr.	Titel	Seite
Abb. 2.1:	Phasenverteilung der Blutbestandteile nach Dichtegradientenzentrifugation.	34
Abb. 2.2:	Schematisierter Ablauf der MACS-Zellseparation. Modifiziert nach: Natural Killer Cells, Cell Separation - Antibodies - Molecular analysis; 130 092 823.02, Miltenyi Biotech GmbH, 2007. (http://www.miltenyibiotec.com/download/poster/978/Scientific_Poster_NKcells.pdf)	36
Abb. 2.3 (a-e):	Dotplots von Beispieldurchflußzytometrien.	39
Abb. 2.4:	Gelelektrophorese der T- und NK-Zellproben.	42
Abb. 2.5:	Schema der Gesamt-RNA-Präparation zur Chipanalyse als One-Cycle Target Labeling. Modifiziert nach: GeneChip® Expression Analysis Technical Manual; 701021 Rev. 5, Affymetrix, Inc., 1999 – 2004. (www.affymetrix.com/support/downloads/manuals/expression_analysis_manual.pdf)	47
Abb. 2.6:	Schematischer Aufbau eines GeneChips. Aus: GeneChip Essentials - How Affymetrix GeneChip® DNA Microarrays Work Features and Probes; Affymetrix, Inc., 2008. (http://www.genechip.com/corporate/media/genechip_essentials/genotyping/Features_and_Probes.affx)	48
Abb. 2.7:	Schematischer Aufbau eines GeneChip-Spots („Probe Cell“) nach erfolgter Hybridisierung. Aus: GeneChip Essentials - How Affymetrix GeneChip® DNA Microarrays Work A Genotype is Determined; Affymetrix, Inc., 2008. (http://www.genechip.com/corporate/media/genechip_essentials/genotyping/A_Genotype_is_Determined.affx)	49
Abb. 2.8:	Schematischer Aufbau eines Probesets. Aus: GeneChip® Expression Analysis Data Analysis Fundamentals, Part No. 701190 Rev 1, Affymetrix, Inc., 2002 (www.affymetrix.com/support/downloads/manuals/data_analysis_fundamentals_manual.pdf)	50
Abb. 2.9:	Studiendesign.	53
Abb. 3.1:	Verteilung der Tumorlokalisationen.	56

Abb. 3.2 (a-c):	Verteilung der Tumorstadien (TNM).	57
Abb. 3.3:	Verteilung der UICC-Tumorstadien.	58
Abb. 3.4:	Histologische Einteilung der Tumoren.	59
Abb. 3.5:	Verteilung der histopathologischen Tumordifferenzierung („Grading“).	60
Abb. 3.6:	Verteilung der Therapiearten.	61
Abb. 3.7:	Verteilung der rezidivfreien Zeit (Zeit nach Therapieabschluß).	62
Abb. 3.8:	NK-Zellanteil an PBMC nach klinischen Gruppen.	63
Abb. 3.9:	T-Zellanteil an PBMC nach klinischen Gruppen.	63
Abb. 3.10:	Streudiagramm der Korrelation NK-Zellanteil – Alter.	66
Abb. 3.11:	Differenziell exprimierte Gene des Gruppenvergleichs „Therapiert vs. Krank“ nach funktioneller Interpretation (GO biological process).	68
Abb. 3.12:	Differenziell exprimierte Gene des Gruppenvergleichs „Krank vs. Gesund“ nach funktioneller Interpretation (GO biological process).	70
Abb. 3.13:	Differenziell exprimierte Gene des Gruppenvergleichs „Therapiert vs. Gesund“ nach funktioneller Interpretation (GO biological process).	74

III. Tabellenverzeichnis

Tab.-Nr.	Titel	Seite
Tab. 2.1:	Antikörperspezifizierung der MACS-Zellseparation.	35
Tab. 2.2:	Antikörperspezifizierung der FACS-Immunphänotypisierung.	37
Tab. 2.3:	Antikörperspezifizierung der FACS-Negativkontrolle.	37
Tab. 3.1:	Geschlechts- und Altersverteilung der Probanden.	55
Tab. 3.2:	Rangkorrelationsvergleich des NK-Zellanteils an PBMC und klinischen Parametern.	65
Tab. 3.3:	Differenziell exprimierte Gene des Gruppenvergleichs „Therapiert vs. Krank“, Change Call: Decrease.	68
Tab. 3.4:	Differenziell exprimierte Gene des Gruppenvergleichs „Therapiert vs. Krank“, Change Call: Increase.	69
Tab. 3.5:	Differenziell exprimierte Gene des Gruppenvergleichs „Gesund vs. Krank“, Change Call: Decrease.	70
Tab. 3.6:	Differenziell exprimierte Gene des Gruppenvergleichs „Gesund vs. Krank“, Change Call: Increase.	71
Tab. 3.7:	Differenziell exprimierte Gene des Gruppenvergleichs „Therapiert vs. Gesund“, Change Call: Decrease.	75
Tab. 3.8:	Differenziell exprimierte Gene des Gruppenvergleichs „Therapiert vs. Gesund“, Change Call: Increase.	76
Tab. 3.9:	Differenziell exprimierte Gene in mehr als einem Gruppenvergleich, Change Call: Decrease und Increase.	78
Tab. 7.1:	Probandenübersicht der Genchipanalyse.	109

IV. Herstellerverzeichnis

Unternehmen	Unternehmenssitz
Acer	Taipeh, Taiwan
Affymetrix	Santa Clara, CA, USA
Ambion	Austin, TX, USA
Amersham Bioscience	Buckinghamshire, England
Ampri	Stelle, Deutschland
Apple	Cupertino, CA, USA
ATCC	Manassas, VA, USA
Becton Dickinson	San Jose, CA, USA
Bio-Rad	München, Deutschland
BioWhittaker	Walkersville, MD, USA
Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Carl Zeiss	Jena, Deutschland
Coleman Technologies	Orlando, FL, USA
Drummond	Broomall, PA, USA
Enzo Biochem	New York, NY, USA
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Heidolph Instruments	Schwabach, Deutschland
Heraeus Sepatech	Osterode/Harz, Deutschland
Hettich Zentrifugen	Tuttlingen, Deutschland
Hewlett-Packard, HP	Palo Alto, CA, USA
Invitrogen, Gibco	Karlsruhe, Deutschland
Janke & Kunkel, IKA	Staufen, Deutschland
Karl Hecht	Sondheim, Deutschland
Labsystems	Helsinki, Finnland
Liebherr	Ochsenhausen, Deutschland
Marienzfeld	Lauda-Königshofen, Deutschland
MBI Fermentas	St. Leon-Rot, Deutschland
Microsoft	Redmond, WA, USA
Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland

Molecular BioProducts	San Diego, CA, USA
Molecular Probes	Eugene, OR, USA
MWG Biotech	Ebersberg, Deutschland
Nalgene	Rochester, NY, USA
NanoDrop Technologies	Wilmington, DE, USA
Pierce	Rockford, IL, USA
Promega	Madison, WI, USA
Qiagen	Hilden, Deutschland
Sanyo	München, Deutschland
Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Scaltec Instruments	Göttingen, Deutschland
Schott	Mainz, Deutschland
Severin	Sundern, Deutschland
Sigma-Aldrich	Seelze, Deutschland
Sony	Berlin, Deutschland
SPSS	Chicago, IL, USA
Stratagene	La Jolla, CA, USA
Thomson	Toronto, Kanada
VEB MLW Prüfgeräte	Freital, ehem. DDR
Vector Laboratories	Burlingame, CA, USA
VWR	Darmstadt, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Waldner	Wangen, Deutschland
Zentralapotheke Universität Rostock	Rostock, Deutschland

1. Einleitung

1.1 Kopf-Hals-Karzinome

1.1.1 Allgemeines

Krebserkrankungen waren nach Krankheiten des Kreislaufsystems (43,4 %) mit 25,6 % die zweithäufigste Todesursache in Deutschland 2007 (Statistisches Bundesamt 2008). Die Inzidenz in Deutschland beträgt nach Schätzungen des Robert Koch-Institutes (RKI) ca. 230500 Neuerkrankungen pro Jahr bei Männern und ca. 206000 bei Frauen (RKI 2008). Das mittlere Erkrankungsalter für Krebsleiden liegt dabei für Männer und Frauen bei ungefähr 69 Jahren (RKI 2008). Kopf-Hals-Karzinome machen ca. 3,2 % aller malignen Neuerkrankungen aus (RKI 2008) und sind histologisch zu über 85 % Plattenepithelkarzinome (Lang et al. 2002). Im HNO-Bereich ist das Larynxkarzinom mit 1,3 % Anteil aller bösartigen Neuerkrankungen bei Männern und 0,2 % Anteil bei Frauen häufigster Manifestationsort eines Krebsleidens (RKI 2008). Die prozentuale Verteilung der Lokalisationen von Kopf-Hals-Karzinomen unterliegt geographischen Variationen, was u. a. auf den Einfluß von Umweltfaktoren schließen lässt (Parkin et al. 2002).

Tabakrauch ist einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen (Talamini et al. 2002). Von den im Rauch enthaltenen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, N-Nitrosoverbindungen und aromatischen Aminen ist die karzinogene Wirkung bekannt (Ding et al. 2007; Hoffmann et al. 1994; Turesky 2004). Die Belastung von mehr als 30 Pack Years (py) erhöht den Faktor für das Risiko an einem Kopf-Hals-Karzinom zu erkranken um 4,8, eine Belastung von > 60 py sogar um den Faktor 23,4 (Maier et al. 1992). Hochprozentiger Alkohol, vor allem in Kombination mit Tabakkonsum, gilt bei der Karzinogenese als wichtiger Faktor (Gronbaek et al. 1998) (Perkins et al. 2001). Weitere exogene Noxen wie Zement, Teer, Ruß, Lösungsmittel, Lacke und Nickel besitzen mutagene Potenz und erhöhen das Risiko an einem malignen Kopf-Hals-Tumor zu erkranken (Desoize 2003; Maier et al. 1999a; Maier et al. 1999b; Maier et al. 1997). Neben den oben genannten gewerblichen Noxen ist unter anderem die Asbestexposition nachgewiesenermaßen ursächlich für die Entstehung von Larynxkarzinomen und als Berufskrankheit (BK 4104) anerkannt (Gustavsson et al. 1998). Ebenso stellt das sinu-nasale Adenokarzinom eine Berufskrankheit (BK 4203) in der verarbeitenden Holzindustrie da. Ursächlich für die Entstehung ist die Exposition gegenüber

Hartholzstäuben von z. B. Buche und Eiche (Pesch et al. 2008). Schlechte Mundhygiene und Zahnpflege sind ebenfalls von einem erhöhten Risiko begleitet, an einem Malignom der Mundhöhle zu erkranken (Rosenquist et al. 2005). Infektionen mit dem Humanen Papillomavirus (HPV16) stehen aktuell im Fokus wissenschaftlichen Interesses und gelten als eigenständiger Risikofaktor für die Entstehung des Oropharynxkarzinoms (D'Souza et al. 2007). Eine besondere Rolle in der Genese von Kopf-Hals-Karzinomen wird der HPV16-Infektion bei Nie-Rauchern und Nie-Trinkern zugeschrieben (Dahlstrom et al. 2003).

Zur Entstehung von Krebs existieren diverse Theorien und Modellvorstellungen. Duesberg et al. formulierten in ihrer Multisteptheorie, dass die Karzinogenese durch spontane oder durch Karzinogene induzierte Aneuploidie der Zellen eingeleitet wird. Die resultierende Instabilität des Karyotyps bewirkt in einer Kettenreaktion das Aufkommen weiterer abnormer eventuell Krebs-spezifischer Chromosomenkombinationen (Duesberg et al. 2003).

Klinisch machen sich präkanzeröse Zellveränderungen als Leukoplakie, Erythroplakie, Erythroleukoplakie oder Pachydermie (z. B. bei chronisch hyperplastischer Laryngitis bemerkbar) (Barnes et al. 2005; Kramer et al. 1978; Neville et al. 2002; Shafer et al. 1975). Histologisch handelt es sich um einen fließenden teils reversiblen Übergang von normalem Epithel, hyperplastischen und hyperkeratotischen Veränderungen bis hin zur Dysplasie von unterschiedlichen Schweregraden (Barnes et al. 2005). Als irreversible Entartungsstufe geht ein unbehandeltes Carcinoma in situ bei Überschreitung der Basalmembran in ein invasives Karzinom über (Barnes et al. 2005; Plch et al. 1998).

Das simultane oder metachrone Auftreten eines Zweitkarzinoms des oberen Aerodigestivtraktes wird als Feldkanzerisierung bezeichnet (Slaughter et al. 1953). Das Risiko an einem Zweitkarzinom zu erkranken liegt bei 5 – 14 % (Scherubl et al. 2008). Dieses Phänomen lag in einer Studie in bis zu 19 % der Fälle von Patienten mit erstmaligem Kopf-Hals-Karzinom vor und wird mit dem Umstand begründet, dass exogene Noxen (v. a. Tabakrauch und Alkohol) auf die gesamte Schleimhaut der oberen Speise- und Atemwege einwirken (Schwartz et al. 1994).

Die Klassifizierung der Tumore erfolgt nach deren Lokalisation, histologischen Typ und Differenzierungsgrad sowie in Abhängigkeit von Tumorausdehnung, regionärem Lymphknotenbefall und Fernmetastasierung (TNM-System) und können nach der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) in verschiedene klinische Stadien eingeteilt werden (Barnes et al. 2005; Wittekind et al. 2002).

Die aktuelle Diagnostik von Kopf-Hals-Tumoren bzw. Rezidiven beruht hauptsächlich auf endoskopischen Verfahren mit Probeexzisionen (z. B. im Rahmen von Panendoskopien zum

Ausschluß eines Zweitkarzinoms) oder auch Feinnadelbiopsien mit anschließender histopathologischer Befundung. Zur exakten Stadieneinteilung einer malignen Erkrankung bedient man sich beim sogenannten Staging verschiedener bildgebender Verfahren wie Sonographie, Computertomographie, Magnetresonanztomographie, Skelettszintigraphie oder auch der PET-CT. Optimierte Verfahren zur Visualisierung wie Chromoendoskopie, Optische Kohärenztomographie und Konfokale Endomikroskopie sind derzeit in Erprobung (Gerstner 2008).

Die großen Pfeiler der Therapie maligner Kopf-Hals-Tumore bilden die chirurgische Resektion, adjuvante bzw. neoadjuvante Strahlentherapie sowie die Chemotherapie. Diese Verfahren können sowohl einzeln als auch in Kombination (z. B. als definitive Radiochemotherapie oder Induktionschemotherapie) unter kurativem oder palliativem Ansatz zur Anwendung kommen (Seiwert et al. 2005). Die Wahl der Therapieform erfolgt hierbei Tumor- und Patientenspezifisch.

An immunotherapeutischen Verfahren sind beim fortgeschrittenen HNSCC der monoklonale Antikörper (Typ IgG1) Cetuximab gegen den Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR etabliert (Mehra et al. 2008). Weitere vielversprechende passive und aktive immuntherapeutische Ansätze unterliegen derzeit verstärkter Erprobung (Agada et al. 2009; Lohr et al. 2005).

Trotz intensiver onkologischer Forschung, individuell abgestimmter Therapieschemata und Einzug immunologischer Methoden in der Diagnostik und Therapie hat sich die Prognose der Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen in den letzten 30 Jahren nur unwesentlich verändert. So lag die relative 5-Jahres-Überlebensrate in einer Studie mit Beobachtungszeitraum von 1995 bis 1999 von HNSCC-Patienten in Europa bei 40 %, 49 % und 63 % mit Lokalisation in Pharynx, Mundhöhle und Larynx (Ferlay et al. 2004). Die Zwei-Jahresrate bis zum Aufkommen eines lokoregionären Rezidivs bei fortgeschrittenen HNSCC lag in Abhängigkeit von der Therapieform bei bis zu 93 % (Michiels et al. 2009). Diese schwachen Prognosedaten verdeutlichen einmal mehr die dringende Notwendigkeit der Erforschung onkologischer Grundlagen sowie alternativer Therapiestrategien der Kopf-Hals-Karzinome.

1.1.2 Rolle des Immunsystems

Krebszellen können vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden, was als „immunological surveillance“ bezeichnet wird (Burnet 1970). Die Fähigkeit zur Abtötung

von maligne transformierten Zellen ist u. a. von T-Lymphozyten (Sorensen et al. 2008) und NK-Zellen (Takasugi et al. 1973) bekannt.

Patienten mit fortgeschrittenen Tumorstadien leiden an einer verminderten Immunfunktion. Dies äußert sich u. a. in verminderter Anzahl von T-, B-, NK- und NKT-Zellen bei Tumorpatienten (Bose et al. 2008; Molling et al. 2005). Ebenso wurden erniedrigte Zytotoxizität peripher mononukleärer Zellen (PBMC) bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen sowie eine verminderte Produktion von Zytokinen wie TNF- α , IFN- γ und IL-10, -4 und -12 festgestellt (Bose et al. 2008). Es konnte bei diesen Patienten eine verminderte Expression von zytotoxischen Molekülen wie Granzym B, Perforin und FasL in PBMC nachgewiesen werden (Bose et al. 2008).

Um sich der Tumorüberwachung des Immunsystems zu entziehen, besitzen Krebszellen diverse Strategien („tumor immune escape mechanisms“), die in jüngerer Zeit aufgedeckt wurden (Lang et al. 2002). Hierzu gehören u. a. die Veränderung der Antigenpräsentation (z. B. MHC-I-Reduktion) (Hicklin et al. 1999), die Sekretion immunsuppressiver Faktoren wie IL-10 oder TGF- β (Gorsch et al. 1992; Pisa et al. 1992), die FasL-Exprimierung („tumor counterattack“) (Igney et al. 2005; Seino et al. 1997) und die Bildung von Exosomen und Mikrovesikeln, welche T-Zell-Apoptose induzierende Faktoren wie TRAIL und FasL beinhalten (Huber et al. 2005). Ebenso wurden Zellfusionen von Krebszellen mit gesunden Zellen beschrieben, um sich der „immunological surveillance“ zu entziehen (Friedl 2005; Vignery 2005).

Ein erniedrigter Anteil von IFN- γ sezernierenden NKT-Zellen bei Tumorpatienten wird als Risikofaktor für Tumorprogress durch Minderung der Tumorüberwachung des Immunsystems gedeutet (Molling et al. 2005). Eine erhöhte intratumorale B- und T-Zellinfiltration korreliert mit der Gesamtüberlebenszeit verbessert die Prognose bei Tumorpatienten (Leffers et al. 2008; van Herpen et al. 2008). Ostwald et al. entdeckten eine signifikant erhöhte absolute Zellzahl sowie prozentualen Anteil von NK-Zellen an PBMC bei erfolgreich therapierten rezidivfreien Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen im Vergleich zu Nichttherapierten und Rezidivpatienten (Ostwald et al. 2004).

1.2 Natürliche Killerzellen

1.2.1 Definition

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind Bestandteil des unspezifischen angeborenen Immunsystems (Biron et al. 1999). Es handelt sich um eine heterogene Lymphozytenpopulation die aufgrund ihrer Morphologie auch als groß granulierte Lymphozyten bezeichnet werden (Timonen et al. 1981). Sie sind befähigt, Zellen ohne vorherige Sensibilisierung oder Aktivierung zu lysieren (Robertson et al. 1990). Diese Eigenschaft brachte ihnen die Bezeichnung „natürliche Killerzellen“ ein (Kiessling et al. 1975; Takasugi et al. 1973). Sie werden phänotypisch anhand ihrer Oberflächenproteine charakterisiert, die nach der internationalen CD-Nomenklatur für Differenzierungsantigene benannt werden. Es handelt sich um zytotoxische Zellen, die weder einen CD3-Komplex noch eine T-Zell-Rezeptor-Kette an ihrer Oberfläche exprimieren, die auf den meisten Zelloberflächen CD16 und CD56 darstellen und zytolytische Reaktionen an virusinfizierten oder maligne transformierten Zielzellen in Abwesenheit von MHC-I oder MHC-II vermitteln (Lichtman et al. 2007; Phillips et al. 1992; Robertson & Ritz 1990).

1.2.2 Entwicklung und Verteilung

NK-Zellen entstammen beim erwachsenen Menschen primär dem Knochenmark und haben eine Lebensdauer von einigen Tagen bis Wochen (Cichocki et al. 2009; Colucci et al. 2003) (Hochman et al. 1978). Einige NK-Zellen scheinen ihren Ursprung im Thymus zu haben, da eine Differenzierung aus Thymuszellvorstufen nachgewiesen wurde (Sanchez et al. 1994) (Barcena et al. 1994; Plum et al. 1999). NK-Zellen besitzen den gleichen lymphoiden Vorläufer wie T- und B-Lymphozyten (Liu et al. 2000; Williams et al. 1998). Ursprung der NK-Zellreifung ist eine CD34+ hämatopoetische Stammzelle, die unter Ligandeneinfluß von z. B. c-Kit und Flt-3 eine lymphatische Vorstufe bildet (Colucci et al. 2003; Williams et al. 1998). Als einer der frühesten Oberflächenmarker während der medullären NK-Zellentwicklung ist CD122 (β -Untereinheit des Rezeptors für IL-2 und IL-15 = IL2R β) nachweisbar, was die wichtige Rolle von IL-15 in der Reifung der NK-Zellen verdeutlicht (Liu et al. 2000; Mrozek et al. 1996; Williams et al. 1998). Diese Zellen werden als „NK-Progenitors“ (NK-Vorläufer) bezeichnet (Lichtman MA 2007). In der weiteren Entwicklung

werden zusätzlich CD161 und CD2 exprimiert und die Zellen „immature NK“ (unreife NK-Zellen) genannt (Bennett et al. 1996; Colucci et al. 2003). Der nächste Schritt der Reifung wird vom Erwerb von CD56 und CD94 sowie dem Auftreten zytoplasmatischer Granula, die primären Lysosomen entspricht, geprägt (Jaleco et al. 2001; Sivori et al. 2002; Young et al. 1987a; Yu et al. 2002). Diese Stufe wird auch als „immature lytic NK“ (unreife lytische NK-Zelle) bezeichnet. Reife NK-Zellen, sogenannte „mature NK“, zeichnen sich durch Expression von „killer cell immunoglobulin-like receptors“ (KIR) auf ihrer Oberfläche aus (Lichtman et al. 2007).

Die Entwicklung reifer NK-Zellen im Knochenmark ist IL-15 abhängig (Colucci et al. 2003; Fehniger et al. 2001; Williams et al. 1998). Patienten mit schwerem kombinierten Immundefizienzsyndrom bei Mutation der γ_c -Untereinheit des IL-15-Rezeptorkomplexes oder der JAK-3 Tyrosinkinase entwickeln keine NK-Zellen (Puel et al. 1998). Bei IL-15 oder IL-15 Rezeptor defizienten Mäusen bilden sich keine NK-Zellen, was insgesamt die Schlüsselrolle dieses Interleukins aufzeigt (Williams et al. 1998). In vitro konnte u. a. die Steigerung der NK-Zellentwicklung durch IL-1 α , IL-2, IL-6, IL-7, FL (Flt-3 Ligand), Stem cell factor und GM-CSF nachgewiesen werden (Cichocki et al. 2009; Jaleco et al. 2001; Marquez et al. 1998; Mrozek et al. 1996; Sanchez et al. 1994; Shibuya et al. 1995; Silva et al. 1994; Vossen et al. 2008; Yu et al. 2002).

NK-Zellen bilden ca. 14 % der Lymphozyten im peripheren Blutbild, kommen jedoch auch im roten Knochenmark, der Milz und in geringer Anzahl in anderen lymphatischen Organen vor (BD Biosciences 2000; Bisset et al. 2004; Perussia et al. 1983; Trinchieri 1989). Wenige NK-Zellen wurden auch in der Leber, der Lunge, der intestinalen Mukosa sowie in der frühen Dezidua nachgewiesen (Bouwens et al. 1992; Moffett-King 2002; Weissler et al. 1987). Die Zahl der in der Peripherie zirkulierenden NK-Zellen unterliegt einer ausgeprägten Tagesrhythmik mit interindividuellen Unterschieden (Bourin et al. 1993). Ostwald et al. entdeckten signifikante Unterschiede in absoluter NK-Zellzahl und in relativem Anteil an peripher mononukleären Zellen (PBMC) in Abhängigkeit vom klinischen Status bei HNO-Tumorpatienten (Ostwald et al. 2004).

1.2.3 Subpopulationen

Es werden zwei Subpopulationen von reifen NK-Zellen unterschieden. Zellen mit geringer Dichte an CD56, im Vergleich jedoch hohen Dichte an CD16 auf ihrer Oberfläche werden

als „CD16⁺ CD56^{dim}“ bezeichnet und machen ca. 90 – 95% aller reifen NK-Zellen aus. Sie zeichnen sich durch geringe Produktion an Zytokinen, hoher Zytotoxizität und ihr hauptsächlich peripheres Auftreten aus. Im Kontrast dazu haben „CD16⁻ CD56^{bright}“ NK-Zellen eine hohe Dichte an CD56 und geringe Dichte an CD16 auf ihrer Zellmembran exprimiert. Für diese Zellen, die ca. 5 – 10 % der reifen NK-Zellen bilden, ist eine hohe Produktion von IFN- γ und Zytokinen, geringe Zytotoxizität und vornehmliches Auftreten in Lymphknoten und Tonsillen charakteristisch (Colucci et al. 2003; Colucci et al. 2002; Fehniger et al. 2003; Ferlazzo et al. 2004).

1.2.4 Funktion

Natürliche Killerzellen sind zur Abtötung diverser Zielzellen (z. B. aus Tumoren gewonnene Zelllinien und virusinfizierte Zellen) ohne vorherige Sensibilisierung befähigt (Takasugi et al. 1973; Trinchieri 1989). Die NK-Zellaktivität ist funktionell als Fähigkeit definiert, *in vitro* Tumor- und virusinfizierte Zellen abzutöten (Herberman et al. 1979; Herberman et al. 1978; Herberman et al. 1981; Ortaldo et al. 1984; Trinchieri et al. 1984).

Die antivirale Aktivität konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* am Tiermodell nachgewiesen werden und erfolgt zumindest teilweise in Abhängigkeit des NK-Zellaktivators TNF- α (Bandyopadhyay et al. 1986; Bukowski et al. 1983; Fitzgerald et al. 1985; Santoli et al. 1978; Welsh et al. 1986). Akute Virusinfektionen gehen *in vivo* sowohl systemisch als auch lokal mit NK-Zellaktivierung und erhöhter Zellzahl mit Maximum am 2. bis 3. Tag einher (Biron et al. 1983). Bei einem Patienten mit selektivem NK-Zelldefekt konnten rezidivierende Herpesvirusinfektionen nachgewiesen werden (Biron et al. 1989). NK-Zellen von bestimmten resistenten Mäuserassen erkennen das m157-Protein des murinen Zytomegalievirus (CMV) über DAP12-vermittelte Aktivierung des Ly49H-Rezeptors (KIR-Analogon des Menschen, s. u.) und antworten durch Sekretion von Interferon- γ (IFN- γ) und Abtöten der virusinfizierten Zelle (Arase et al. 2002; Smith et al. 2002). Die frühe NK-Zellantwort induziert die Reduzierung der Viruslast bestimmter Viren, u. a. murines CMV, im Tiermodell (Arase et al. 2002; Welsh et al. 1986). Ebenso sind NK-Zellen zur direkten Lyse von Bakterien, Protozoen und Pilzen befähigt, was *in vitro* nachgewiesen wurde (Garcia-Penarrubia et al. 1989; Haas et al. 2001; Hatcher et al. 1982; Hidore et al. 1989). Zudem erhöhen sie die Reaktion von Phagozyten vor allem auf intrazelluläre Bakterien und Parasiten durch Produktion von stimulierenden Zytokinen wie IFN- γ und GM-CSF. Dies

erfolgt entweder als direkte Antwort auf die Mikroorganismen oder durch Stimulierung über Faktoren, die von infizierten Phagozyten selbst ausgeschüttet werden (z.B. IL-12, TNF- α) (Bancroft et al. 1991; Gazzinelli et al. 1993).

Der Nachweis, dass NK-Zellen *in vitro* transformierte Zellen lysieren können (Takasugi et al. 1973; Trinchieri 1989) unterstützt die Theorie, dass sie neu aufkommende maligne Tumorzellen erkennen und abtöten können („immunological surveillance“) (Bloom 1982), was *in vivo* bestätigt wurde (Smyth et al. 2002). Tierexperimentell wurde eine Aktivität gegen Tumore in Hinsicht auf Langzeittumorwachstum, Metastasierung und Kurzzeiteliminierung radiomarkierter Tumorzellen *in vivo* nachgewiesen (Trinchieri 1989). Eine erhöhte NK-Zellaktivität korreliert scheinbar mit verlängerter Überlebenszeit und längeren Intervallen vor Metastasierung bei Tumorpatienten, wenngleich bislang keine signifikante Statistik den direkten Zusammenhang zwischen verminderter Tumorinzidenz und hoher NK-Zellaktivität belegt (Brittenden et al. 1996; Pross 1986). Jedoch sind Patienten mit mangelhafter NK-Zellaktivität anfälliger für maligne Entartungen (Hersey et al. 1979; Kadish et al. 1981; Strayer et al. 1984; Sullivan et al. 1980). Hierbei ist auch zu bedenken, dass gerade Erkrankungen wie AIDS oder Krebs mit einer NK-Zellzahl- und Aktivitätsminderung einhergehen (Chehimi et al. 1992; Pross 1986).

Eine weitere wichtige Funktion von NK-Zellen stellt die Regulation der adaptiven Immunität und Hämatopoese dar. Sie besitzen sowohl aktivierende als auch inhibierende Effekte auf antigenpräsentierende Zellen, B- und T-Lymphozyten (Trinchieri 1989). Sie stimulieren durch IFN- γ -Produktion *in vivo* und *in vitro* T-Zell-unabhängig die antigenspezifische B-Lymphozyten-Reaktion und sind für die Induktion der optimalen Antwort von T-Lymphozyten auf bestimmte Infektionen notwendig (Dowdell et al. 2003; Mond et al. 1987; Vankayalapati et al. 2004; Yuan et al. 1994). Die gegenseitige Interaktion zwischen NK-Zellen und antigenpräsentierenden dendritischen Zellen ist für die angeborene Resistenz und nachfolgende adaptive Immunantwort auf Pathogene wichtig (Gerosa et al. 2002; Moretta 2002). Durch Produktion von die Hämatopoese aktivierenden (z. B. GM-CSF, M-CSF, IL-3) und inhibierenden Faktoren (z. B. TNF, IFN- γ) nehmen NK-Zellen an deren Regulierung teil (Cuturi et al. 1989; Murphy et al. 1992).

NK-Zellen unterliegen hinsichtlich ihrer Zytotoxizität gegenüber Targetzellen im Gegensatz zu T-Lymphozyten keiner MHC-Restriktion (Storkus et al. 1987). Sie sind in der Lage, Zellen ohne autologe MHC-Klasse-I-Moleküle zu erkennen und deren Zytolyse zu initiieren (Karre 1993; Ljunggren et al. 1990). Nur Zellen mit auf der Zelloberfläche exprimierten körpereigenen MHC-I-Molekülen werden als „selbst“ erkannt und über inhibitorische

Rezeptoren der NK-Zellen vor Zytolyse bewahrt („missing-self“-Hypothese) (Karre 1995). Viele Viren inhibieren die Synthese bzw. den Transport von MHC-I-Molekülen (Ploegh 1998). Ebenso wurde nachgewiesen, dass Tumorzellen häufig eine verminderte MHC-I-Expression aufweisen (Garcia-Lora et al. 2003). Der aktivierende NK-Rezeptor NKG2D ist auf allen NK-Zellen vertreten und erkennt MHC-I-gekoppelte Glykoproteine, die auf transformierten oder virusinfizierten Targetzellen hochreguliert, auf gesunden Zellen jedoch in ihrer Expression vermindert sind (Cerwenka et al. 2003; Lang et al. 2002).

Die zytotoxische Funktion der NK-Zellen hängt von der Bindung an Targetzellen ab und ist von der Aktivierung lytischer Mechanismen gefolgt (Young & Cohn 1987a). Es sind im Wesentlichen die zwei im Folgenden beschriebenen Mechanismen verantwortlich.

1.2.4.1 Natürliche Zytotoxizität

Humane NK-Zellen erkennen entsprechend der „missing self“-Hypothese MHC-I-Moleküle von Targetzellen über zwei verschiedene Rezeptorsuperfamilien. Die „killer cell Ig-like receptors“ (KIR), welche an HLA-A, -B und -C binden sowie die „C-type lectin superfamily“ (NKG2 mit CD94-Untereinheit), die an HLA-E binden (Braud et al. 1998; Moretta et al. 2001b; Phillips et al. 1992; Waters et al. 2006).

KIR und CD94/NKG2-Rezeptoren besitzen eine „immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif“ (ITIM) Sequenz an ihrer zytoplasmatischen Domäne, welche nach Ligandenaktivierung an die Tyrosinphosphatase SHP-1 bindet und dadurch eine Reduktion der Zytotoxizität und Zytokinproduktion bewirkt (Waters et al. 2006).

Perforin/Granzym Mechanismus

Bei Erkennen von Targetzellen mit herunterregulierten MHC-I-Molekülen oder irregulärem MHC bleibt die Aktivierung inhibitorischer Rezeptoren aus und die NK-Zellen werden aktiviert (Brodin et al. 2009). Nach Bindung der Zellen kommt es zu einem Ca^{2+} -Einstrom und zur Konzentration der lysosomalen Granula der NK-Zelle am Bindungsbereich. Es wird Perforin, ein zytolytisches C9-strukturhomologes Protein exozytotisch freigesetzt, was zur Bildung von zylindrischen polymeren Poren in der Targetzellmembran führt. Dadurch kommt es zum Wassereinstrom, Membranpotentialverlust und somit zur Zerstörung der Zelle (Joag et al. 1989; Mehrle et al. 2008; Young et al. 1987b). Zusätzlich werden Apoptose

induzierende Granzyme und toxische NK-Zell-Faktoren (z. B. TNF- α) in die Targetzelle geschleust (Criado et al. 1985; Dealtry et al. 1987; Litwin et al. 1994).

Weitere Mechanismen der Zytotoxizität

Über exprimiertes Fas (CD95) bindet der Fas-Ligand (Fas-L) der NK-Zelle an die Zielzelle und induziert die Bildung eines „death inducing signal complex“ (DISC), welcher über Caspasen die Apoptose der Targetzelle verursacht (Kischkel et al. 1995; Shresta et al. 1998). Ebenso kann es auch über den „tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand“ (TRAIL) und entsprechenden Rezeptor TRAIL-R der Targetzelle zum Zelluntergang kommen (Mirandola et al. 2004; Young & Cohn 1987a).

1.2.4.2 Antikörper abhängige Zytotoxizität, ADCC

Neben der natürlichen Zytotoxizität verfügen NK-Zellen über einen Mechanismus antikörperabhängig Zellen zu lysieren auch wenn diese zuvor nicht als Target erkannt wurden. Voraussetzung ist die vorherige Antikörperopsonierung der Zielzelle.

Die initiale Interaktion erfolgt zumeist über das Integrin LFA-1 (CD11a/CD18) der NK-Zelle und Adhäsionsmolekülen auf der Targetzelle (Phillips et al. 1992). Die Einleitung der Zytolyse geschieht u. a. über den Kontakt des Fc-Fragments IgG-opsonierter Targetzellen mit dem niedrigaffinen Rezeptor Fc γ IIIa (CD16) der NK-Zellen, welcher mit der signaltransduzierenden Fc ϵ RI γ -Kette und CD3 ξ assoziiert ist und ebenfalls eine ITAM-Untereinheit besitzt und über die „mitogen-activated protein kinase“ (MAPK) die Zellaktivierung bewirkt (Leibson 1997; Perussia et al. 2000; Sulica et al. 2001).

1.2.5 Killerzell-aktivierende Rezeptoren, KAR

Einige KIR und CD94/NKG2-Rezeptoren haben keine ITIM-Sequenz und wirken daher eher aktivierend (Waters et al. 2006). Diese speziellen Rezeptoren sind mit dem homodimeren Adapterprotein DAP12 assoziiert (Phillips et al. 1992). DAP 12 besitzt an seiner zytoplasmatischen Domäne ein „immunoreceptor tyrosine-based activation motif, (ITAM) und wird nach Ligandenbindung tyrosinphosphoryliert, rekrutiert die Tyrosinkinasen ZAP70 und Syk und induziert somit die NK-Zellaktivierung (Phillips et al. 1992).

„Natural cytotoxicity receptors“ (NKp30, NKp44, NKp46) mit bislang unbekanntem Liganden sowie CD16 werden ebenfalls zu den aktivierenden Rezeptoren gezählt (Moretta et al. 2001a; Phillips et al. 1992). Die ITAM-Kopplung erfolgt über die Adapterproteine DAP12, CD3 ξ und Fc ϵ RI γ (Phillips et al. 1992; Wu et al. 2000). Der CD94/NKG2D-Rezeptor ist mit DAP10 assoziiert, was keine ITAM-Untereinheit besitzt und daher auf einem Alternativweg über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) zur NK-Zellaktivierung führt (Houchins et al. 1991; Songyang et al. 1993).

1.3 Zielstellung

Immunologische Methoden sind heute ein wichtiger Eckpfeiler der Tumordiagnostik und -therapie. Vor dem Hintergrund des Potenzials von NK-Zellen, Tumorzellen abtöten zu können, könnte die genaue Kenntnis von NK-Zellzahl bzw. -aktivität regulierenden Mechanismen große klinische Relevanz besitzen. Ausgangspunkt für diese Arbeit waren hauseigene frühere Forschungsergebnisse, die signifikante Unterschiede von absolutem und relativem NK-Zellanteil im peripheren Blutbild in Abhängigkeit vom klinischen Status bei Tumorpatienten aufzeigten (Ostwald et al. 2004).

Im Fokus dieser Arbeit steht die Erforschung der Ursachen dieses Phänomens auf genomischer Ebene. Im speziellen galt es folgende Fragestellungen zu untersuchen:

- Sind die vorangegangenen Ergebnisse reproduzierbar?
- Haben andere klinische Faktoren Einfluß auf die NK-Zellzahl?
- Welche NK-Zell-Genprodukte sind im Vergleich verschiedener klinischer Gruppen differenziell exprimiert?
- Welche Gene sind in mehr als einem Gruppenvergleich differenziell exprimiert?
- Können die detektierten Genprodukte nach funktioneller Interpretation für die unterschiedlich hohen NK-Zellzahlen der klinischen Gruppen verantwortlich sein?
- Sind in der Gruppe der rezidivfreien, therapierten Patienten Gene hochreguliert, welche die Zytotoxizität / NK-Zellaktivität erhöhen können?

In der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen einer experimentellen Fall-Kontroll-Studie peripher-venöses Blut von Probanden analysiert und die Ergebnisse einer Funktionsinterpretation in Korrelation zum jeweiligen klinischen Status unterzogen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Abzug mc6	Waldner
Bechergläser 1000 ml	Schott
Deckgläser	Karl Hecht
Elektrophoresekammern	Eigener Bestand
Elektrophoresenetzgerät PowerPac 300	Bio-Rad
Erlenmeyerkolben 250 und 500 ml	Merck
Exsikkator mit Wasserstrahlpumpe	Eigener Bestand
FACSCalibur Flow Cytometer	Becton Dickinson
FACSFlow Supply System	Becton Dickinson
Fluidics Station 400	Affymetrix
Fotodrucker Digital Graphic Printer UP-D860 E	Sony
Geldokumentationsanlage	MWG Biotech
GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0	Affymetrix
GeneChip Scanner 3000	Affymetrix, HP
Hybridization Oven 640	Affymetrix
Kühlschrank Profi Line	Liebherr
Lichtmikroskop Axioskop	Carl Zeiss
Magnetmixer	VEB MLW Prüfgeräte
MidiMACS Separator	Miltenyi Biotec
Mikrowelle Microwave 800	Severin
MiniMACS Separator	Miltenyi Biotec
Neubauer-Zählkammer Improved Bright Light	Marienfeld
PC Notebook Aspire 1690	Acer
PC Procida	Hewlett-Packard
PC Vectra	Hewlett-Packard

Pipette 5 ml	Eppendorf
Pipette 50 – 200 µl	Carl Roth
Pipettiergerät Pipet AIDXP	Drummond
Power MAC G4	Apple
Spektralphotometer ND-1000	NanoDrop Technologies
Tiefkühlschrank Ultra Low	Sanyo
Vortexmischer Reax 2000	Heidolph Instruments
Vortexmischer VF 2	Janke & Kunkel, IKA
Waage SAC 51 200 g x 0,01 g	Scaltec Instruments
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus Sepatech
Zentrifuge Mikro 22R	Hettich Zentrifugen

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Aerosol Resistant Tips 20P + 200	Molecular BioProducts
Collection Tubes 1,5 ml	Affymetrix
Collection Tubes 2 ml	Qiagen
Biosphere Filtertips 1000 µl	Sarstedt
Einmalpipettenspitzen 50 µl	Eppendorf
Einmalpipettenspitzen Finntips 250 µl	Labsystems
MACS LS Separation Columns	Miltenyi Biotec
MACS MS Separation Columns	Miltenyi Biotec
One-Cycle Target Labeling and Control Reagents	Affymetrix
Polystyrol Rörchen 5 ml 12 x 75 mm	Becton Dickinson
PP-Rörchen steril 15 ml	Greiner Bio-One
PP-Rörchen, steril 50 ml	Greiner Bio-One
Reagiergefäß 1,5 ml Easy Cap	Sarstedt
Reagiergefäße Microtubes 1,5 ml 39 x 10,8 mm	Sarstedt
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Rundbodenrörchen 5 ml	Becton Dickinson

Serologische Pipetten 10 ml x 1/10	VWR
S-Monovette 7,5 ml K3E, 1,6 mg EDTA/ml Blut	Sarstedt
S-Monovetten-Kanüle	Sarstedt
Sterilfilter, 0,2 µl	Nalgene
Untersuchungshandschuhe Med-Comfort Vinyl	Ampri

2.1.3 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
70,4 g 2-(N-Morholino)ethansulfonsäure Natriumsalz	Sigma
5fach Second Strand Buffer	Invitrogen, Gibco
Acetyliertes bovines Serumalbumin (BSA)	Gibco
Agarose	Biozym
Albumin, bovine Fraction V	Sigma-Aldrich
Ammoniumacetatlösung	Ambion
Aqua destillata	Eigene Herstellung
β-Mercaptoethanol 14,3 M	Zentralapotheke
B2-Oligo	Sigma
BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit	Enzo Biochem
Borsäure	Zentralapotheke
DNA Ligase von E. Coli (10 units/µl)	Invitrogen, Gibco
DNA Polymerase I von E. Coli (5-10 units/µl)	Invitrogen, Gibco
D-PBS (10x)	Invitrogen, Gibco
DEPC treated water (Nuclease-Free)	Ambion
Dinatriumhydrogenäthylendiamintetraacetat (EDTA)	Zentralapotheke
Dithiothreitol 0,1 M	Zentralapotheke
E. coli DNA Ligase	Invitrogen
E. coli DNA Polymerase	Invitrogen
E. coli RNaseH	Invitrogen
Eisessig	Sigma
Erststrang 5fach Puffer	Invitrogen, Gibco

Ethanol 70, 80 und 96 %	Zentralapotheke
Ethidiumbromidlösung 1 %	Carl Roth
FACSFlow, FACSClean, FACSRinse	Becton Dickinson
Ficoll-Paque Plus	Amersham Bioscience
Glykogenstammlösung	Ambion
Heringsspermien DNA	Promega
KOAc	Sigma
Kontrollspikes	ATCC
Ladepuffer 6x loading dye solution	MBI Fermentas
Längenmarker Φ X174 DNA/BsuRI (HaeIII)	MBI Fermentas
MgOAc	Sigma
NaCl, 5 M, RNase-frei	Ambion
NaH ₂ PO ₄ , 0,2 M	BioWhittaker
Paraformaldehyd	Zentralapotheke
Phenol / chloroform / isoamyl alcohol	Ambion
Phosphate buffered saline tablets	Sigma-Aldrich
RDD DNA digest Buffer	Qiagen
Ribonuklease H (1-4 units/ μ l)	Invitrogen, Gibco
RPE Washbuffer	Qiagen
R-Phycoerythrin Streptavidin	Molecular Probes
RW1 Buffer	Qiagen
RLT Buffer	Qiagen
SuperScript II RNase H Reverse Transcriptase	Invitrogen, Gibco
T4 DNA Polymerase (1-8 units/ μ l)	Invitrogen, Gibco
TRIS-Base	Zentralapotheke
Trizma Base	Sigma
TRIZol Reagent	Invitrogen, Gibco
Tween 20, 10 %	Pierce
Wasser	BioWhittaker

2.1.4 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Antikörperlösung (600 µl):	300 ml 2fach Stain Buffer, 266,4 µl RNase-freies Wasser, 24 µl acetyliertes BSA, 6 µl 10 mg/ml Ziegen IgG in PBS, 3,6 µl 0,5 mg/ml biotinylierter Anti-Streptavidin Antikörper (Ziege)
Färbelösung (600 µl):	300 µl 2fach Stain Buffer, 270 µl RNase-freies Wasser, 24 µl acetyliertes BSA, 6 µl R-Phycoerythrin Streptavidin
Fragmentierungspuffer, 5fach (20 ml):	4 ml 1M Tris acetate, pH 8,1 Eisessig (pH-Einstellung), 640 mg MgOAc, 980 mg KOAc, RNase-freies Wasser
Hybridisierungspuffer, 2fach:	8,3 ml MES Stammlösung, 17,7 ml 5 M NaCl, 4,0 ml 0,5 M EDTA, 0,1 ml 10 % Tween 20, 19,9 ml RNase-freies Wasser
Kontrollspikelösung, 100fach:	BioB 150 pM, BioC 500 pM, BioD 2,5 nM, Cre 10 nM, 5 min auf 65 °C inkubiert
MACS-Pufferlösung (1000 ml):	Aqua dest. 900 ml, D-PBS (10x) 100 ml, Albumin, bovine 0,5 %, EDTA 2 mM (0,75 g/l), (45 min entgast, 4 – 8 °C)
Mastermix Erststrangsynthese (7 µl):	1 µl dNTP Stammlösung (10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP), 2 µl 0,1 M Dithiothreitol, 4 µl Erststrang 5fach Puffer
Mastermix <i>invitro</i> Transkription (40 µl):	22 µl RNase-freies Wasser, 4 µl 10fach HY Reaction Buffer, 4 µl 10fach Biotin Labeled Ribonucleotides, 4 µl 10fach DTT,

	4 µl 10fach RNase Inhibitor Mix, 2 µl 20fach T7 RNA Polymerase
Mastermix Zweitstrangsynthese (130 µl):	91 µl RNase freies Wasser, 30 µl 5fach Second Strand Buffer, 3 µl dNTP Stammlösung (10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP), 4 µl DNA Polymerase I von E. Coli, 1 µl DNA Ligase von E. Coli, 1 µl Ribonuklease H von E. coli
MES-Stammlösung, 12fach:	70,4 g 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure Natriumsalz, 800 ml Wasser (durch 0,2 µm Sterilfilter)
Nicht-stringierter Waschpuffer, (1000 ml):	300 ml 20fach SSPE, 1,0 ml 10% Tween 20 (durch 0,2 µm Sterilfilter)
PBS-Pufferlösung, (1000 ml):	Aqua dest. 1000 ml, 5 Phosphate buffered saline tablets
PFA, (100 ml):	Paraformaldehyd 1 g, PBS Pufferlösung 100 ml
RLT-Pufferlösung:	10 µl β-Mercaptoethanol / ml RLT Buffer
SSPE, 20fach:	3 M NaCl, 0,2 M NaH ₂ PO ₄ , 0,02 M EDTA
Stain Buffer, 2fach:	41,7 ml 12 MES-Stammlösung, 92,5 ml 5 M NaCl, 2,5 ml 10 % Tween 20, 112,8 ml RNase-freies Wasser (durch 0,2 µm Sterilfilter)
Stringenter Waschpuffer, (1000 ml):	83,3 ml 12fach MES-Stammlösung, 5,2 ml 5 M NaCl, 1,0 ml 10 % Tween 20, 910,5 ml Wasser (durch 0,2 µm Sterilfilter)
TBE-Puffer, 1fach (10 l):	TRIS-Base 1080 g, Borsäure 550 g, EDTA 0,5 M 400 ml, Aqua dest. 8 l

2.1.5 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
CD3 MicroBeads (Isotype: mouse IgG2a)	Miltenyi Biotec
CD56 MicroBeads (Isotype: mouse IgG1)	Miltenyi Biotec
Simultest CD3/CD16 + CD56 Reagenz	Becton Dickinson
Simultest Control γ_1/γ_{2a} Reagenz	Becton Dickinson
Ziegen IgG	Sigma
Anti-Streptavidin Antikörper, biotinyliert (Ziege)	Vector Laboratories

2.1.6 Primer

Bezeichnung	Hersteller
T7-(dT) ₂₄ Primer (5`-GGCCAGTGAATTGTAATACG ACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT) ₂₄ -3`) zu 10 pmol/ μ l in RNase freiem Wasser gelöst	Affymetrix

2.1.7 Software

Bezeichnung	Hersteller
Betriebssystem Mac OS 9.2.2	Apple
Betriebssystem Windows XP	Microsoft
CellQuest Pro Vers. 4.0.2	Becton Dickinson
Data Mining Tool 3.1	Affymetrix
EndNote 9.0.0	Thomson
Excel	Microsoft
GCOS 1.4	Affymetrix
Microarray Suite 5.0	Affymetrix
MicroDB 3.0	Affymetrix
Microsoft Office	Microsoft

ND 1000 V 3.3.0

Coleman Technologies

SPSS Vers. 15.0

SPSS

2.1.8 Internet

Bezeichnung	Adresse
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/
Gene Ontology / AmiGO	http://www.geneontology.org/amigo/
UniProt	http://www.expasy.uniprot.org/
KEGG	http://www.genome.jp/kegg/
OMIM	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim
GeneCards	http://www.genecards.org/
Netaffx Analysis Center	http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx

(letzter Zugriff: 10.01.2010)

2.2 Methoden

2.2.1 Blutgewinnung

Von den Probanden wurden unter aseptischen Kautelen mittels 5 steriler S-Monovetten jeweils ca. 30 – 37,5 ml peripher venöses Vollblut gewonnen, welches umgehend verarbeitet wurde. Dies erfolgte mittwochs im Rahmen der Tumorsprechstunde der „Otto-Körner-Klinik“.

2.2.2 Isolierung peripher mononukleärer Zellen

Die Isolierung der peripher mononukleären Zellen (PBMC) erfolgt mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque Plus. Die Separation PBMC und anderer Blutbestandteile beruht hierbei auf Dichteunterschieden. Lymphozyten und Thrombozyten mit geringerer Dichte setzen sich durch Zentrifugation als Interphase über einer Schicht von Ficoll-Paque Plus von Erythrozyten und Granulozyten mit größerer Dichte ab. Die oberste Schicht wird von Blutplasma gebildet. (Abb. 2.1)

Durchführung:

Die Blutproben werden zu gleichen Teilen mit PBS verdünnt. Von dieser Mischung werden 30 ml in einem 50 ml PP-Röhrchen vorsichtig auf ca. 20 ml Ficoll-Paque Plus aufgeschichtet. Anschließend erfolgt die Zentrifugation der PP-Röhrchen für 30 min bei 400 x g und Raumtemperatur ohne Bremse. Mit einer sterilen serologischen Pipette wird die oberste Schicht abgesaugt. Sie enthält Plasma und Thrombozyten. Zum Waschen werden die PBMC mit einer Pipette in ein neues 50 ml PP-Röhrchen überführt. Die PP-Röhrchen werden mit PBS aufgefüllt und für 10 min bei 100 x g bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellsediment erneut in PBS resuspendiert. Der Waschvorgang wird einmal wiederholt und die Zellen in entsprechende Medien zur Weiterverarbeitung resuspendiert. Nach dem Zählen unter dem Mikroskop mittels Neubauer-Zählkammer wird eine Probe der PBMC von 2×10^5 Zellen in 500 µl PBS für die durchflußzytometrische Analyse gelöst.

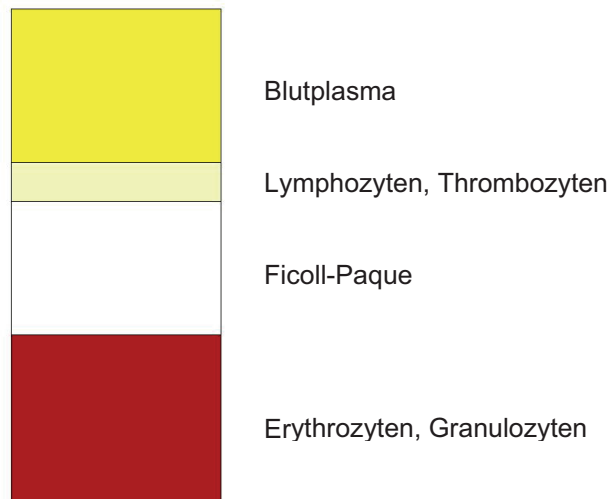


Abb. 2.1: Phasenverteilung der Blutbestandteile nach Dichtegradientenzentrifugation. Nach Versetzung der Blutprobe mit Ficoll-Paque und anschließender Zentrifugation zeigt sich das typische Verteilungsmuster der einzelnen Bestandteile. Lymphozyten und Thrombozyten setzen sich aufgrund ihrer Dichte als Interphase zwischen Ficoll-Paque und Blutplasma ab. Erythrozyten und Granulozyten besitzen die größte Dichte und erscheinen nach Zentrifugation als unterste Phase.

2.2.3 Zelldepletion mittels MACS-Technologie

Die MACS-Technologie (magnetic activated cell sorting) ist ein Verfahren, um diverse Zelltypen aus einem heterogenen Gemisch, z. B. Blut, zu isolieren und beruht auf Bindung ausgewählter Zellen mit immunomagnetischen Substanzen. Hierbei werden superparamagnetische Partikel aus Eisenoxid an monoklonale Antikörper konjugiert, die wiederum an die jeweiligen Oberflächenantigene der Zellen binden. Die ausgewählten Zellen werden beim Durchfließen einer Trennsäule mit paramagnetischer Eisenmatrix in einem starken Magnetfeld als Positivfraktion gehalten, während die Zellen ohne entsprechendes Oberflächenantigen als Negativfraktion hindurchfließen. Nach Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld können die markierten Zellen herausgespült werden (Abb. 2.2).

Bei der vorliegenden Zellseparation wurden die in Tab. 2.1 aufgeführten in Lösung vorliegenden monoklonalen Antikörper verwendet.

Tab. 2.1: Antikörperspezifizierung der MACS-Zellseparation.

Antikörper	Klon	Typ	Spezies	Antigen
CD3	BW264/56	IgG2a	Maus	CD3 ϵ -Kette
CD56	AF12-7H3.6.11	IgG1	Maus	N-CAM

Durchführung der T-Zell-Positivselektion:

Die PBMC werden mit MACS-Puffer in einem 15 ml PP-Röhrchen resuspeniert und mittels Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt. Nach Zentrifugation bei 300 x g für 10 min wird das Zellpellet mit 80 μ l MACS-Puffer je 10^7 Zellen in einem Rundbodenröhrchen resuspendiert und mit 20 μ l CD3 MicroBeads je 10^7 Zellen versetzt. Nach 15minütiger Inkubation bei 6 °C wird das Gemisch mit 2 ml MACS-Puffer je 10^7 Zellen gewaschen und das zentrifugierte Zellsediment erneut in 500 μ l je 10^8 Zellen gelöst. Anschließend wird die Zelllösung auf eine vorher mit MACS-Puffer gespülte LS Separation Column gegeben. Diese befindet sich in einem MidiMACS Separator und entsprechendem Magnetfeld. Die durchfließende Lösung enthält die CD3-Negativfraktion und wird mit 3 x 3 ml MACS-Puffer ausgespült. Die Trennsäule wird nun aus dem Magnetfeld entfernt, mit 5 ml MACS-Puffer aufgefüllt und mittels Stempel die enthaltene CD3-Positivfraktion herausgepresst.

Durchführung der NK-Zell-Positivselektion:

Die CD3-Negativfraktion wird bei 300 x g für 10 min zentrifugiert und das Zellpellet in 80 μ l MACS-Puffer je 10^7 Zellen gelöst. Nach Zugabe von 20 μ l CD56 MicroBeads je 10^7 Zellen wird die Lösung bei 6°C für 15 min inkubiert. Nach Waschen mit MACS-Puffer und Zentrifugation bei 300 x g für 10 min wird das Sediment erneut in 500 μ l MACS-Puffer je 10^8 Zellen gelöst. Das Zellgemisch wird anschließend auf eine vorher mit MACS-Puffer gespülte MS Separation Column gegeben, die sich in einem MiniMACS Separator im entsprechenden Magnetfeld befindet. Mit 1 ml MACS-Puffer wird die CD56-Negativfraktion herausgespült und verworfen. Die CD56-Positivfraktion mit enthaltenen NK-Zellen wird durch Auspressen mittels Stempel und 1ml MACS-Puffer außerhalb des Magnetfeldes gewonnen (Abb. 2.2).

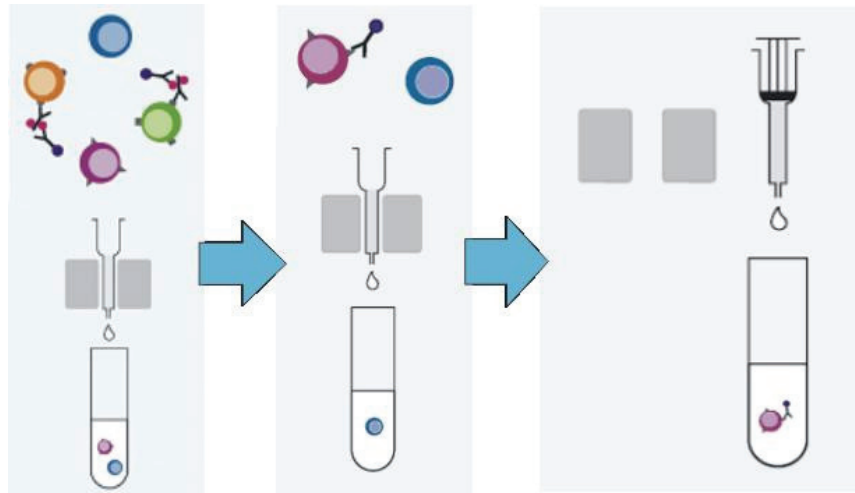


Abb. 2.2: Schematisierter Ablauf der MACS-Zellseparation.

Zunächst wird nach Antikörperbindung die Positivfraktion (CD3+) im Magnetfeld der Säule gehalten, während die Negativfraktion (CD3-) hindurchfließt (Links). Letztere wird wiederum durch erneute Antikörperkonjugation in Positiv- und Negativfraktion im Magnetfeld getrennt (Mitte). Die gewünschte Positivfraktion (CD3- / CD56+) kann außerhalb des Magnetfeldes herausgespült werden und enthält die natürlichen Killerzellen (Rechts).

2.2.4 Immunphänotypisierung mittels FACS-Technologie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, um quantitative und qualitative Analysen von Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom durchzuführen. Bei der FACS-Technologie (fluorescent activated cell sorting) handelt es sich um eine Methode, bei der Fluoreszenzfarbstoffmarkierte monoklonale Antikörper (Ak) an Oberflächenantigenen oder intrazellulären Molekülen binden und optische, elektrische und chemische Eigenschaften von Zellen in einem Durchflußzytometer in Kombination gemessen werden können.

Die Zellsuspension wird dabei mittels Überdruck in eine Meßküvette geführt und durch hydrodynamische Fokussierung sequentiell durch einen Argon-Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm erfasst. Die dabei entstehende Lichtstreuung wird durch Photodetektoren gemessen. Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) ist hierbei das Maß für die Größe, das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) das Maß für Granularität der jeweiligen Zellen. Dadurch ergibt sich ein charakteristisches Verteilungsmuster, das die Unterscheidung von z. B. Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten zulässt.

Die dabei zusätzlich eingesetzten Fluorochrome lassen sich zwar von Licht gleicher Wellenlänge anregen, besitzen aber unterschiedliche Emissionsmaxima ($E_{\lambda_{max}}$), was eine Differenzierung unterschiedlich markierter Zellen mittels Photomultiplier ermöglicht.

Moderne Durchflußzytometer besitzen zusätzliche Laser, um mehrere Farbstoffe gleichzeitig analysieren zu können.

Die bei der vorliegenden direkten Zweifarbenfluoreszenz eingesetzten Fluorochrome sind Fluoreszinoisothiocyanat (FITC, grün) und Phycoerythrin (PE, rot), die in einer Lösung an entsprechende Antikörper gebunden sind (Tab. 2.2).

Tab. 2.2: Antikörperspezifisierung der FACS-Immunphänotypisierung.

Antikörper	Klon	Typ	Spezies	Farbstoff	$E_{\lambda_{max}}$	Antigen
CD3	SK7	IgG1	Maus	FITC	515 nm	ϵ -TCR
CD16	B73.1	IgG1	Maus	PE	580 nm	IgG FcIIIIR
CD56	MY31	IgG1	Maus	PE	580 nm	N-CAM

Die gemessene Fluoreszenzintensität ist somit Ausdruck der Dichte und Verteilung der an Oberflächenantigenen gebundenen monoklonalen Antikörper.

Um die Abgrenzung von negativen, ungefärbten Lymphozyten vornehmen zu können müssen Kontrolluntersuchungen durchgeführt werden. Dabei werden in der graphischen Darstellung der auswertenden Software die Quadrantenmarker für die Fluoreszenz-1 (FL1) und Fluoreszenz-2 (FL2) gesetzt und gleichzeitig die unspezifische Färbung durch nicht-antigenspezifische Antikörperbindung an Fc-Rezeptoren abgeschätzt. Dies erfolgt als Negativkontrolle mittels folgender Fluorochrom-markierter monoklonaler Mausantikörper, die mit einem Antigen von Lochschnecken reagieren, das jedoch nicht auf humanen Leukozyten exprimiert wird (Tab. 2.3).

Tab. 2.3: Antikörperspezifisierung der FACS-Negativkontrolle.

Antikörper	Klon	Typ	Spezies	Farbstoff	Antigen
Y ₁	X40	IgG1	Maus	FITC	Hämocyanin
Y _{2a}	X39	IgG2a	Maus	PE	Hämocyanin

Durchführung der Zellanreicherung:

Nach dem Zählen der CD3-Positivfraktion (s. 2.2.3) mittels Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop und Aufrechnen auf die 5ml des Rundbodenröhrchens werden ca. 2 x

10^5 Zellen in einem neuen Rundbodenröhrchen mit 500 μ l PBS-Puffer gelöst und bei Zimmertemperatur für 5 min bei 300 x g mit Bremse zentrifugiert. Der Rest der Proben wird für weitere immunologische Analysen aufbewahrt (s. u.). Nach Dekantieren des Überstandes wird das Zellsediment mit 20 μ l Simultest CD3/CD16 + 56 Reagenz 3 sek über dem Vortexmischer versetzt und für 15 min lichtgeschützt inkubiert. Die Rundbodenröhrchen werden anschließend mit ca. 5 ml PBS-Puffer aufgefüllt und bei Zimmertemperatur für 5 min bei 300 x g mit Bremse zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes werden die Proben mit 500 μ l PFA 3 sek über dem Vortexmischer inkubiert und bis zur durchflußzytometrischen Auswertung abgedeckt, gekühlt und lichtgeschützt gelagert. In gleicher Weise wird mit der PBMC-Probe (s. 2.2.2) und der CD56-Positivfraktion (s. 2.2.3) verfahren.

Für die Negativkontrolle inkubiert man eine zusätzliche Probe der PBMC-Probe anstelle von Simultest CD3/CD16 + 56 Reagenz mit 20 μ l Simultest Control γ_1/γ_{2a} Reagenz und verfährt mit den Zellproben wie oben beschrieben.

Durchführung der Durchflußzytometrie:

Vor der durchflußzytometrischen Analyse werden die entnommenen Proben der PBMC-, CD3- und CD56-Positivfraktion bei Zimmertemperatur und 300 x g mit Bremse zentrifugiert. Der PFA-Überstand wird entfernt und das Zellsediment in 500 μ l PBS über dem Vortexmischer resuspendiert.

Die jeweiligen Proben werden einzeln in einem 5 ml Rundbodenröhrchen dem Durchflußzytometer FACsFlow zur Analyse zugeführt. Durch die installierte Software CellQuest Pro Vers. 4.0.2 erfolgt sowohl die Auswertung als auch die graphische Darstellung der Messergebnisse (Abb. 2.3).

Ausgehend von Routineeinstellungen erfolgt die genaue Meßeinstellung anhand der o. g. Negativkontrolle der PBMC-Probe. Hierfür werden die Verstärkerspannungen der Photodetektoren für FSC und SSC so gewählt, dass bei Auftragung der Analyseergebnisse SSC (Abszisse) gegen FSC (Ordinate) das charakteristische Verteilungsmuster zustande kommt. Zum Abgleichen der Fluoreszenz von FITC gegenüber PE ist ein zusätzliches Einstellen der Kompensation erforderlich. Es wird um die Lymphozyten, welche bei dieser Arbeit die Zielpopulation darstellen, ein sogenanntes Scatter Gate gezogen. Dadurch wird der spezifische Anteil der Zellen markiert, welcher in einem weiteren Diagramm hinsichtlich der Fluoreszenz zur Darstellung kommt (Abb. 2.3 a).

Anhand der Kontrollfärbung mittels Simultest Control γ_1/γ_{2a} Reagenz werden die Verstärkerspannungen der Photomultiplier eingestellt. Ein eingesetzter Quadrantenmarker

teilt ein Koordinatensystem in 4 Quadranten, die bei Auftragung der Analyseergebnisse FL1 (Abszisse, FITC) gegen FL2 (Ordinate, PE) die Unterscheidung der Zellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenz erlauben. Dabei wird zwischen doppelt positiv, einfach positiv und doppelt negativ unterschieden. Die Negativkontrolle (doppelt negativ) befindet sich hierbei im 3. Quadranten (Abb. 2.3 b).

Die absoluten und relativen Häufigkeiten der jeweiligen Zellen einer Probe werden durch die Software automatisch errechnet und graphisch dargestellt (Abb. 2.3 c-e). Es wurden jeweils 10000 Ereignisse gezählt.

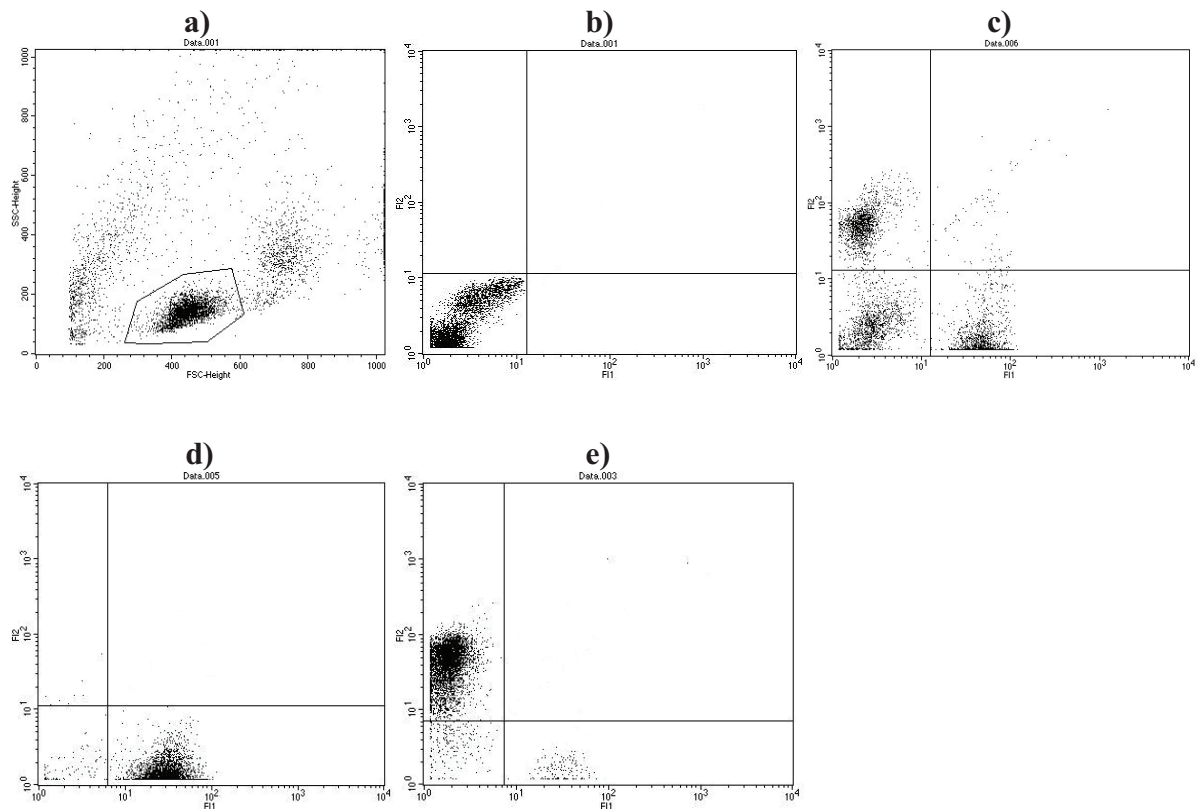


Abb. 2.3 (a-e): Dotplots von Beispieldurchflußzytometrien.

Bei Auftragen von FSC gegen SSC zeigt sich die Gruppe der PBMC im gezogenen Gate (a). Nach erfolgter γ_1/γ_{2a} -Versetzung der PBMC-Probe erscheint die Negativkontrolle im 3. Quadranten (b), da nur minimale Fluoreszenz im FL1/FL2-Vergleich detektierbar ist. Nach Adjustierung der Verstärkerspannungen lassen sich nach Ak-Konjugierung die unterschiedlichen Fraktionen der PBMC darstellen und z. B. der Anteil der NK-Zellen berechnen (c). Die T-Zellfraktion zeigt sich als FITC- und somit CD3-positive Ereignisse im 4. Quadranten (d) während die NK-Zellen als PE(CD56)-positive jedoch FITC(CD3)-negative im 2. Quadranten erscheinen (e).

2.2.5 Isolierung der Gesamt-RNA und chromatographische Aufreinigung

Zur Gewinnung der Gesamt-RNA aus den Zellproben werden zunächst Zellysate hergestellt, bei welchen mittels eines chaotropen Lysepuffers Zellmembranen und Zellorganellen aufgeschlossen werden, um sämtliche Nukleinsäuren der Proben freizusetzen. Unerwünschte enzymatische Aktivitäten von Nukleasen werden hierbei effizient verhindert. Gleichzeitig wird eine Homogenisation und DNase-Verdau vorgenommen, bei der genomische DNA enzymatisch inaktiviert und andere hochmolekulare Bestandteile geschert werden. Mithilfe der RNeasy Mini Kit-Technik wird die Gesamt-RNA in einer Trennsäule an einer Silicagel-Membran selektiv gebunden, während andere Bestandteile mit Waschpuffern herausgewaschen und durch Zentrifugation abgetrennt werden. Die gereinigte RNA wird in RNase-freiem Wasser eluiert.

Durchführung:

Die CD3- und CD56-Positivfraktionen werden nach Entnahme der Proben für die FACS-Immunphänotypisierung für 5 min mit 300 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der gesamte Überstand wird mit einer Pipette vorsichtig entfernt. Das Zellsediment wird mit 600 µl einer chaotropen Pufferlösung (RLT Buffer / 1 % Mercaptoethanol) je 1×10^7 Zellen versetzt und mittels Pipette bzw. bei $\leq 1 \times 10^5$ Zellen über dem Vortexmischer homogenisiert. Das Lysat kann in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ mehrere Monate gelagert werden.

Die aufgetauten Proben werden mit 600 µl 70%igem Ethanol versetzt und nach Mischung durch Auf- und Abpipettieren auf die RNeasy Mini-Spinsäule in einem 2 ml Collection Tube gegeben. Die Proben werden anschließend bei Raumtemperatur für 15 s bei 8000 x g zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. In einem neuen 2 ml Collection Tube werden 500 µl RW1 Buffer auf die Säule gegeben, erneut bei 8000 x g für 15 s zentrifugiert und der Durchfluß entfernt. Optional erfolgt an dieser Stelle der DNase-Verdau. Pro Säule werden 80 µl DNase-1-Mischung (70 µl Buffer RDD mit 10 µl DNase-1-Stammlösung) direkt auf die Silicagel-Membran pipettiert und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Es werden anschließend 500 µl RW1 Buffer auf die Säule gegeben, bei 8000 x g für 15 s zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. In einem neuen 2 ml Collection Tube werden 500 µl RPE Washbuffer auf die Säule gegeben und für 15 s bei 8000 x g zentrifugiert. Dieser Schritt wird einmal wiederholt und der Durchfluß entfernt. Im Anschluß wird die Säule auf ein neues 2 ml Reagiergefäß gesetzt und bei maximaler Drehzahl von 14000 rpm für 2 min zentrifugiert. In einem neuen 1,5 ml Collection Tube wird die Silicagel-Membran der Säule mit 80 µl

DEPC treated water versetzt, für 1 min inkubiert und anschließend bei 8000 x g für 1 min zentrifugiert. Dieser Schritt wird einmal wiederholt und der Durchfluß mit enthaltener RNA in neuen Reagiergefäßen auf Eis gelagert.

2.2.6 Qualitätsanalyse mittels nativer TBE-Agarosegelelektrophorese

Das Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese besteht in der Auftrennung unterschiedlicher RNA-Fragmente in Gelsystemen und deren Stranglängenbestimmung. Die Methode beruht auf der Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld. Das Polysaccharid Agarose fungiert hierbei nach Vernetzung zu Polymeren als eine Art Sieb mit bestimmter Porengröße, durch welches die verschiedenen RNA-Fragmente nach Anlegen einer elektrischen Spannung aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen von der Kathode zur Anode laufen. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist hierbei von der Molekülgröße abhängig. Die Nukleinsäuren werden mittels eines fluoreszierenden Stoffes (meist Ethidiumbromid) eingefärbt und unter UV-Licht von 302 nm Wellenlänge sichtbar und somit beurteilbar gemacht. Die Auswertung der Probenkonzentration und Fragmentgröße erfolgt anhand eines Vergleiches der charakteristischen Bandenmuster mit industriell gefertigten Standardlösungen. Bei konstanter Feldstärke ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente umgekehrt proportional zu ihrer Größe. Die Lichtintensität ist proportional zur Länge der Nukleinsäure und bei gleicher Fragmentlänge proportional zur vorliegenden RNA-Konzentration. Es sollten die zwei unterschiedlichen 18S- und 28S-Banden der ribosomalen RNA (rRNA) zur Darstellung kommen. Unerwünschte Verunreinigungen der Proben können hierbei sichtbar gemacht werden. Nicht klar unterscheidbare, vom charakteristischen Muster abweichende Darstellungen sprechen für Degradation und führen bei Aufarbeitung der RNA zur Chipanalyse zu Unterrepräsentierung der 5'-Bereiche der mRNA und verminderter cRNA-Synthese bei der *in vitro* Transkription.

Durchführung der Probenpräparation:

Von den auf Eis gelagerten RNA-Proben werden nach der RNeasy Mini Kit-Präparation jeweils 3 µl in ein neues Reagiergefäß pipettiert und mit 4 µl des 2,5-fach verdünnten Ladepuffers (650 µl RNase-freies Wasser auf 260 µl 6x loading dye solution) versetzt.

Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese:

In einem Erlenmeyer-Kolben wird eine 1,6 %ige Agaroselösung aus 30 ml TBE-Puffer, 0,48 g Agarose und ca. 30 ml RNase-freiem Wasser angesetzt und in einer Mikrowelle mit 600 W 1 – 2 Minuten eingekocht. Zu dieser Lösung werden unter einem Abzug 2 µl Ethidiumbromid vorsichtig beigemischt und auf den Gelschlitten einer Elektrophoresekammer mit eingesetztem Gelkamm gegeben. Entstandene Luftblasen werden umgehend mittels Pipette entfernt. Die Elektrophoresekammer wird mit TBE-Puffer und 20 µl Ethidiumbromid gefüllt bis das zuvor auspolymerisierte Gel des Schlittens knapp bedeckt ist. Der Kamm wird aus dem Gel gezogen und die so entstandenen Taschen zur Kathode platziert. Die mit Ladepuffer präparierten RNA-Proben werden nun vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. In jeweils eine randständige Tasche werden pro Elektrophoresedurchgang 4 µl des Längenmarkeräquivalents Φ X174 DNA/BsuRI (HaeIII) gegeben. Die angelegte Spannung sollte ca. 10 V/cm Laufstrecke bei Gleichstrom einer Stärke im mA-Bereich betragen und bis zum Durchlauf von ca. 2/3 des Gels angelegt bleiben (in diesem Fall 90 V für 30 min). Zur Dokumentation wird unter UV-Licht von 254 nm ein Foto des charakteristischen Bandenmusters erstellt und im Anschluß in Hinblick auf Integrität der Banden und möglicher Kontamination mit genomischer DNA ausgewertet (Abb. 2.4).

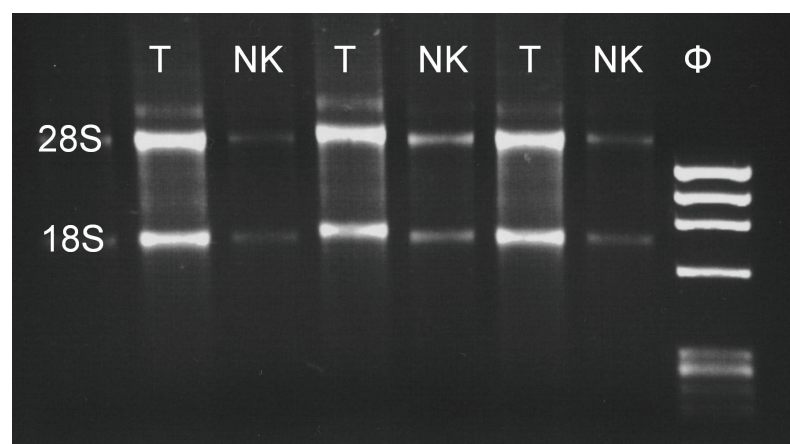


Abb. 2.4: Gelelektrophorese der T- und NK-Zellproben.

Zur Qualitätsanalyse der gewonnenen Gesamt-RNA der NK-Zellen und T-Zellen wird die Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Unter UV-Licht kommen die Banden der 28S- und 18S-rRNA der T- und NK-Zellproben sowie die Banden des Längenmarkeräquivalents (Φ) zur Darstellung. Mögliche Verunreinigungen oder fehlerhafte Proben können dadurch sichtbar gemacht werden.

2.2.7 Qualitätsanalyse mittels Spektralphotometrie

Das Prinzip der Spektralphotometrie beruht auf der physikalischen Eigenschaft elektromagnetischer Strahlung, beim Durchtritt durch ein Medium absorbiert zu werden und somit an Intensität zu verlieren. Im Engeren wird hierbei der ultraviolette und sichtbare Bereich des elektromagnetischen Spektrums (200 – 780 nm) gemeint. Durch ein Prisma monochromatisiertes Licht bestimmter Wellenlänge wird beim Durchgang durch ein Gas oder eine Flüssigkeit spezifisch für jede Wellenlänge absorbiert und die Transmission von Photodetektoren erfasst. Durch die Berechnung der Extinktion, der Schwächung der Strahlung durch ein Medium, entsteht für den jeweiligen gelösten Stoff ein typisches Absorptionsspektrum bei Auftragung von Wellenlänge (Abszisse) gegen Extinktion (Ordinate).

Durchführung der Spektralphotometrie:

Das Spektralphotometer ND-1000 wird mit der entsprechenden Software ND 1000 V 3.3.0 auf die Analyse von Nukleinsäuren (in diesem Fall RNA 40) programmiert. Vor jeder Messung ist ein so genanntes Blanking, eine Nullsetzung der Messeinheit, mit 1,5 µl RNase-freiem Wasser erforderlich. Anschließend erfolgt die sukzessive Platzierung von jeweils 1,5 µl der RNA-Proben auf den unteren Messsockel. Durch Schließen des Probenarmes wird aufgrund der Oberflächenspannung der Flüssigkeit eine Säule zwischen oberem und unterem Messsockel gezogen. Es erfolgt die automatische Absorptionsmessung. Die aufgespielte Software übernimmt die Berechnung und graphische Darstellung der Analyseergebnisse. Zur Darstellung kommen hierbei die 260/280-Ratio (Quotient der Proteinabsorptionsmessungen bei 260 nm und 280 nm) als Maß für die Probenreinheit, die 260/230-Ratio (Quotient der Absorptionsmessung bei 260 nm und 230 nm) als sekundäres Maß für die Nukleinsäurereinheit der Probe sowie die RNA-Konzentration der Probe in ng/µl (gemessen bei 260 nm Wellenlänge). Der Wert der 260/280-Ratio sollte dabei zwischen 1,6 und 1,9 liegen. Werte unter 1,6 stellen ein Indiz für eine mögliche Proteinkontamination der Probe dar. Werte über 2,1 sprechen für ein Vorkommen degradiertes RNA oder einen Überschuss an freien Nukleotiden.

2.2.8 Präparation der Gesamt-RNA zur Genchipanalyse

Die Präparation der Proben zur Genchipanalyse erfolgt nach „standardized operating procedure“ (SOP) des Instituts für Immunologie der Universität Rostock.

Die anschließende Microarrayanalyse wird anhand von cRNA, welche die gesamte mRNA der lysierten Zellen repräsentiert, durchgeführt. Dafür muß zunächst die Gesamt-RNA revers transkribiert werden. Die so entstandene cDNA wird durch eine Strang-„Replacementreaktion“ des RNA-DNA Hybridstrangs mittels des DNA-Polymerase I Komplexes (*E. coli*), RNaseH, *E. coli* -DNA Ligase und „End Polishing“ mit Hilfe der T4 DNA Polymerase amplifiziert und *in vitro* in cRNA transkribiert. Nach linearer Amplifikation und Markierung mit Biotin-16-UTP mittels einer *in vitro* Transkriptionsreaktion (IVT) durch die T7-Polymerase kann die cRNA der Genchipanalyse zugeführt werden.

Für Ausgangsmengen von 10 – 100 ng eukaryotischer Gesamt-RNA ist ein sogenanntes Two-Cycle Target Labeling erforderlich. Dies beinhaltet einen zweiten Zyklus von cDNA-Synthese und IVT-Amplifikation und stellt eine ausreichend große Menge an für die Chipanalyse erforderlicher markierter cRNA sicher. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Aufarbeitung der Gesamt-RNA zur Chipanalyse als ein One-Cycle Target Labeling für Ausgangsmengen von 1 – 15 µg Gesamt-RNA (Abb. 2.5).

2.2.8.1 Erststrang-cDNA-Synthese und Einführung einer T7 Promoter Signalsequenz

Vom Gesamt-RNA-Eluat wird ein Volumenäquivalent von 10 µg zu 2 µl Glykogenstammlösung in ein 1,5 ml Reagiergefäß gegeben und anschließend mit einer 7,5 molaren Ammoniumacetatlösung sowie 96 %igem Ethanol zur Präzipitation versetzt. Die Mischung wird schockgefroren und 30 min mit 19940 g bei -3 °C zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wird der nach kurzem Anzentrifugieren adhärente Überstand mit einer Pipettenspitze abgenommen und mit 600 µl 80 %igem Ethanol gewaschen. Das durch anschließende 3minütige Zentrifugation gewonnene und überstandsbefreite Pellet wird für 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend erfolgt die Inkubation mit 10 µl T7-(-dT)₂₄ Primerlösung (entspricht 100 pmol Primer) für 5 min bei 70 °C. Der Reaktionsansatz wird auf Eis abgekühlt, bei 19940 g für eine Minute zentrifugiert und mit 8

μl Mastermix und davon getrennt mit 2 μl SuperScript II RNaseH Reverse Transcriptase versetzt und für 1 bis 2 h bei 42 °C inkubiert.

2.2.8.2 Zweitstrangsynthese

Dem Erststrangreaktionsansatz werden 130 μl Mastermix Zweitstrangsynthese beigemischt und für 2 h bei 16 °C inkubiert. Die anschließende Auffüllreaktion („end polishing“) durch Inkubation von 2 μl T4 DNA Polymerase wird durch Zugabe von 10 μl 0,5 M EDTA Lösung nach 10 min gestoppt. Der Ansatz wird anschließend mit 600 μl cDNA Binding Buffer versetzt und 3 s über dem Vortexer gemischt. Hiervon werden zunächst 500 μl in der cDNA Cleanup Spin Column für 1 min bei $\geq 8000 \times g$ zentrifugiert und mit dem verbleibenden Ansatzrest in gleicher Weiser ein erneuter Durchgang gestartet. Nach Zusatz von 750 μl cDNA Wash Buffer in die Spin Column und anschließender Zentrifugation für 1 min bei $\geq 8000 \times g$ wird nach Öffnung der Kappe die Probe erneut abzentrifugiert (5 min, $\leq 25000 \times g$) und somit getrocknet. Ein nachfolgender Transfer der Spin Column auf ein 1,5 ml Collection Tube und Beifügen von 14 μl cDNA Elution Buffer erlaubt nach 1minütiger Inkubation und Zentrifugation für 1 min ($\leq 25000 \times g$) die Gewinnung von ca. 12 μl eines gereinigten ds-cDNA-Eluats.

2.2.8.3 *In vitro* Transkription und Qualitätskontrolle

Das getrocknete Pellet der Zweitstrangsynthese wird in Abhängigkeit von der Ausgangsmenge der Gesamt-RNA und erwünschter Ausbeute für 5 bis 15 h mit 40 μl Mastermix für die *in vitro* Transkription inkubiert. Die anschließende Aufreinigung erfolgt mittels RNeasy Minisäule, bei welcher der Ansatz nach Gabe auf die Säule bei 10000 g für zuerst 15 min, nach erneuter Aufpipettierung zur Ausbeutesteigerung nochmals für 5 min zentrifugiert wird. Nachfolgend wird die Säule in drei Schritten mit 700 μl RW1 und zweimalig mit 500 μl RPE nach jeweils 15sekündiger Zentrifugation bei 10000 g gewaschen. Vor der RNA-Elution wird die Membran durch Zentrifugation bei 19940 g für 2 min getrocknet. Zur Elution werden zweimalig 30 μl RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert und jeweils nach 1 min Inkubationszeit bei 19940 g für 1 min zentrifugiert. Das Eluat mit enthaltener cRNA (15 – 25 μg) wird photometrisch quantifiziert und optional

gelelektrophoretisch hinsichtlich Probenqualität überprüft. Anschließend folgt eine Fragmentierung der cRNA im Sinne einer sauren Hydrolyse, um die Proportionalität zwischen Länge und Markierung aufzuheben. Dadurch wird eine effizientere Hybridisierung von eingebrachten Biotinderivaten mit kleinen Fragmenten (35 – 200 Basen) und somit optimale Sensitivität erlangt. Hierzu wird der 5-fach Fragmentierungspuffer für 35 min bei 94 °C zur cRNA-Probe gegeben. Nach Abkühlung und Anzentrifugieren der Probe erfolgt die Auftragung von 1 µl der fragmentierten cRNA auf einem 1,6 %igen TBE-Agarosegel und die anschließende Elektrophorese und fotografische Dokumentation zur Abschätzung der Größe des nachfolgenden Hybridisierungsmixes.

2.2.8.4 Hybridisierung

Dem cRNA Fragmentierungsansatz werden RNase freies Wasser sowie als Kompetitor gegen unspezifische Bindungen ein 2-fach Hybridisierungspuffer zugesetzt. Hinzu kommen als jeweils 1 % vol. acetyliertes bovines Serumalbumin, Heringsspermien DNA, B2-Oligo und Kontrollspikes. Die biotinylierten Transkripte werden vorgefertigt mit dem Kit bereitgestellt, so dass eine Restriktionsspaltung und photometrische Vermessung nicht mehr erforderlich ist. Die Vorhybridisierung erfolgt durch Befüllen der Arrays mit 200 µl 1fachen Vorhybridisierungspuffers und anschließender Inkubation im Hybridisierungssofen bei 45 °C mit 60 rpm.

Der Hybridisierungsmix wird 5 min auf 99 °C erhitzt, im Anschluß 5 min bei 45 °C abgekühlt und bei Raumtemperatur und 13000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen der Vorhybridisierungslösung aus dem DNA-Chip wird der Hybridisierungsmix mittels Pipette eingefüllt und für 16 h bei 45 °C und 60 rpm im Hybridisierungssofen inkubiert.

2.2.8.5 Waschung, Färbung und Antikörperamplifikation

In der halbautomatischen Waschstation Fluidics Station 450 erfolgen die Wasch- und Anfärbevorgänge nach den für die jeweiligen Arrays spezifischen Protokollen.

Die erste Anfärbung geschieht mit Anhängen von 600 µl Färbelösung (Streptavidin Phycoerythrin, SAPE). Im nächsten Schritt werden zur Antikörperamplifikation 600 µl Antikörperlösung (biotinylierte Anti-Streptavidin Antikörper der Ziege) hinzupipettiert.

Anschließend wird eine dritte Färbung durch erneutes Hinzufügen von 600 µl Färbelösung vorgenommen. Hierbei erfolgt durch die Bindung mehrerer biotinylierter Antikörper eine Verstärkung der Fluoreszenz.

Die Arrays werden im Anschluß aus der Waschstation entnommen und ggf. Luftblasen entfernt.

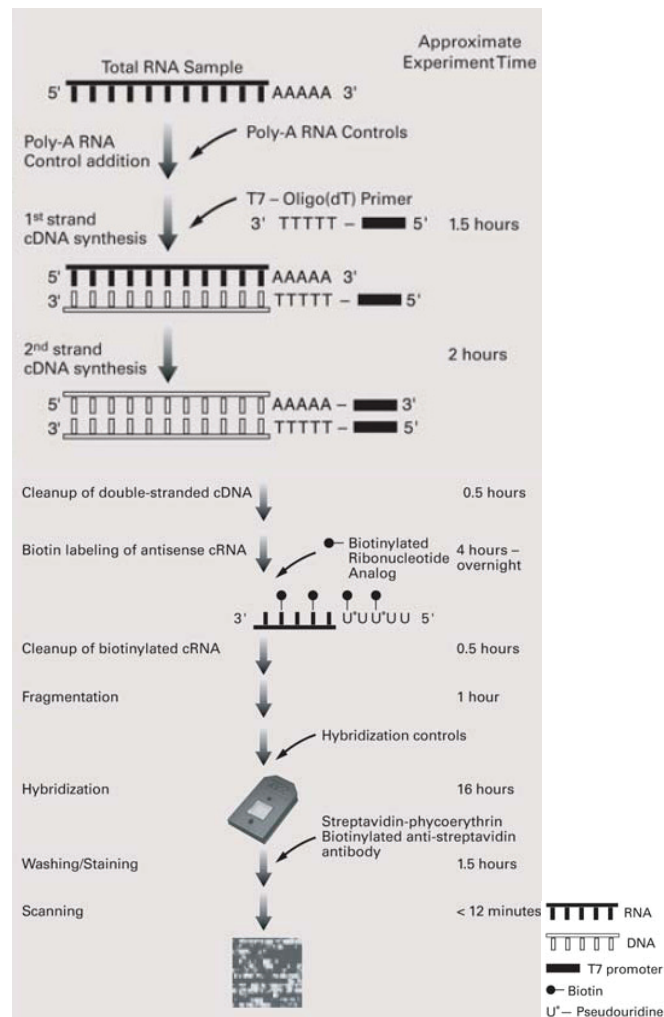


Abb. 2.5: Schema der Gesamt-RNA-Präparation zur Chipanalyse als One-Cycle Target Labeling.

Aus den Proben mit enthaltener Gesamt-RNA wird zur Aufarbeitung für die GeneChip-Analyse zunächst nach Einführung des T7-(dT)24 Primers mittels Superscript II reverse Transkriptase eine Erststrang-cDNA synthetisiert. Durch eine „strand replacement reaction“ wird die Zweitstrang-cDNA synthetisiert. Hierzu werden DNA-Polymerase I, hybridstrangspezifische RNA, degradierende RNaseH, DNA-Ligase und ein sogenanntes „end-polishing“ mit rekombinanter T4-Polymerase benötigt. Die linear amplifizierende *in vitro* Transkription wird mittels T7-Polymerase unter Einbau von Biotin-16-UTP durchgeführt. Nach Fragmentierung der benötigten cRNA-Menge wird diese auf dem GeneChip hybridisiert. Die Durchführung einer Antikörperamplifikation mit biotinylierten Antistreptavidin-Antikörpern und Zweitfärbung mit Streptavidin-Phycoerythrin zur Signalverstärkung beendet die Präparation der Proben vor dem Scannen der Fluoreszenz.

2.2.9 Genexpressionsanalyse in Microarray-Technik

2.2.9.1 Funktionsweise der Affymetrix GeneChips

Grundlage der GeneChip-Technologie ist die Tatsache, dass eine verstärkte Genexpression zu einer durch DNA-Chips messbaren Zunahme von mRNA führt.

Die Microarray-Technik der Firma Affymetrix beruht auf der Semikonduktor-Photolithographie, durch welche lichtgesteuert 25mer Oligonukleotide auf einer Siliziumträgermatrix des Chips direkt synthetisiert werden. Der in dieser Versuchsreihe verwendete GeneChip Human Genome U133 plus 2.0 besitzt über 1,3 Mio. 11µm große quadratische Felder (Probe Cells), auf denen jeweils Millionen identische Kopien eines spezifischen 25mer Oligonukleotids synthetisiert wurden (Abb. 2.6).

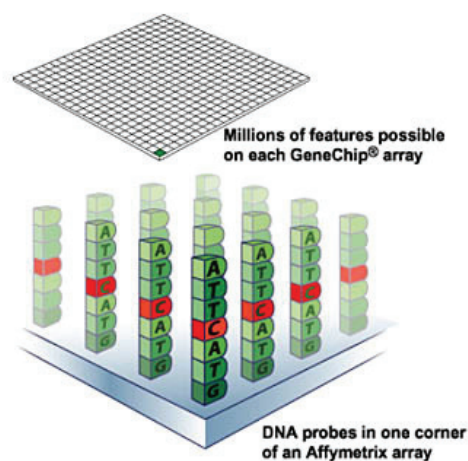


Abb. 2.6: Schematischer Aufbau eines GeneChips.

Auf der Chipoberfläche befinden sich synthetische Oligonukleotide, welche per Photolithographie auf der Trägermatrix direkt synthetisiert wurden. Zur Vereinfachung sind die 25mer Oligonukleotide als 7-Basensequenz (ATTCATG) dargestellt. Mehrere Millionen identischer Kopien dieser synthetischen Oligonukleotide bilden eins von über 1,3 Millionen Probe Cells des GeneChips.

Nach dem Prinzip der spezifischen Basenpaarung binden die Biotin-markierten RNA-Sonden der Proben an den komplementären GeneChip-Nukleotiden und erzeugen somit eine nach Laseranregung vom Scanner detektierbare Fluoreszenz in einem bestimmten Spot (Abb. 2.7).

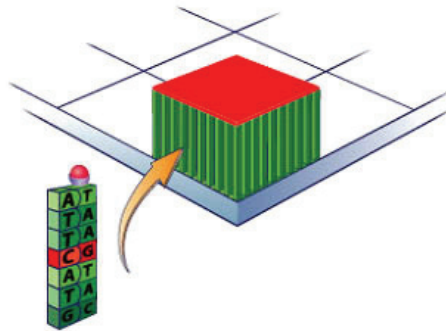


Abb. 2.7: Schematischer Aufbau eines GeneChip-Spots („Probe Cell“) nach erfolgter Hybridisierung.

Darstellung eines aus definiertem Oligonukleotid („Probe“) des Chips und markierter RNA-Sonde („Target“) entsandenen Doppelstrangs. Es zeigt sich nach erfolgter Hybridisierung mit Biotinmarkierter cRNA die detektierbare Fluoreszenz eines GeneChip-Spots.

Die 25mer Oligonukleotide des Chips entsprechen mit ihrer definierten Sequenz dem sogenannten Perfect Match (PM), welchem als Mismatch (MM) ein Oligonukleotid mit veränderter Sequenz in Position 13 gegenübergestellt wird. Für eine erhöhte Sensitivität und Spezifität der Vergleiche wird der Abfall der Fluoreszenzemission des MM vom PM kontrolliert. Daraus ergeben sich PM/MM-Paare, die sogenannten Probe Pairs. Jedes Genprodukt ist durch ein Probeset, welches aus 11 dieser Probe Pairs besteht repräsentiert (Abb. 2.8).

Einem sogenannten Baseline Array (z. B. Probeset eines gesunden Probanden) des Chips wird zum Expressionsvergleich ein Experiment Array (z. B. Probeset eines erkrankten Probanden) der zu untersuchenden Probe zugewiesen und deren Fluoreszenzunterschied mittels Scanner gemessen. Durch Signifikanzberechnungen und andere statistische Verfahren lassen sich Rückschlüsse auf das jeweilige Expressionsniveau eines Genprodukts ziehen.

Mit dem GeneChip Human Genome U133 plus 2.0 ist es möglich, die Transkription des gesamten humanen Genoms mit Hilfe von über 54000 Probesets, in nur einer Hybridisierung zu messen. Diese Technik ermöglicht die Expressionsanalyse von über 47000 Transkripten und Varianten mit über 38500 darunter befindlichen gut charakterisierten humanen Genen.

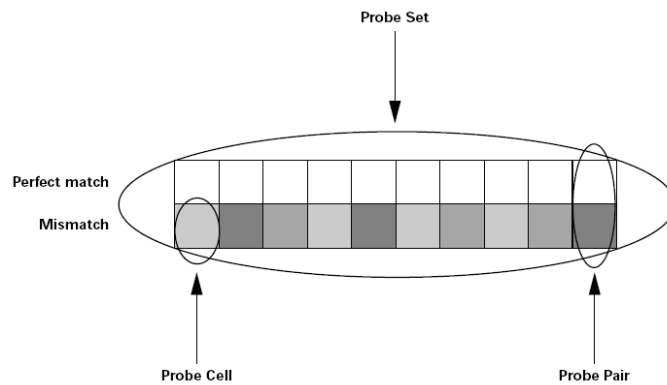


Abb. 2.8: Schematischer Aufbau eines Probesets.

Ein GeneChip-Probeset, das repräsentativ für ein Genprodukt steht, besteht aus 11 Probepairs (gegenübergestellte Probe Cells). Diese wiederum sind im Mismatch gegenüber dem Perfect Match an Position 13 der definierten 25mer-Oligonukleotide in ihrer Sequenz verändert. Das ermöglicht eine erhöhte Sensitivität und Spezifität in der Detektion des Fluoreszenzabfalls nach erfolgter Hybridisierung.

2.2.9.2 Durchführung

Die markierten RNA-Sonden werden nach dem Protokoll „GeneChip Expression Analysis Technical Manual“ der Firma Affymetrix auf den Chip gebracht und hybridisiert.

Die Arrays werden bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm im GeneChip Scanner 3000 bei 570 nm mit einer Auflösung (Pixel Value) von 1,56 μm ausgelesen. Dies geschieht als zweifaches Scanning.

Es wird jeweils nur eine Probe pro Chip hybridisiert und anschließend analysiert.

2.2.10 Basisdatenanalyse, Statistische Algorithmen und Datenübergabe

Die Basisdatenanalyse erfolgt nach einem von der Firma Affymetrix entwickelten statistischen Verfahren, MAS 5.0 genannt.

Die Probe Level Analyse wurde per GeneChip Operating Software (GCOS 1.4) durchgeführt. Nach dem Scannen werden in der „Single Array Analysis“ die Signale der einzelnen hybridisierten Oligonukleotide berechnet und anhand der Mismatchsignale eine Hintergrundberechnung und Subtraktion von Ausreißersignalen durchgeführt. Das Probeset-Signal wird mittels One-Step Tukey’s Biweight Estimate und der Detection p-value mittels Wilcoxon’s signed-rank test ermittelt. Somit können nach Festlegung von Grenzwerten (cut-

offs) Aussagen über die relative Häufigkeit eines bestimmten Genproduktes in der untersuchten Probe sowie anhand des Detection Calls Aussagen über die Anwesenheit (present, „P“, absent „A“ und marginal „M“) eines Probesets gemacht werden.

Zum Ausschluß nicht-biologischer Unterschiede im Gruppenvergleich (z. B. durch unterschiedliche RNA-Mengen) erfolgt eine lineare Normalisierung als sogenanntes „global scaling“ bei einer „target intensity“ von 500. Hierbei werden die höchsten und niedrigsten 2% der Signale ausgeschlossen.

Die Extraktion der Daten und die Gruppenvergleichsanalyse der Genexpressionsniveauunterschiede erfolgt über das DataMining Tool 3.1 der Fima Affymetrix. Während der „Comparison Analysis“ werden Expressionsunterschiede in Größe und Richtung zwischen Baseline und Experimental Array errechnet und für jedes Probeset in Form einer Signal Log Ratio (SLR) zur Basis 2 dargestellt.

Über den Wilcoxon's signed-rank test wird anhand der 11 Signaldifferenzen eines Probests der zu vergleichenden Arrays der Change p-value errechnet. Dieser Wert erlaubt nach Festlegung von cut-offs Aussagen über Expressionsunterschiede („Change calls“): Increase (I), Marginal Increase (MI), No Change (NC), Marginal Decrease (MD) und Decrease (D).

Eine SLR von 1,0 bedeutet einen Anstieg (Increase) des Expressionsniveaus eines Genprodukts um den Faktor 2 (Fold Change = 2) und eine SLR von -1,0 einen Abfall (Decrease) um den Faktor 2 (Fold Change = -2). Bei Werten von 0 liegt kein Expressionsunterschied zwischen Baseline und Experimental Array vor.

Die Basisdatenanalyse erfolgte am Institut für Immunologie der Universität Rostock.

Die Daten werden als „tab-limited-txt-file“ exportiert und enthalten Aussagen über die für die anschließende Analyse und funktionelle Interpretation erforderlichen Probesetparameter. Die weitere Auswertung erfolgte über Tabellenkalkulation mittels der Software Excel von Microsoft bzw. SPSS.

2.2.11 Funktionelle Interpretation

Die Ergebnisdarstellung und funktionelle Interpretation der Analyseergebnisse erfolgte mit Hilfe der Affymetrix-Systemsoftware, dem NetAffx Analysis Center, Online-

Genomdatenbanken (PubMed, Gene Ontology / AmiGO, UniProt, KEGG, OMIM und GeneCards) sowie der SPSS-Software und Windows Excel.

2.2.12 Probandenkategorisierung

Die untersuchten Probanden wurden hinsichtlich des klinischen Status in drei Gruppen unterteilt. Probanden mit primär aufgetretenen malignen Kopf-Hals-Tumoren, welche bis zum Zeitpunkt der Blutentnahme noch keine Therapie erfahren hatten, bilden die Gruppe „Krank“. Patienten mit bereits erfolgter Tumorthherapie, aktueller Rezidivfreiheit und ohne Anhalt für aktuelle Metastasierung wurden der Gruppe „Therapiert“ zugewiesen. Als Kontrollpersonen der Gruppe „Gesund“ fungierten gesunde Probanden ohne Tumorleiden mit annähernd gleicher Altersstruktur. Ausschlusskriterien für alle Gruppen bildeten eine zuvor durchgemachte maligne Erkrankung oder aktuelles Leiden an einem Zweit- oder anderen Tumor sowie eine aktuelle hämatologische Erkrankung.

Diese drei Gruppen wurden, wie im Ergebnisteil dargestellt, einer multifaktoriellen Vergleichsanalyse unterzogen.

Für die Genexpressionsanalyse wurden die NK-Zellproben von jeweils vier repräsentativen Probanden der drei zu vergleichenden klinischen Gruppen herangezogen (s. Tab. 7.1, S. 109), welche folgenden Einschlusskriterien entsprachen:

- dem Durchschnittsanteil der NK-Zellen an PBMC entsprechend
- dem Durchschnittsalter der jeweiligen klinischen Gruppe entsprechend
- optimale Qualität und Quantität der RNA-Proben (keine Extrabanden in der Gelelektrophorese, 260/280 Ratio zwischen 1,8 und 2,1 sowie ein RNA-Gehalt von mind. 1,5 µg)
- Rezidivfreiheit von mindestens 12 Monaten.

2.2.13 Archivarbeit

Die entsprechenden Akten der Patienten wurden im Tumorarchiv der „Otto Körner Klinik“ eingesehen und im Hinblick auf die im Ergebnisteil dargestellten Daten untersucht. Die statistische Auswertung und Darstellung erfolgte mittels der SPSS-Software.

2.2.14 Studiendesign

Der schematisierte Aufbau des Studiendesigns mit Darstellung der wesentlichsten Schritte ist der Abbildung 2.9 zu entnehmen.

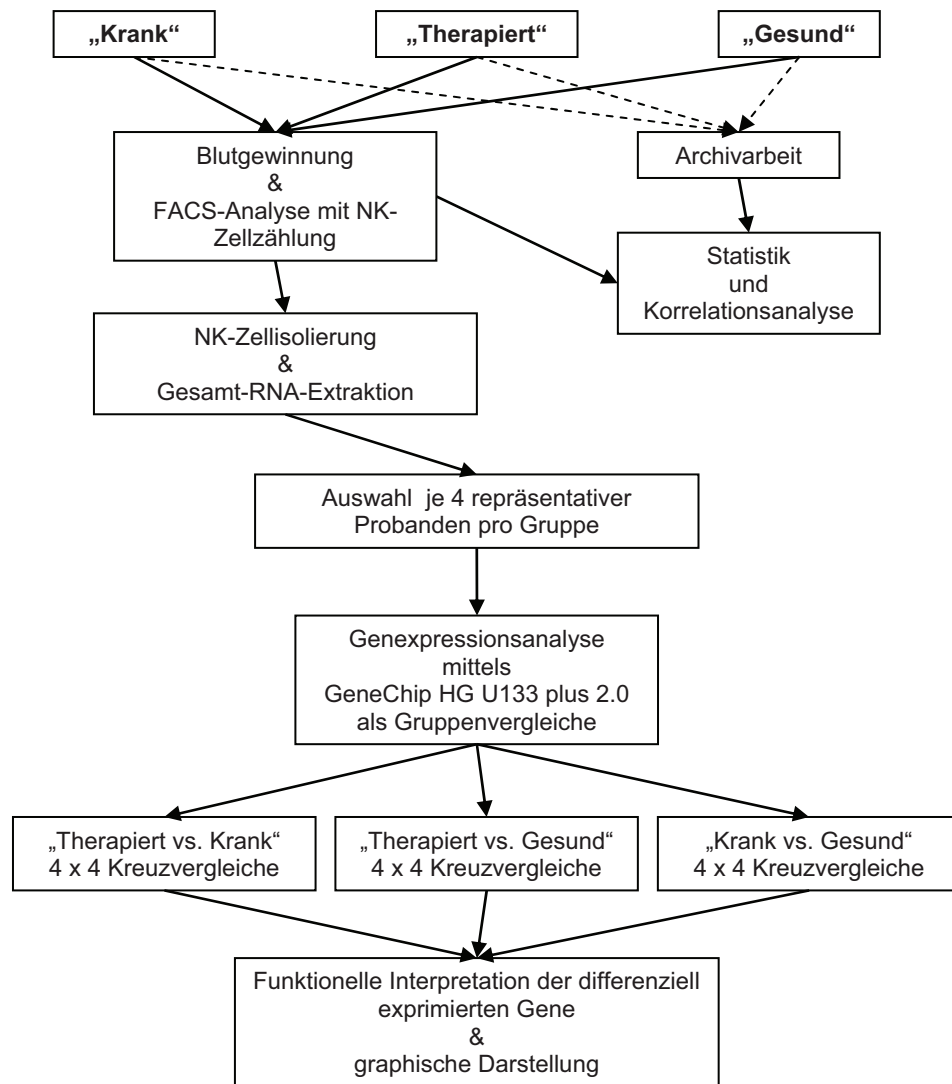


Abb. 2.9: Studiendesign.

Nach Blutgewinnung und NK-Zellzählung der Proben der jeweiligen klinischen Gruppen wurde zum Einen eine statistische Analyse anhand klinischer Daten durchgeführt. Zum Anderen wurden die NK-Zellproben weiterverarbeitet, die Gesamt-RNA isoliert und einer Gesamtgenom-Expressionsanalyse mittels GeneChip unterzogen. Hierbei wurden differenziell exprimierte Gene in drei Vergleichsgruppen identifiziert und anhand von gängigen Genomdatenbanken funktionell interpretiert.

3. Ergebnisse

3.1 Patientengut

Für die vorliegende experimentell-analytische Fall-Kontroll-Studie wurden die Krankengeschichten und Blutproben von 143 Probanden untersucht. Hierbei handelt es sich um 20 Patienten der Gruppe „Krank“ und 83 rezidivfreie Tumorpatienten mit bereits erfolgter Therapie („Therapiert“), die von 1981 bis 2005 in der „Otto Körner Klinik“ behandelt wurden sowie um 29 gesunde Kontrollprobanden („Gesund“).

Vom ursprünglichen Probandenstamm konnten 40 aufgrund nicht erfüllter Einschlusskriterien bzw. systematischer Fehler in der weiteren immunologischen Aufarbeitung und Auswertung nicht berücksichtigt werden.

3.2 Deskriptive Statistik

3.2.1 Alters- und Geschlechtsverteilung

Von allen Probanden ($n = 132$) der drei untersuchten klinischen Gruppen waren 110 (83,3 %) Probanden männlichen Geschlechts. Patienten mit malignen Kopf-Hals-Tumoren der Gruppen „Krank“ und „Therapiert“ ($n = 103$) waren zu 85,4 % ($n = 88$) männlich und zu 14,6 % ($n = 15$) weiblich, was die Prädisposition dieser Erkrankung für Männer aufzeigt. Die Geschlechtsverteilung der Probanden der tumorfreien Kontrollgruppe „Gesund“ ($n = 29$) gestaltete sich mit 75,9 % ($n = 22$) ebenfalls zu Gunsten der Männer. Es ist somit durchgängig in allen Gruppen ein deutliches Überwiegen des männlichen Geschlechts von ca. 5 : 1 vorliegend.

Das mittlere Alter der Patienten mit einem malignen Kopf-Hals-Tumor ist in der Gruppe „Krank“ mit 55,9 und mit 59,4 Jahren in der Gruppe „Therapiert“ signifikant höher als das der Kontrollgruppe mit 46,2 Jahren (univariate Varianzanalyse nach Bonferroni für multiple Mittelwertvergleiche, $p < 0,05$). Der jüngste Proband war hierbei 18 und der älteste Proband 79 Jahre alt. Das Durchschnittsalter der Probanden aller klinischer Gruppen lag bei 56,0 Jahren. Einen genauen Überblick über die Alters- und Geschlechtsverteilung gibt die Tabelle 3.1.

Tab. 3.1: Geschlechts- und Altersverteilung der Probanden.

	Gruppe							
	Krank		Therapiert		Gesund		Gesamt	
	Geschlecht		Geschlecht		Geschlecht		Gesamt	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Männlich	18	90,0	70	84,3	22	75,9	110	83,3
Weiblich	2	10,0	13	15,7	7	24,1	22	16,7
Gesamt	20	100,0	83	100,0	29	100,0	132	100,0
	Alter (Jahre)		Alter (Jahre)		Alter (Jahre)		Gesamt	
Mittelwert	55,9 ± 9,3		59,4 ± 9,9		46,2 ± 15,2*		56,0 ± 12,3	
Minimum	42		23		18		18	
Maximum	74		75		79		79	

*. Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau 0,05 signifikant.

3.2.2 Tumorlokalisation und Ausdehnung

Bezogen auf alle untersuchten Tumorpatienten („Krank“ und „Therapiert“, n = 103) sind Larynx mit 35,0 % (n = 36), gefolgt von Oropharynx mit 32,0 % (n = 33) und von Hypopharynx mit 13,6 % (n = 14) die häufigsten Manifestationsorte eines Kopf-Hals-Karzinoms. Die vierthäufigste Manifestationsart bildeten die Mehretagentumore mit 9,7 % (n = 10). Hierbei ist bei 4 Patienten (4 %) ein Wachstum über Larynx und Oropharynx, bei 3 Patienten (3 %) über Hypo- und Oropharynx, bei 2 Patienten (2 %) über Larynx, Hypo- und Oropharynx sowie bei einem Patienten (1 %) ein Wachstum über Oro- und Nasopharynx diagnostiziert worden. Ein Patient (1 %) litt unter Halslymphknotenmetastasen eines malignen Melanoms bei primär papillärem Schilddrüsenkarzinom und wird unter „Zweitkarzinom“ aufgeführt. Ein weiterer Patient (1 %) fiel unter die Bezeichnung „CUP“ (Cancer of unknown primary) bei diagnostizierter Halslymphknotenmetastase mit unbekanntem Primum (Abb. 3.1). Eine metachrone oder simultane Tumormanifestation im Sinne einer Feldkanzerisierung konnte im untersuchten Patientenstamm nicht gefunden werden.

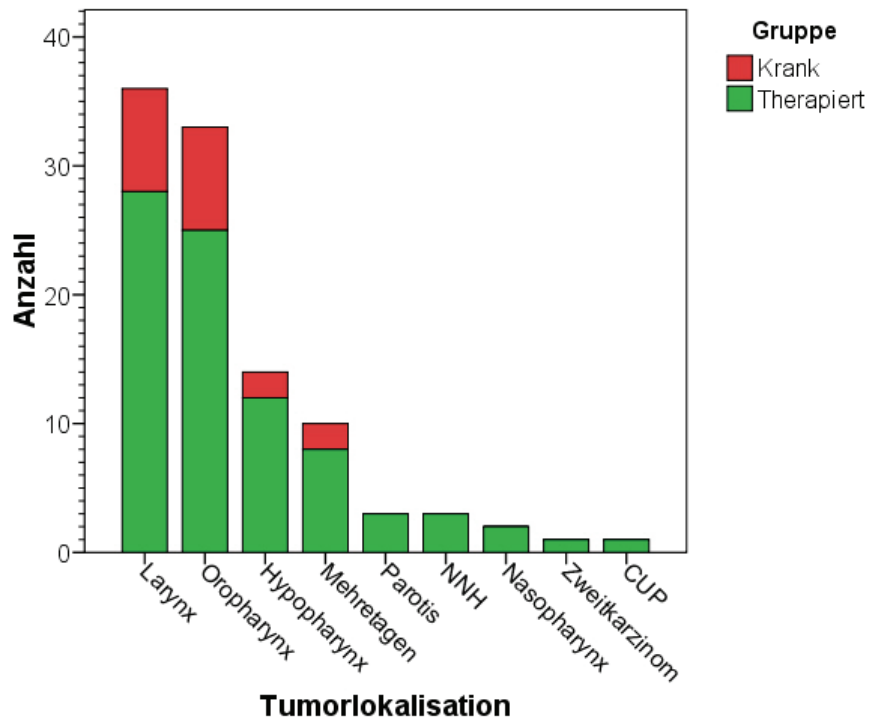


Abb. 3.1: Verteilung der Tumorlokalisationen.

Der häufigste Manifestationsort eines malignen Kopf-Hals-Tumors bei den untersuchten Probanden (n = 103) war mit 35,0% (n = 36) der Larynx gefolgt vom Oropharynx mit 32,0 % (n = 33) und Hypopharynx mit 13,6 % (n = 14). Am seltensten waren im untersuchten Patientengut das Zweitkarzinom und CUP mit je einem Vertreter.

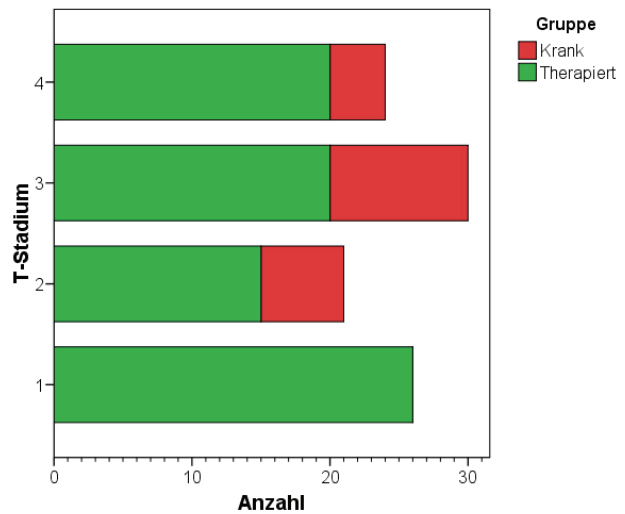
(CUP = Cancer of unknown primary; NNH = Nasennebenhöhlen)

Unter allen Tumorpatienten ist das Stadium T3 mit 29,7 % (n = 30) am häufigsten vertreten, gefolgt vom T1-Stadium mit 25,7 % (n = 26) und dem T4-Stadium mit 23,8 % (n = 24). In der Gruppe „Therapiert“ hatten die meisten Patienten (20,9 %, n = 26) einen T1-Tumor. Ein Carcinoma in situ wurde bei keinem der Probanden festgestellt. (Abb. 3.2a).

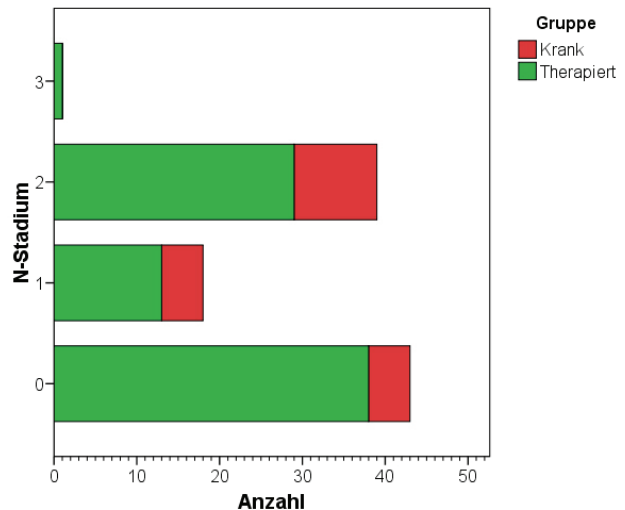
Mit 42,6 % (n = 43) bildeten die Patienten ohne nachweisbare regionäre Lymphknotenmetastasen (N0) den Hauptanteil aller Krebspatienten. Das N2-Stadium war mit 38,6 % (n = 39) am zweithäufigsten, gefolgt vom N1-Stadium mit 17,8 % (n = 18) und dem N3-Stadium mit 1,0 % (n = 1) (Abb. 3.2b).

Von allen Tumorpatienten hatten nur zwei Probanden (2,0 %) Fernmetastasen (M1). Der Großteil von 98,0 % (n = 99) wies ein M0-Stadium auf (Abb. 3.2c).

a) lokale Tumorausdehnung, T-Stadium



b) regionäre Lymphknotenmetastasierung, N-Stadium



c) Fernmetastasierung, M-Stadium

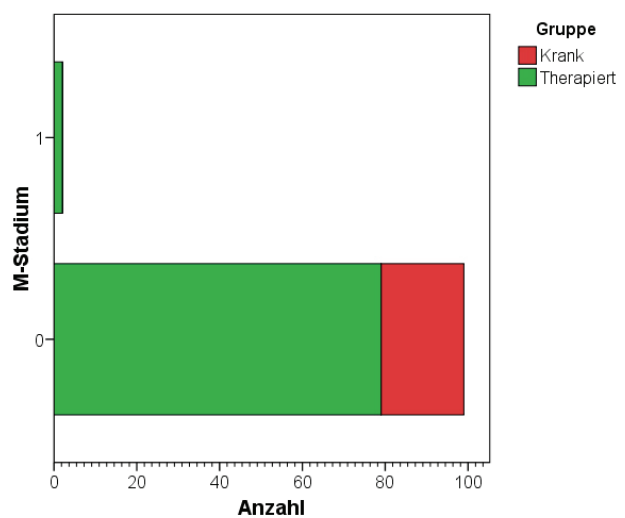


Abb. 3.2 a-c: Verteilung der Tumorstadien (TNM).

Bei akut erkrankten Patienten („Krank“, n = 20) zeigte sich als initiale Tumorausdehnung am häufigsten das T3-Stadium mit % (n =). Auch nach Zusammenfügen der beiden Tumorgruppen („Krank“ und „Therapiert“, n = 103) zeigte sich ein T3-Stadium (29,7 %, n = 30) als häufigstes Stagingkriterium. „N0-Hälsen“ waren bei 42,6 % (n = 43) gefolgt vom N2-Stadium bei 38,6 (n = 39) unter allen Tumorpatienten am häufigsten. Bei 98 % (n = 99) aller Tumorpatienten zeigten sich keine Fernmetastasen (M0).

Somit ergab sich für die klinische Tumorstadieneinteilung nach UICC (Wittekind et al. 2002) ein Überwiegen des fortgeschrittenen Stadiums IV mit 50,5 % (n = 51). Am zweithäufigsten wurde bei 22 Patienten (21,8 %) das Stadium III, gefolgt von Stadium I mit 17,8 % (n = 18) und Stadium II mit 9,9 % (n = 10) gesehen (Abb. 3.3)

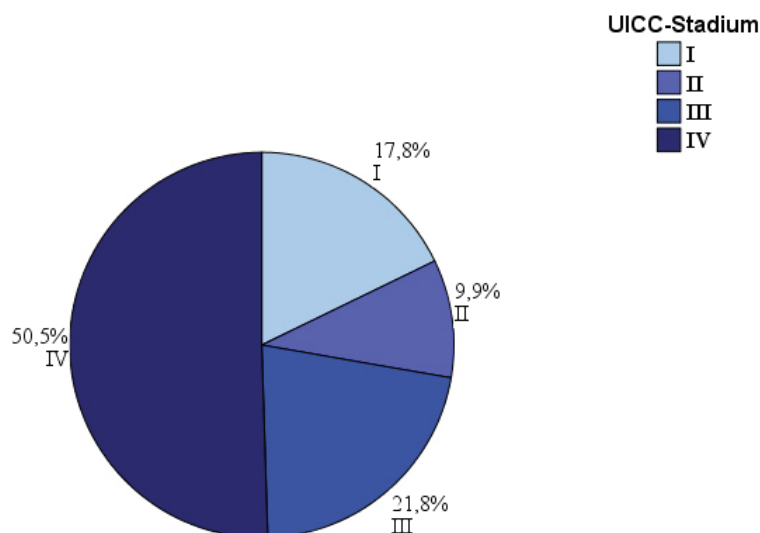


Abb. 3.3: Verteilung der UICC-Tumorstadien.

Nach dem TNM-Staging zeigte sich in der klinischen UICC-Tumorstadienverteilung aller untersuchten Tumorpatienten der Gruppen „Krank“ und „Therapiert“ (n = 103) mit 50,5 % (n = 51) das fortgeschrittene Stadium IV gefolgt von Stadium III (21,8 %, n = 22) und dem Stadium I mit 17,8 % (n = 18). Das Stadium II war mit 9,9 % (n = 10) unter allen untersuchten Tumorpatienten das Seltenste.

3.2.3 Histologische Ausprägung der Tumore

Plattenepithelkarzinome machten mit 97,1 % (n = 99) die häufigste histologische Erscheinungsform aller Tumore bei den untersuchten Krebspatienten (n = 103) aus. Bei jeweils einem Patienten (1,0 %) wurde ein adenoid-zystisches Karzinom des Oropharynx, ein Non-Hodgkin-Lymphom bzw. ein papilläres Schilddrüsenkarzinom diagnostiziert (Abb. 3.4).

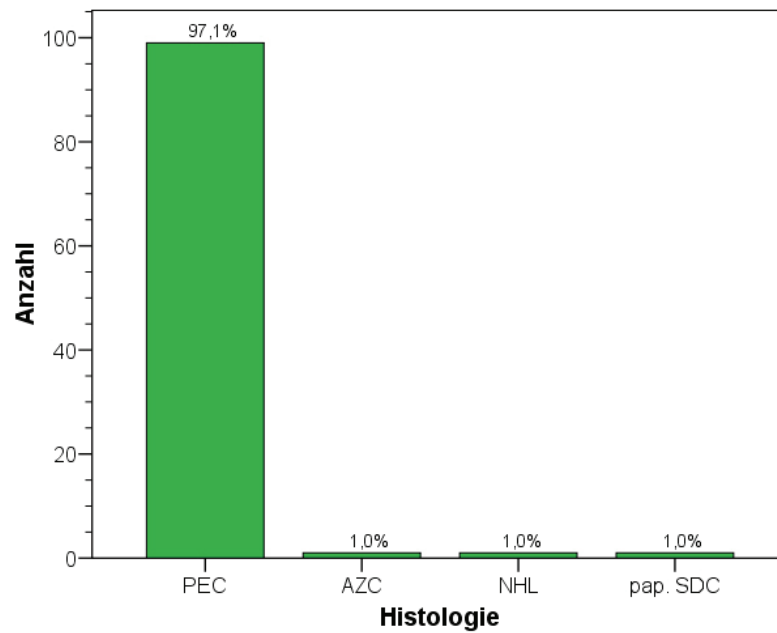


Abb. 3.4: Histologische Einteilung der Tumoren.

Unter allen untersuchten Tumorpatienten („Krank“ und „Therapiert“, n = 103) zeigte sich ein deutliches Überwiegen (97,1 %, n = 99) des Plattenepithelkarzinoms in der histologischen Ausprägung maligner Kopf-Hals-Tumore. Unter 103 Tumorpatienten waren jeweils nur 1 % (n = 1) als ein adenoidzystisches Karzinom, ein Non-Hodgkin-Lymphom und ein papilläres Schilddrüsenkarzinom vertreten.

(AZC = adenoid-zystisches Karzinom, NHL = Non-Hodgkin-Lymphom, pap. SDC = papilläres Schilddrüsenkarzinom, PEC = Plattenepithelkarzinom)

Die Verteilung der unterschiedlichen histopathologischen Differenzierungsgrade der Tumore aller Krebspatienten (n = 103) ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Hierbei zeigte sich bei 70,6 % (n = 72) ein mäßiger Differenzierungsgrad (G2). Schlecht differenzierte (G3) Tumoren wurden bei 19,6 % (n = 20) und gut differenzierte (G1) bei 5,9 % (n = 6) der Patienten gesehen. Undifferenzierte Karzinome (G4) waren am seltensten und bei insgesamt 4 Patienten (3,9 %) diagnostiziert.

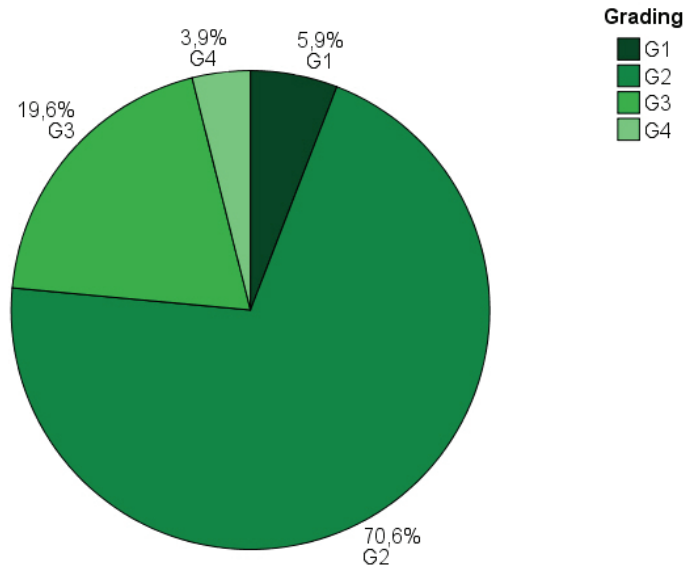


Abb. 3.5: Verteilung der histopathologischen Tumordifferenzierung („Grading“).

Unter allen Tumoren der untersuchten Patienten („Krank“ und „Therapiert“, n = 103) waren diejenigen mit mäßigem Differenzierungsgrad (G2) und 70,6 % (n = 72) gefolgt von schlecht differenzierten (G3) Tumoren (19,6 %, n = 20) am häufigsten. Mit 3,9 % (n = 4) bildeten undifferenzierte Karzinome (G4) eine eher selten vertretene Differenzierungsform.

3.2.4 Therapiearten und rezidivfreie Zeit

Die unterschiedlichen Therapiearten der behandelten Patienten der Gruppe „Therapiert“ (n = 83) sind in Abbildung 3.6 dargestellt. Am häufigsten erhielten die Patienten eine operative Therapie, gefolgt von einer adjuvanten Radiochemotherapie (43,4 %, n = 36). Eine adjuvante Bestrahlung nach erfolgter Operation erhielten 25 Patienten (30,1 %). Am dritthäufigsten wurde bei 21,7 % (n = 18) der Patienten eine alleinige Operation durchgeführt. Somit war bei 88,0 % (n = 73) die chirurgische Resektion des Tumors zentraler Bestandteil des Therapiekonzeptes. Bei jeweils 2 Patienten (jeweils 2,7 %) erfolgte eine definitive Radio- bzw. Radiochemotherapie. Beim untersuchten Patientenstamm erhielt keiner neoadjuvante Therapiemaßnahmen und somit auch keine Induktionstherapie. Die Chemotherapien wurden mit Cisplatin und 5-Fluorouracil sowohl einzeln als auch in Kombination durchgeführt.

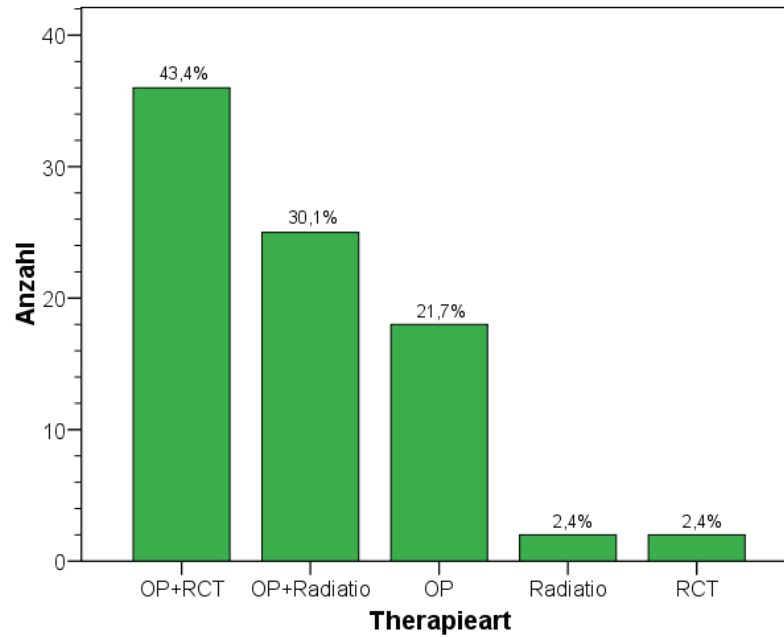


Abb. 3.6: Verteilung der Therapiearten.

Bei Patienten der Gruppe „Therapiert“ (n = 83) war die Operation mit adjuvanter kombinierter Radiochemotherapie mit 43,4 % (n = 36) gefolgt von postoperativer Radiatio mit 30,1 % (n = 25) die häufigste Therapievariante. Eine definitive Radiochemotherapie war ebenso wie die alleinige Bestrahlung bei jeweils 2 Patienten (2,4 %) eine seltene Therapieart. Bei 18 Patienten (21,7 %) wurde die alleinige chirurgische Therapie gewählt.

(OP = Operation, Radiatio = Strahlentherapie, RCT = Radiochemotherapie).

Das rezidivfreie Intervall nach Abschluß der Therapie bei Patienten der Gruppe „Therapiert“ erstreckte sich von 1 bis 276 Monaten bei einem Mittelwert von 43,1 Monaten bis zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Unter den männlichen Patienten waren 264 Monate und unter den weiblichen 276 Monate Rezidivfreiheit die am längsten beobachteten Intervalle. Insgesamt waren von den 83 untersuchten therapierten Patienten 18 (14,9 %) \geq 5 Jahre (60 Monate) tumorfrei (Abb. 3.7).

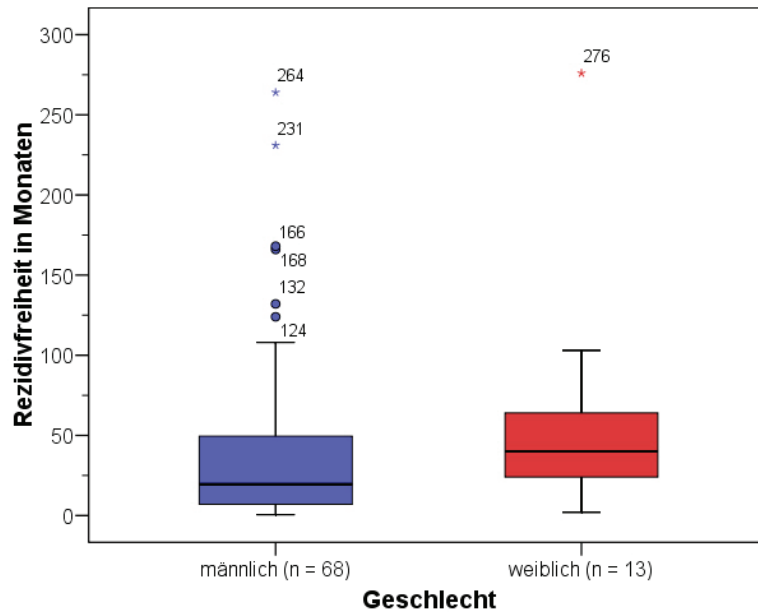


Abb. 3.7: Verteilung der rezidivfreien Zeit (Zeit nach Therapieabschluß).

Bei Patienten der Gruppe „Therapiert“ zeigte sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme im Mittel eine rezidivfreie Zeit von 43,1 Monaten. Das am längsten beobachtete rezidivfreie Intervall nach Abschluß der Tumorthherapie war 276 Monate. Von den untersuchten 81 therapierten Patienten waren 18 (22,2 %) ≥ 5 Jahre ohne lokoregionäres Tumorrezidiv.

3.3 Ergebnisse der FACS-Analyse

Im Durchflußzytometer wurden die entsprechenden Ereignisse gezählt und deren Verteilung tabellarisch bzw. graphisch dargestellt. Nach Überprüfung auf Normalverteilung der Werte mittels Kolmogorov-Smirnov-Test wurde ein Bonferroni-Test als einfache Varianzanalyse für Gruppenkombinationen durchgeführt. Hierbei zeigte sich ein hoch signifikanter Unterschied des mittleren NK-Zellzahlanteils an PBMC der Gruppe „Therapiert“ (25,93 % \pm 11,68) gegenüber den Gruppen „Krank“ (15,47 % \pm 7,31, $p < 0,001$) und „Gesund“ (15,41 % \pm 6,87, $p < 0,001$) (Abb.3.8).

In der Analyse der CD3-positiven Ereignisse, die dem T-Zellanteil entsprechen, zeigte sich ein sehr signifikanter Unterschied des mittleren Anteils der T-Zellen an PBMC der Gruppe „Gesund“ (63,38 % \pm 10,38) gegenüber der Gruppe „Therapiert“ (55,00 % \pm 11,93, $p < 0,01$). In den weiteren Gruppenvergleichen mit der Gruppe „Krank“ (61,50 % \pm 10,14) gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich des T-Zellanteils an PBMC ($p > 0,05$) (Abb. 3.9).

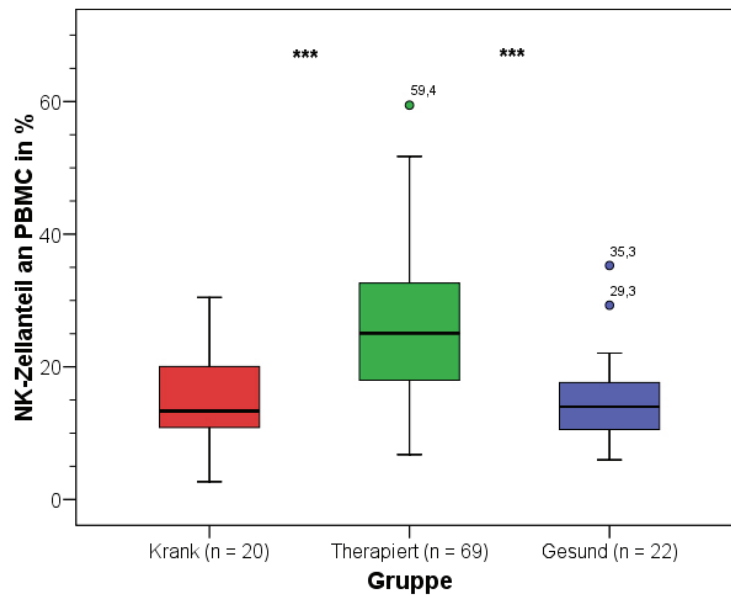


Abb. 3.8: NK-Zellanteil an PBMC nach klinischen Gruppen.

Die Abbildung zeigt Boxplots der Verteilung des Anteils der NK-Zellen an PBMC nach klinischen Gruppen. Es wird ein hochsignifikant (***) erhöhter NK-Zellanteil bei therapierten, rezidivfreien Patienten im Vergleich zu den Gruppen „Krank“ und „Gesund“ deutlich.

Mittelwert \pm Standardabweichung: „Krank“ 15,47 % \pm 7,31, „Therapiert“ 25,93 % \pm 11,68, „Gesund“ 15,41 % \pm 6,87.

*** = $p < 0,001$.

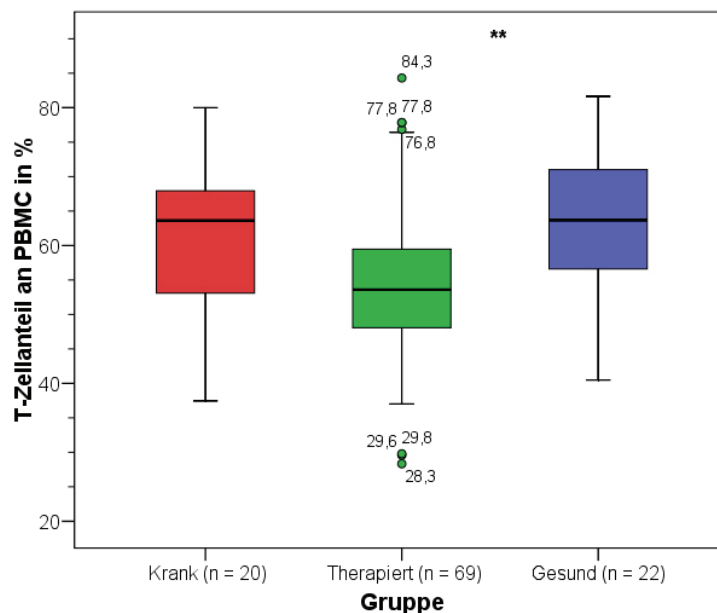


Abb. 3.9: T-Zellanteil an PBMC nach klinischen Gruppen.

Dargestellt ist die Verteilung des Anteils der T-Zellen an PBMC nach klinischen Gruppen. Es wird ein sehr signifikant (**) erhöhter T-Zellanteil bei gesunden Probanden im Vergleich zur Gruppe „Therapiert“ sichtbar.

Mittelwert \pm Standardabweichung: „Krank“ 61,50 % \pm 10,14, „Therapiert“ 55,00 % \pm 11,93, „Gesund“ 63,38 % \pm 10,38.

** = $p < 0,01$.

3.4 Korrelationsanalyse

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen NK-Zellanteil und anderen klinischen Parametern aufzudecken, wurde nach Überprüfung auf Normalverteilung der Werte mittels Kolmogorov-Smirnov-Test eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Korrelationskoeffizient nach Spearman ($r = 0,438$, $p = < 0,05$) im Rangkorrelationsvergleich zwischen NK-Zellanteil an PBMC der Gruppe „Gesund“ und dem Geschlecht der Probanden. Es lag hierbei eine geringe Korrelation zwischen dem erhöhten Anteil natürlicher Killerzellen an peripheren mononukleären Zellen und dem weiblichen Geschlecht der gesunden Probanden vor (Tab. 3.2). Gesunde Frauen hatten im Durchschnitt einen signifikant erhöhten NK-Zellanteil an PBMC von $20,10 \pm 8,76$ % im Vergleich zu Männern der Gruppe „Gesund“ mit durchschnittlich $13,21 \pm 4,66$ % NK-Zellen an PBMC. Die weiteren Vergleiche zeigten keine signifikanten Korrelationen in den jeweiligen klinischen Gruppen. Somit konnte auch kein direkter Zusammenhang zwischen erhöhtem NK-Zellanteil und rezidivfreier Zeit nach erfolgter Tumorthherapie in der Gruppe „Therapiert“ gesehen werden. Die Tabelle 3.2 zeigt den Gesamtüberblick der gruppenspezifischen Korrelationsanalyse.

Zur weiteren Abklärung der Alters- bzw. Geschlechtsabhängigkeit zeigte sich bei Betrachtung des Zusammenhangs zwischen Alter und NK-Zellanteil bezogen auf alle Probanden (ohne Gruppen- oder Geschlechtsspezifizierung) eine signifikant geringe Korrelation nach Spearman ($r = 0,216$, $p < 0,05$). Der Anteil der NK-Zellen an PBMC (Gesamtdurchschnitt: $21,96 \pm 11,35$ %) steigt demnach mit dem Alter und hat in der 7. Lebensdekade ein Maximum von $26,18 \pm 12,45$ % (Abb 3.10). Die geschlechtsspezifische Analyse zeigte ohne Gruppenspezifizierung bei männlichen Probanden eine geringe ($r = 0,22$, $p < 0,05$) bei weiblichen Probanden keine Korrelation ($r = 0,058$, $p > 0,05$) zwischen NK-Zellanteil und Alter.

Tab. 3.2: Rangkorrelationsvergleich des NK-Zellanteils an PBMC und klinischen Parametern.

Rangkorrelation nach Spearman-Rho	NK-Zellanteil an PBMC der Gruppe „Krank“	NK-Zellanteil an PBMC der Gruppe „Therapiert“	NK-Zellanteil an PBMC der Gruppe „Gesund“
Alter			
Korrelationskoeffizient	-,065	,132	-,040
Sig. (2-seitig)	,785	,278	,859
n	20	69	22
Geschlecht			
Korrelationskoeffizient	-,116	-,097	,438*
Sig. (2-seitig)	,627	,427	,041
n	20	69	22
Lokalisation			
Korrelationskoeffizient	,053	-,047	.
Sig. (2-seitig)	,824	,703	.
n	20	69	0
T-Stadium			
Korrelationskoeffizient	,179	,004	.
Sig. (2-seitig)	,451	,977	.
n	20	67	0
N-Stadium			
Korrelationskoeffizient	,080	,196	.
Sig. (2-seitig)	,738	,113	.
n	20	67	0
M-Stadium			
Korrelationskoeffizient	.	-,204	.
Sig. (2-seitig)	.	,098	.
n	20	67	0
UICC-Stadium			
Korrelationskoeffizient	,160	,082	.
Sig. (2-seitig)	,501	,510	.
n	20	67	0
Grading			
Korrelationskoeffizient	,048	,120	.
Sig. (2-seitig)	,842	,329	.
n	20	68	0
Histologie			
Korrelationskoeffizient	.	,055	.
Sig. (2-seitig)	.	,658	.
n	20	68	0
Therapieart			
Korrelationskoeffizient	.	,107	.
Sig. (2-seitig)	.	,380	.
n	0	69	0
rezidivfreie Zeit			
Korrelationskoeffizient	.	-,060	.
Sig. (2-seitig)	.	,632	.
n	0	67	0

* Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

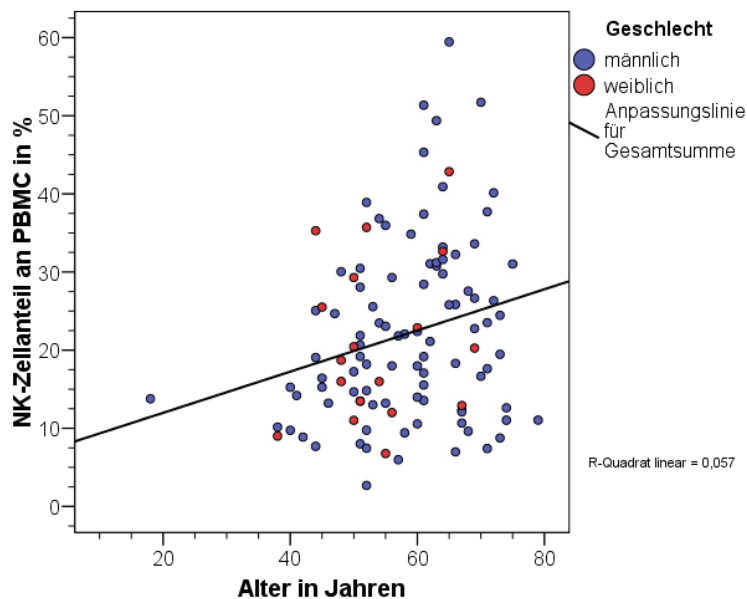


Abb. 3.10: Streudiagramm der Korrelation NK-Zellanteil – Alter.

Die Abbildung verdeutlicht eine signifikant geringe Korrelation des Anteils von NK-Zellen an PBMC und dem Alter ohne Gruppenspezifizierung. Es zeigt sich bei einem Durchschnittsanteil der NK-Zellen von $21,96 \% \pm 11,35$ nach einer altersabhängigen Zunahme ein Maximum von $26,18 \% \pm 12,45$ in der 7. Dekade.

Korrelationskoeffizient nach Spearman $r = 0,216$, $p = < 0,05$;
lineare Anpassungslinie mit R-Quadrat = $0,057$.

Um den Zusammenhang des NK-Zellanteils an PBMC zwischen klinischem Status und Alter der Patienten abzuklären, wurde eine multiple lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Hier zeigte sich in der schrittweisen Analyse ein standardisierter Beta-Koeffizient von $0,239$ ($p = 0,012$) in der Analyse der unabhängigen Variable „Alter“ und der abhängigen Variable „NK-Zellanteil an PBMC“. Die unabhängige Variable „klinische Gruppe“ übte demnach keinen Einfluß auf den NK-Zellanteil an PBMC aus (Beta In = $0,019$; $p = 0,838$).

3.5 Probenauswahl für die Chipanalyse

Für die vergleichende Untersuchung der Expressionsniveaus der Genprodukte zwischen den jeweiligen klinischen Gruppen anhand von Gesamt-RNA aus NK-Zellen wurden pro Gruppe jeweils vier repräsentative Probanden herangezogen. Bei allen Patienten wurde ein PEC diagnostiziert. Sie entsprachen den unter 2.2.12. angegebenen Einschlusskriterien. Eine Übersicht der klinischen Charakteristika gibt Tabelle 7.1 im Anhang (S. 109).

3.6 Expressionsprofiling

Im Folgenden werden diejenigen Genprodukte dargestellt, die nach willkürlich festgelegten cut-off Werten einen Expressionsniveauunterschied im jeweiligen Gruppenvergleich aufwiesen. Insgesamt wurden hierbei 122 (je nach Gruppenvergleich und Expressionsrichtung 3 bis 47) unterschiedliche Probesets identifiziert, die in mindestens 15 von 16 Kreuzvergleichen einen Detection Call „P“ und einen im Mittel mindestens 2-fachen Expressionunterschied (Fold Change $\geq 2,0$ bzw. $\leq -2,0$) im Vergleich zum Baseline Array aufwiesen (Tabellen 3.3 – 8).

3.6.1 Gruppenvergleich „Therapiert vs. Krank“

Im Gruppenvergleich der Genexpression auf Gesamtgenombasis zeigten sich innerhalb der Einschlusskriterien 9 Probesets mit unterschiedlichem Expressionsniveau. Nach funktioneller Interpretation (biological process term) durch die GeneOntology (GO) Online-Genomdatenbank konnte den differenziell exprimierten Genen mindestens ein biologischer Prozess zugeteilt werden, an welchem die Genprodukte beteiligt sind (Abb. 3.11).

Hierbei waren im Vergleich zum Baseline-Array „Therapiert“ im Experimental-Array „Krank“ 6 Gene unterexprimiert (Tab. 3.3). Danach hatten die Probanden der Gruppe „Therapiert“ eine im Mittel 8,5-fach höhere Expression des an Chemotaxis beteiligten Gens PROK2 bzw. 6,3-fach höhere Expression des Transkriptionsfaktors MAFB im Vergleich zu den Patienten der Gruppe „Krank“.

Im selben Gruppenvergleich konnten 3 Gene identifiziert werden, die in der Gruppe „Krank“ hochreguliert waren (Tab. 3.4). Unter anderem war der Natürliche Killerzellrezeptor KLRC3, der für zelluläre Abwehr verantwortlich ist, bei „kranken“ Patienten im Mittel 3,2-fach überexprimiert. Ebenso waren Gene für Hämatopoese (DLL1) und Zellproliferation (CDK5R1) in NK-Zellen „kranker“ Patienten relativ hochreguliert.

Einen genauen Überblick über die Verteilung der Expressionsniveauunterschiede und Charakterisierung der identifizierten differenziell exprimierten Gene des Gruppenvergleichs „Therapiert vs. Krank“ geben die Abbildung 3.11 und die Tabellen 3.3 und 3.4.

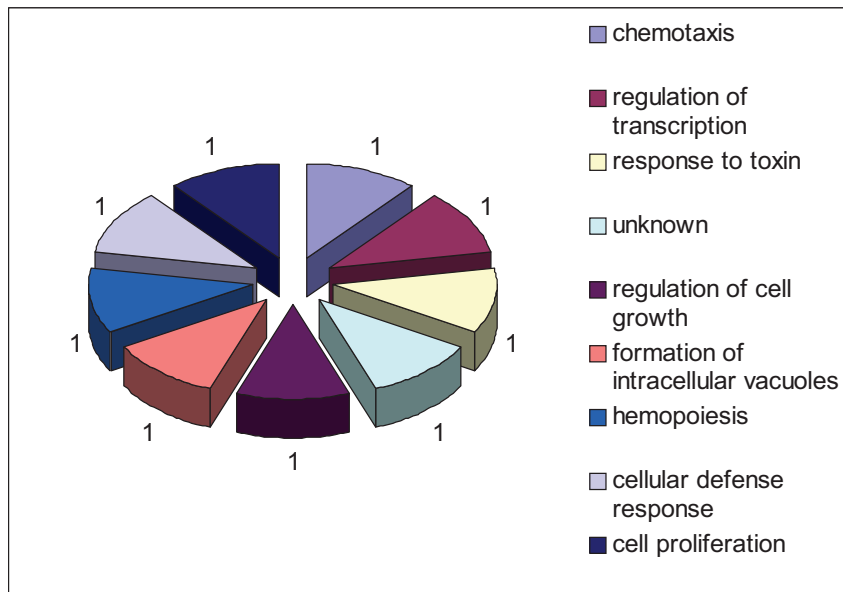


Abb. 3.11: Differenziell exprimierte Gene des Gruppenvergleichs „Therapiert vs. Krank“ nach funktioneller Interpretation (GO biological process).

Dargestellt ist die Verteilung der biologischen Funktionen der differenziell exprimierten Gene (n = 9), die jeweils einer unterschiedlichen Aufgabe attribuiert werden können. Es zeigen sich u. a. jeweils ein Genprodukt (11 %) für Chemotaxis, Transkriptionsregulation, Hämatopoese und Zellproliferation.

Tab. 3.3: Differenziell exprimierte Gene des Gruppenvergleichs „Therapiert vs. Krank“, Cange Call: Decrease.

Filterungskriterien sind ein Detection Call „A“ in mindestens 15 von 16 Expressionsvergleichen sowie ein Fold Change-Mittelwert) $\leq -2,0$.

Probe Set ID	Gene symbol	Gene title	Function	Chromosomal location	Fold Change ($\chi \pm \sigma$)*
232629_at	PROK2	prokineticin 2	chemotaxis	3p21.1	-8,46 \pm 9,84
222670_s_at	MAFB	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)	regulation of transcription	20q11.2-q13.1	-6,29 \pm 6,65
209616_s_at	CES1	carboxylesterase 1 (monocyte/macrophage serine esterase 1)	response to toxin	16q13-q22.1	-5,09 \pm 3,17
224917_at	MIRN21	microRNA 21	unknown (gene expression)	17q23.1	-4,86 \pm 2,73
227697_at	SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3	regulation of cell growth	17q25.3	-4,84 \pm 3,96
1569003_at	TMEM49	transmembrane protein 49	formation of intracellular vacuoles	17q23.1	-3,78 \pm 1,89

* χ = Mittelwert, σ = Standardabweichung.

Tab. 3.4: Differenziell exprimierte Gene des Gruppenvergleichs „Therapiert vs. Krank“, Change Call: Increase.

Filterungskriterien sind ein Detection Call „P“ in mindestens 15 von 16 Expressionsvergleichen sowie ein Fold Change-Mittelwert $\geq 2,0$.

Probe Set ID	Gene symbol	Gene title	Function	Chromosomal location	Fold Change ($\chi \pm \sigma$)*
224215_s_at	DLL1	delta-like 1 (Drosophila)	hemopoiesis	6q27	4,29 \pm 2,31
207723_s_at	KLRC3	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 3	cellular defense response	12p13.2	3,24 \pm 1,16
204995_at	CDK5R1	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)	cell proliferation	17q11.2	2,66 \pm 0,64

* χ = Mittelwert, σ = Standardabweichung.

3.6.2 Gruppenvergleich „Krank vs. Gesund“

Im Gruppenvergleich der Genexpression auf Gesamtgenombasis zeigten sich innerhalb der Einschlusskriterien 47 Probesets mit unterschiedlichem Expressionsniveau. Nach funktioneller Interpretation (biological process term) durch die GeneOntology (GO) Online-Genomdatenbank konnte den differenziell exprimierten Genen mindestens ein biologischer Prozess zugeteilt werden, an welchem die Genprodukte beteiligt sind (Abb. 3.12). Es zeigte sich, dass vor allem Gene der Funktionen Immunantwort ($n = 11$), Chemotaxis ($n = 4$), Zelladhäsion ($n = 4$) sowie MAPK-Regulation ($n = 3$) und Apoptose assoziierte Genprodukte ($n = 3$) differenziell exprimiert waren.

Im Vergleich zum Experimental-Array „Gesund“ waren im Baseline-Array „Krank“ 13 Gene herunterreguliert (Tab. 3.5). Danach hatten die Probanden der Gruppe „Krank“ eine im Mittel 85,3-fache Überexpression des für Immunantwort verantwortlichen Gens TRA@ bzw. eine 10,7-fache höhere Expression des Interleukin 7-Rezeptors. Auffällig waren ebenfalls eine 11,9- bzw. 5,3-fache Hochregulierung der für Chemotaxis verantwortlichen Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR3.

Im selben Gruppenvergleich konnten 34 Gene identifiziert werden, die in der Gruppe „Gesund“ hochreguliert waren (Tab. 3.6). Unter anderem waren das für ADCC verantwortliche Gen FCAR 24,3-fach, das mit Phagozytose assoziierte FCGR1A 18,7-fach und das zur Immunantwort attribuierte Gen FCGR1B 16,6-fach in NK-Zellen „gesunder“ Probanden überexprimiert. Ebenso war eine 7,3- bzw. 6,9-fache Hochregulierung der zur MAPK-Regulation beitragenden Gene TRIB1 und FPR1, wobei letzterer Rezeptor den biologischen Prozess der Chemotaxis fördert.

Einen genauen Überblick über die Verteilung der Expressionsniveauunterschiede und Charakterisierung der identifizierten differenziell exprimierten Gene des Gruppenvergleichs „Krank vs. Gesund“ geben die Abbildung 3.12 und die Tabellen 3.5 und 3.6.

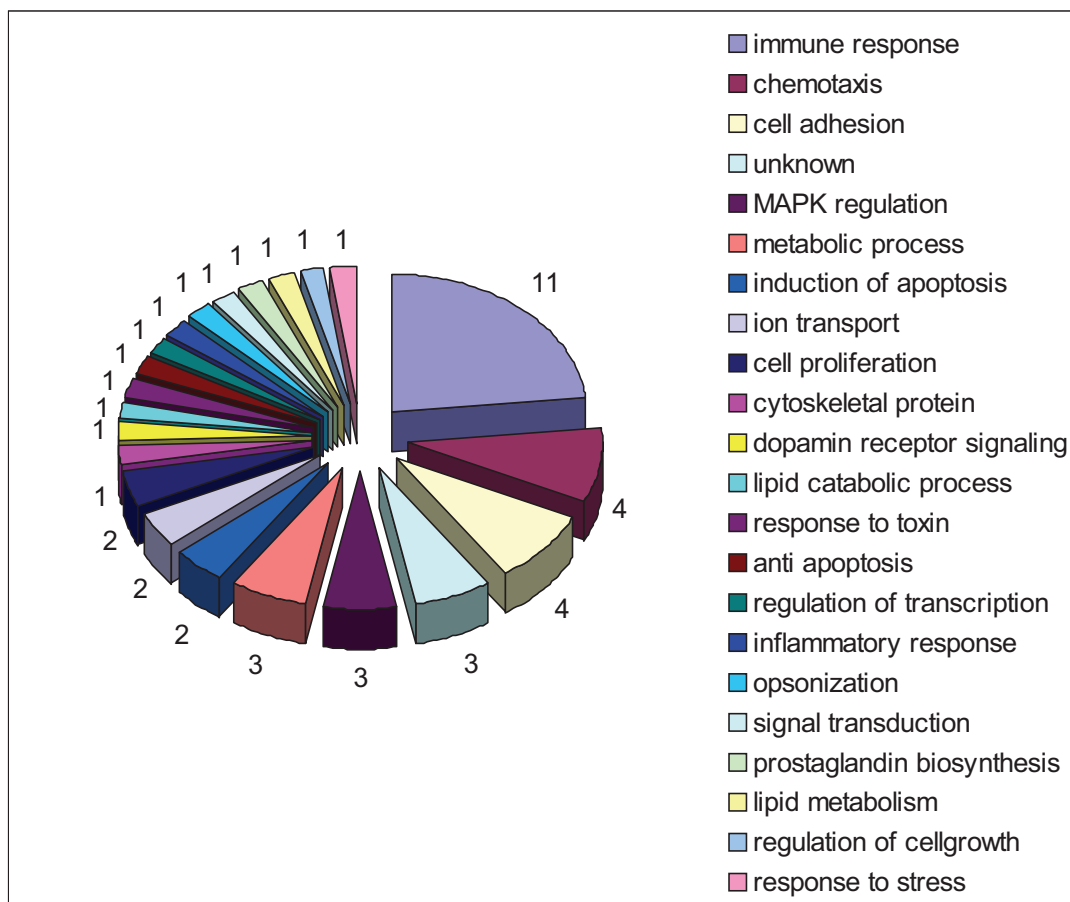


Abb. 3.12: Differenziell exprimierte Gene des Gruppenvergleichs „Krank vs. Gesund“ nach funktioneller Interpretation (GO biological process).

Dargestellt ist die Verteilung der biologischen Funktionen der differenziell exprimierten Gene (n = 47). Den Großteil machen Gene aus, deren Produkte zur Immunantwort (n = 11, 23 %), Chemotaxis (n = 4, 9 %) und Zelladhäsion (n = 4, 9 %). Desweiteren sind u. a. 3 (6 %) Genprodukte der MAPK-Regulation und jeweils 2 (4 %) der Zellproliferation und Apoptoseinduzierung zu attribuieren.

Tab. 3.5: Differenziell exprimierte Gene des Gruppenvergleichs „Krank vs. Gesund“, Change Call: Decrease.

Filterungskriterien sind ein Detection Call „A“ in mindestens 15 von 16 Expressionsvergleichen sowie ein Fold Change-Mittelwert $\leq -2,0$.

Probe Set ID	Gene symbol	Gene title	Function	Chromosomal location	Fold Change ($\chi \pm \sigma$)*
234013_at	TRA@	YME1-like 1 (S. cerevisiae)	immune response	14q11.2	-85,34 \pm 28,23
212730_at	DMN	Desmuslin	cytoskeletal protein	15q26.3	-20,97 \pm 31,20
207979_s_at	CD8B	CD8b molecule	immune response	2p12	-12,87 \pm 9,30

206337_at	CCR7	chemokine (C-C motif) receptor 7	chemotaxis	17q12-q21.2	-11,97 ± 12,26
226218_at	IL7R	interleukin 7 receptor	Immune response	5p13	-10,70 ± 8,85
203413_at	NELL2	NEL-like 2 (chicken)	cell adhesion	12q13.11-q13.12	-10,28 ± 7,47
230489_at	CD5	CD5 molecule	induction of apoptosis	11q13	-8,36 ± 5,97
217147_s_at	TRAT1	T cell receptor associated transmembrane adaptor 1	immune response	3q13	-5,95 ± 3,92
207681_at	CXCR3	chemokine (C-X-C motif) receptor 3	chemotaxis	Xq13	-5,28 ± 2,15
209570_s_at	D4S234E	DNA segment on chromosome 4 (unique) 234 expressed sequence	dopamin receptor signaling pathway	4p16.3	-4,12 ± 2,57
222392_x_at	PERP	PERP, TP53 apoptosis effector	apoptosis	6q24	-3,98 ± 1,83
204642_at	S1PR1	sphingosine-1-phosphate receptor 1	chemotaxis	1p21	-3,51 ± 2,03
202746_at	ITM2A	integral membrane protein 2°	unknown (t-cell activation)	Xq13.3-Xq21.2	-2,81 ± 0,96

* χ = Mittelwert, σ = Standardabweichung.

Tab. 3.6: Differenziell exprimierte Gene des Gruppenvergleichs „Krank vs. Gesund“, Change Call: Increase.

Filterungskriterien sind ein Detection Call „P“ in mindestens 15 von 16 Expressionsvergleichen sowie ein Fold Change-Mittelwert $\geq 2,0$.

Probe Set ID	Gene symbol	Gene title	Function	Chromosomal location	Fold Change ($\chi \pm \sigma$)*
211307_s_at	FCAR	Fc fragment of IgA, receptor for	immune response, (ADCC)	19q13.2-q13.4	24,25 ± 38,96
216950_s_at	FCGR1A	Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor (CD64)	immune response, (phagocytosis)	1q21.2-q21.3	18,66 ± 16,29
214511_x_at	FCGR1B	Fc fragment of IgG, high affinity Ib, receptor (CD64)	immune response	1p11.2	16,55 ± 13,93
205568_at	AQP9	aquaporin 9	immune response	15q22.1-q22.2	10,79 ± 9,86
235568_at	C19orf59	chromosome 19 open reading frame 59	unkown, (immune response)	19p13.2	9,50 ± 8,19
210119_at	KCNJ15	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 15	potassium ion transport	21q22.2	9,20 ± 9,39
206111_at	HLA-DQB1 HLA-DQB2 HLA-DRB1 HLA-DRB2 HLA-DRB3 HLA-DRB4 HLA-DRB5 RNASE2 ZNF749	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1 & 2 major histocompatibility complex, class II, DR beta 1, 2, 3, 4 & 5, ribonuclease, RNase	cheomtaxis, immune response, antigen presenting, transcrption regulation,	6p21.3 14q24-q31 19q13.43	8,67 ± 7,45

	LOC730415 hCG_199895 7	A family, 2 (liver, eosinophil-derived neurotoxin)			
	LOC1001334 84	zinc finger protein 749			
	LOC1001335 83	...			
	LOC1001336 61				
	LOC1001338 11				
202912_at	ADM	Adrenomedullin	cell proliferation	11p15.4	8,54 ± 6,46
202241_at	TRIB1	tribbles homolog 1 (Drosophila)	MAPK regulation	8q24.13	7,31 ± 5,01
218454_at	FLJ22662	hypothetical protein FLJ22662	lipid catabolic process	12p13.1	6,98 ± 4,45
205119_s_at	FPR1	formyl peptide receptor 1	MAPK activity, (chemotaxis)	19q13.4	6,97 ± 5,66
225987_at	STEAP4	STEAP family member 4	ion transport	7q21.12	6,94 ± 3,83
206488_s_at	CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	cell adhesion	7q11.2	6,81 ± 3,87
219434_at	TREM1	triggering receptor expressed on myeloid cells 1	immune response	6p21.1	6,80 ± 6,15
211571_s_at	VCAN	Versican	cell adhesion	5q14.3	6,07 ± 4,45
209616_s_at	CES1	carboxylesterase 1 (monocyte/macrophage serine esterase 1)	response to toxin	16q13-q22.1	6,03 ± 5,30
204614_at	SERPINB2	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	anti apoptosis	18q21.3	5,98 ± 3,47
207677_s_at	NCF4	neutrophil cytosolic factor 4, 40kDa	immune response	22q13.1	5,85 ± 5,10
222670_s_at	MAFB	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)	regulation of transcription	20q11.2-q13.1	5,34 ± 3,48
221210_s_at	NPL	N-acetylneuraminat e pyruvate lyase (dihydrodipicolinate synthase)	metabolic process	1q25	5,16 ± 3,03
203922_s_at	CYBB	cytochrome b-245, beta polypeptide (chronic granulomatous disease)	inflammatory response	Xp21.1	5,06 ± 3,73
206522_at	MGAM LOC642103	maltase- glucoamylase (alpha- glucosidase) similar to Maltase- glucoamylase, intestinal	metabolic process	7q34	5,03 ± 3,55
206643_at	HAL	histidine ammonia- lyase	histidin metabolic process	12q22-q24.1	4,97 ± 3,75
203821_at	HBEGF	heparin-binding EGF- like growth factor	cell proliferation	5q23	4,66 ± 2,82
205237_at	FCN1	ficolin (collagen/fibrinogen domain containing) 1	opsonization	9q34	4,18 ± 2,32
205098_at	CCR1	chemokine (C-C	chemotaxis	3p21	4,16 ± 2,15

207111_at	EMR1	motif) receptor 1 egf-like module containing, mucin- like, hormone receptor-like 1	cell adhesion	19p13.3	4,05 ± 3,01
223922_x_at	MS4A6A	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6A	signal transduction	11q12.1	4,03 ± 2,41
224917_at	MIRN21	microRNA 21	unknown, (gene expression)	17q23.1	3,79 ± 1,99
208130_s_at	TBXAS1	thromboxane A synthase 1 (platelet, cytochrome P450, family 5, subfamily A)	prostaglandi n biosynthesis	7q34-q35	3,79 ± 1,66
220615_s_at	MLSTD1	male sterility domain containing 1	lipid metabolism	12p11.22	3,70 ± 1,99
208892_s_at	DUSP6	dual specificity phosphatase 6	MAPK inactivation	12q22-q23	3,53 ± 1,86
227697_at	SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3	regulation of cell growth	17q25.3	3,37 ± 1,77
213418_at	HSPA6	heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B')	response to stress (chaperon)	1q23	2,50 ± 0,76

* χ = Mittelwert, σ = Standardabweichung.

3.6.3 Gruppenvergleich „Therapiert vs. Gesund“

Im Gruppenvergleich der Genexpression auf Gesamtgenombasis zeigten sich innerhalb der Einschlusskriterien 43 Probesets mit unterschiedlichem Expressionsniveau. Nach funktioneller Interpretation (biological process term) durch die GeneOntology (GO) Online-Genomdatenbank konnte den differenziell exprimierten Genen mindestens ein biologischer Prozess zugeteilt werden, an welchem die Genprodukte beteiligt sind (Abb. 3.13). Es zeigte sich, dass vor allem Gene der Funktionen Immunantwort (n = 9), Zellproliferation (n = 5), Transkriptionsfaktoren (n = 5) sowie für Chemotaxis verantwortliche Genprodukte (n = 2) und Apoptose assoziierte Gene (n = 2) differenziell exprimiert waren.

Im Vergleich zum Experimental-Array „Gesund“ waren im Baseline-Array „Therapiert“ 39 Gene herunterreguliert (Tab. 3.7). Danach hatten die Probanden der Gruppe „Therapiert“ eine im Mittel 9- bzw. 4,1-fach erhöhte Expression der für Chemotaxis verantwortlichen Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR3. Ebenso waren die Transkriptionsfaktoren PASK, LEF1, MYC und TCF7 in NK-Zellen „therapierter“ Patienten 7-, 4,1-, 3,6- bzw. 2,2-fach überexprimiert. Für Letzteren ist der direkte Einfluß auf die Lymphozytendifferenzierung bekannt.

Weitere zur Funktion Immunantwort zu attribuierenden Gene wie z. B. ICOS, IL7R, CD5 und CRTAM, dessen Genprodukt zur Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen beiträgt, waren in der Gruppe „Therapiert“ relativ überexprimiert.

Im selben Gruppenvergleich konnten 4 Gene identifiziert werden, die in der Gruppe „Gesund“ überexprimiert waren (Tab. 3.8). Hierbei handelt es sich um für Zellproliferation und –migration verantwortliche Gene wie DAB2, PDGFRB und IGFBP7, die um das 3,4-, 2,8 bzw. 2,4-fache in NK-Zellen „gesunder“ Probanden hochreguliert waren.

Einen genauen Überblick über die Verteilung der Expressionsniveauunterschiede und Charakterisierung der identifizierten differenziell exprimierten Gene des Gruppenvergleichs „Therapiert vs. Gesund“ geben die Abbildung 3.13 und die Tabellen 3.7 und 3.8.

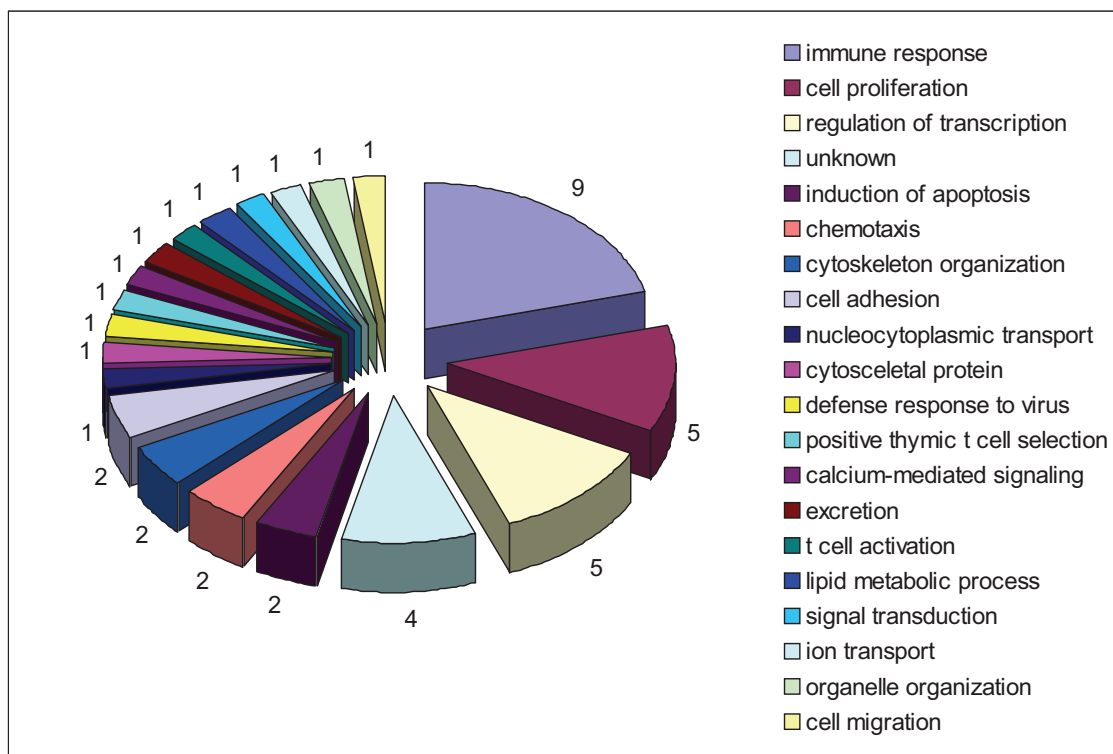


Abb. 3.13: Differenziell exprimierte Gene des Gruppenvergleichs „Therapiert vs. Gesund“ nach funktioneller Interpretation (GO biological process).

Dargestellt ist die Verteilung der biologischen Funktionen der differenziell exprimierten Gene (n = 43). Den Großteil machen Gene aus, deren Produkte zur Immunantwort (n = 9, 21 %), Zellproliferation (n = 5, 12 %) und Transkriptionsregulation (n = 5, 12 %) beitragen. Desweiteren sind u. a. jeweils 2 (5 %) Genprodukte der Chemotaxis, Zelladhäsion und Apoptoseinduzierung zu attribuieren.

Tab. 3.7: Differenziell exprimierte Gene des Gruppenvergleichs „Therapiert vs. Gesund“, Change Call: Decrease.

Filterungskriterien sind ein Detection Call „A“ in mindestens 15 von 16 Expressionsvergleichen sowie ein Fold Change-Mittelwert $\leq -2,0$.

Probe Set ID	Gene symbol	Gene title	Function	Chromosomal location	Fold Change ($\bar{x} \pm \sigma$)*
241871_at	CAMK4	calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV	nucleocytoplasmic transport	5q21.3	-22,74 \pm 29,84
212730_at	DMN	Desmuslin	cytoskeletal protein	15q26.3	-11,88 \pm 14,18
210439_at	ICOS	inducible T-cell co-stimulator	immune response	2q33	-11,16 \pm 13,43
215332_s_at	CD8B	CD8b molecule	immune response	2p12	-10,85 \pm 10,10
244261_at	IL28RA	interleukin 28 receptor, alpha (interferon, lambda receptor)	regulation of defense response to virus by host	1p36.11	-9,52 \pm 6,36
230489_at	CD5	CD5 molecule	induction of apoptosis	11q13	-9,31 \pm 4,22
206337_at	CCR7	chemokine (C-C motif) receptor 7	chemotaxis	17q12-q21.2	-8,96 \pm 6,10
217147_s_at	TRAT1	T cell receptor associated transmembrane adaptor 1	immune response	3q13	-8,25 \pm 5,05
213539_at	CD3D	CD3d molecule, delta (CD3-TCR complex)	positive thymic t cell selection	11q23	-7,67 \pm 4,90
206181_at	SLAMF1	signaling lymphocytic activation molecule family member 1	positive regulation of cell proliferation	1q22-q23	-7,47 \pm 4,23
226272_at	RCAN3	RCAN family member 3	calcium-mediated signaling	1p35.3-p33	-7,13 \pm 3,34
39248_at	AQP3	aquaporin 3 (Gill blood group)	excretion	9p13	-7,06 \pm 3,15
213534_s_at	PASK	PAS domain containing serine/threonine kinase	regulation of transcription	2q37.3	-6,95 \pm 4,28
1556839_s_at	SPTBN5	Spectrin, beta, non-erythrocytic 5	cytoskeleton organization	15q21	-6,84 \pm 3,13
206804_at	CD3G	CD3g molecule, gamma (CD3-TCR complex)	t cell activation	11q23	-6,45 \pm 2,86
227867_at	LOC129293	hypothetical protein LOC129293	unknown	2p11.2	-6,44 \pm 3,48
203413_at	NELL2	NEL-like 2 (chicken)	cell adhesion	12q13.11-q13.12	-6,02 \pm 3,05
210972_x_at	TRA@ TRAV20 TRAJ17 TRAC	T cell receptor alpha locus T cell receptor alpha variable 20 T cell receptor alpha joining 17 T cell receptor alpha constant	immune response	14q11.2	-5,85 \pm 3,11
205798_at	IL7R	interleukin 7 receptor	immune response	5p13	-5,70 \pm 3,35
209670_at	TRAC	T cell receptor alpha constant	unknown (immune response)	12q24	-5,56 \pm 3,09

230005_at	SVIP	small VCP/p97-interacting protein	unknown	11p14.2	-5,44 ± 5,97
211207_s_at	ACSL6	acyl-CoA synthetase long-chain family member 6	lipid metabolic process	5q31	-5,39 ± 3,63
205376_at	INPP4B	inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II, 105kDa	signal transduction	4q31.21	-4,92 ± 2,36
1555579_s_at	PTPRM	protein tyrosine phosphatase, receptor type, M	cell adhesion	18p11.2	-4,32 ± 1,85
230110_at	MCOLN2	mucolipin 2	ion transport	1p22	-4,15 ± 1,99
207681_at	CXCR3	chemokine (C-X-C motif) receptor 3	chemotaxis	Xq13	-4,11 ± 2,68
221558_s_at	LEF1	lymphoid enhancer-binding factor 1	regulation of transcription	4q23-q25	-4,05 ± 1,30
206150_at	CD27	CD27 molecule	immune response	12p13	-3,96 ± 2,34
203130_s_at	KIF5C	kinesin family member 5C	organelle organization	2q23.1	-3,93 ± 1,51
206914_at	CRTAM	cytotoxic and regulatory T cell molecule	immune response (cytotoxicity against tumor)	11q22-q23	-3,72 ± 1,70
202431_s_at	MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	regulation of transcription	8q24.21	-3,60 ± 1,59
207339_s_at	LTB	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	immune response	6p21.3	-3,42 ± 1,34
205259_at	NR3C2	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2	regulation of transcription	4q31.1	-3,41 ± 1,34
222557_at	STMN3	stathmin-like 3	cytoskeleton organization	20q13.3	-3,09 ± 0,80
210607_at	FLT3LG	fms-related tyrosine kinase 3 ligand	cell proliferation	19q13.3	-2,69 ± 0,57
231775_at	TNFRSF10A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	induction of apoptosis	8p21	-2,56 ± 0,55
206980_s_at	FLT3LG	fms-related tyrosine kinase 3 ligand	cell proliferation	19q13.3	-2,48 ± 0,41
205758_at	CD8A	CD8a molecule	immune response	2p12	-2,26 ± 0,33
205255_x_at	TCF7	transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box)	regulation of transcription (lymphocyte differentiation)	5q31.1	-2,21 ± 0,41

* χ = Mittelwert, σ = Standardabweichung.

Tab. 3.8: Differenziell exprimierte Gene des Gruppenvergleichs „Therapiert vs. Gesund“, Change Call: Increase.

Filterungskriterien sind ein Detection Call „P“ in mindestens 15 von 16 Expressionsvergleichen sowie ein Fold Change-Mittelwert $\geq 2,0$.

Probe Set ID	Gene symbol	Gene title	Function	Chromosomal location	Fold Change ($\chi \pm \sigma$)*
201279_s_at	DAB2	disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)	cell proliferation	5p13	3,41 ± 1,54

232720_at	LINGO2	leucine rich repeat and Ig domain containing 2	unknown	9p21.2-p21.1	3,27 ± 1,25
202273_at	PDGFRB	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide	cell migration	5q31-q32	2,78 ± 0,59
201162_at	IGFBP7	insulin-like growth factor binding protein 7	negative regulation of cell proliferation	4q12	2,42 ± 0,52

* χ = Mittelwert, σ = Standardabweichung.

3.6.4 Differenziell exprimierte Gene in mehr als einem Gruppenvergleich

Um mögliche Zusammenhänge zwischen erhöhter NK-Zellzahl und differenziell exprimierten Genen in den Gruppenvergleichen aufzudecken, wurde analysiert, ob und welche Gene in mehr als einem Gruppenvergleich über- bzw. unterexprimiert waren.

Tabelle 3.9 zeigt diejenigen Genprodukte, die in mehr als einem Gruppenvergleich ein unterschiedliches Expressionsniveau aufwiesen und bei erhöhter Toleranz von mindestens 13 von 16 Kreuzvergleichen vom Expressionslevel hoch- bzw. herunterreguliert ($FC \leq -2,0$ bzw. $\geq 2,0$) waren.

Es zeigt sich, dass innerhalb der cut-off Werte kein Gen in den beiden Gruppenvergleichen der Gruppe „Therapiert“ gemeinsam differenziell exprimiert wurde.

Auffällig war jedoch, dass in NK-Zellen „kranker“ Tumorpatienten Clusterin (CLU), was zur angeborenen Immunantwort attribuiert wird, in beiden Gruppenvergleichen stark unterexprimiert ist. Auch das zur Detoxifikation von Xenobiotika befähigte Genprodukt von CES1 ist in der Gruppe „Krank“ in NK-Zellen in beiden Gruppenvergleichen unterexprimiert. In ähnlicher Weise sind der für Immunantwort verantwortliche NK-Rezeptor CLEC4D, der für Chemotaxis und Immunantwort zuständige Chemokinrezeptor CCR1 und Transkriptionsfaktor MAFB in NK-Zellen nicht therapierter Tumorpatienten im Expressionsniveau herunterreguliert.

Bei tumorfreien Probanden der Gruppe „Gesund“ zeigt sich eine im Vergleich zu den beiden Tumorgruppen („Krank“ und „Therapiert“) eine Unterexpression von Zytokinrezeptoren CXCR3, CCR7 und IL7R in beiden Vergleichen. Ebenso waren für Immunantwort verantwortliche Gene wie TRAT1, CD8B und TRA@ im Expressionslevel herunterreguliert (Tab. 3.9).

Tab. 3.9: Differenziell exprimierte Gene in mehr als einem Gruppenvergleich, Change Call: Decrease und Increase.

Filterungskriterien sind ein Detection Call „P“ bzw. „A“ in mindestens 13 von 16 Expressionsvergleichen sowie ein Fold Change-Mittelwert $\geq 2,0$ bzw. $\leq -2,0$.

Gene symbol	Gene title	Fold Change ($\chi \pm \sigma$)* „th vs. k“	Fold Change ($\chi \pm \sigma$)* „th vs. g“	Fold Change ($\chi \pm \sigma$)* „k vs. g“
F5	coagulation factor V (proaccelerin, labile factor)	-7,29 ± 8,62		10,86 ± 13,92
C19orf59	chromosome 19 open reading frame 59	-8,49 ± 10,82		9,50 ± 8,19
KCNJ15	potassium inwardly- rectifying channel, subfamily J, member 15	-21,51 ± 42,50		9,20 ± 9,39
CLU	clusterin	-12,93 ± 16,07		8,57 ± 9,91
ADM	adrenomedullin	-7,62 ± 9,00		8,54 ± 6,46
CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	-8,70 ± 11,57		8,42 ± 5,23
SLC11A1	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1	-4,91 ± 4,09		7,88 ± 6,56
FLJ22662	hypothetical protein FLJ22662	-6,64 ± 7,92		6,98 ± 4,45
CES1	carboxylesterase 1 (monocyte/macrophage serine esterase 1)	-5,09 ± 3,17		6,03 ± 5,30
CLEC4D	C-type lectin domain family 4, member D	-6,35 ± 6,24		6,01 ± 4,63
MAFB	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)	-6,29 ± 6,65		5,34 ± 3,48
HBEGF	heparin-binding EGF-like growth factor	-4,89 ± 3,60		4,66 ± 2,82
CCR1	chemokine (C-C motif) receptor 1	-3,94 ± 3,24		4,16 ± 2,15
MIRN21	microRNA 21	-4,86 ± 2,73		3,79 ± 1,99
SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3	-4,84 ± 3,96		3,37 ± 1,77
CXCR3	chemokine (C-X-C motif) receptor 3		-4,11 ± 2,68	-5,28 ± 2,15
SPTBN5	Spectrin, beta, non- erythrocytic 5		-6,84 ± 3,13	-5,44 ± 4,16
TRAT1	T cell receptor associated transmembrane adaptor 1		-8,25 ± 5,05	-5,95 ± 3,92
CD5	CD5 molecule		-9,31 ± 4,22	-8,36 ± 5,97
PASK	PAS domain containing serine/threonine kinase		-6,95 ± 4,28	-8,64 ± 7,41
NELL2	NEL-like 2 (chicken)		-6,02 ± 3,05	-10,28 ± 7,47
CD8B	CD8b molecule		-10,85 ± 10,10	-10,61 ± 8,94
IL7R	interleukin 7 receptor		-6,91 ± 3,72	-10,70 ± 8,86
CCR7	chemokine (C-C motif) receptor 7		-8,96 ± 6,09	-11,97 ± 12,26
CD8B	CD8b molecule		-8,55 ± 3,80	-12,87 ± 9,30
DMN	desmuslin		-11,88 ± 14,18	-20,97 ± 31,20
NOG	noggin		-49,37 ± 55,65	-52,51 ± 65,25
TRA@	YME1-like 1 (S. cerevisiae)		-14,36 ± 12,94	-85,34 ± 28,22

* χ = Mittelwert, σ = Standardabweichung, g = Gesund, k = Krank, th = Therapiert, grau unterlegte Zellen = kein Expressionsunterschied.

4. Diskussion

Kopf-Hals-Karzinome sind trotz optimierter Krebsdiagnostik und –therapie nach wie vor durch eine bescheidene Prognose charakterisiert (Ferlay J 2004). Immunologische Methoden halten verstärkt Einzug in die Bekämpfung maligner Tumoren des Menschen. Daher scheint die Grundlagenforschung natürlicher immunologischer Prozesse im menschlichen Körper von enormer Wichtigkeit, nicht zuletzt um neue Therapieansätze für bösartige Tumoren zu schaffen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Natürlichen Killerzellen, die als Teil des angeborenen, unspezifischen Immunsystems aktiv an der Bekämpfung maligne transformierter Zellen teilnehmen („immunological surveillance“) (Burnet 1970). Im Speziellen sollte der Zusammenhang zwischen erhöhtem peripheren Auftreten der NK-Zellen, deren Genexpression sowie klinischem Status der Tumorpatienten untersucht werden.

4.1 Diskussion der Methodik

Die Auswahl der Tumorpatienten erfolgte willkürlich nach klinischem Tumorstatus, Alter und entsprechendem Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie. Der aktuelle klinische Status wurde hierbei in der Tumodispensaire der „Otto Körner Klinik“ durch den verantwortlichen Professor bzw. dessen Oberarzt sowie den anwesenden Radiologen und entsprechender Bildgebung (v. a. Röntgen und Sonographie) ermittelt.

Die Blutentnahme erfolgte durch qualifiziertes Personal (verantwortlicher Arzt bzw. ausgebildete Schwester) stets mittwochvormittags zwischen 08.00 und 12.00 Uhr nach festgelegtem Schema. Ebenso erfolgte die Weiterverarbeitung und Aufbereitung der Proben anhand standardisierter Protokolle der jeweiligen Herstellerfirmen nur durch den Doktoranden, um systemische und zufällige Fehler so gering wie möglich zu halten. Hierzu waren mehrere Probedurchgänge im Vorfeld der eigentlichen Studienreihe erforderlich, was eine Qualitätsoptimierung der Proben nach sich zog.

Die eingesetzten Materialien und Methoden stellen den zum Zeitpunkt der Bearbeitung verbreiteten Standard der modernen Labordiagnostik dar. Durch die Zusammenarbeit mit erfahrenen Mitarbeitern des Experimentellen Forschungszentrums und des Instituts für

Immunologie der Universität Rostock gelang somit die optimale Probenaufbereitung und –auswertung.

Die differenziell exprimierten Gene der NK-Zellen wurden mit dem GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 der Firma Affymetrix detektiert, welcher den zum Untersuchungszeitpunkt ersten und umfassendsten Gesamtgenom-Microarray cDNA-Chip darstellt (Affymetrix 2003-2004). Mit Hilfe der DNA-Chip Technologie lassen sich funktionale Zustände wie z. B. Aktivität oder Zellzyklusverlauf einer Zelle untersuchen (Lang et al. 2002). Es wurden bereits unterschiedliche vergleichende Genexpressionsanalysen mittels Microarraytechnik, z. B. von HNSCC (Gottschlich et al. 2006) oder T-Zellen (Buttner et al. 2007) publiziert. Die durch diese Technologie erzielten klinischen und biologischen Ergebnisse sind im Hinblick auf Sicherheit und Reproduzierbarkeit bemerkenswert stabil (Liu et al. 2004). In einer vergleichenden Studie wurde eine 99,16 %ige Übereinstimmung (Korrelationskoeffizient 0,97) der detektierten Fluoreszenzaktivität des selben von zwei verschiedenen DNA-Chips analysierten RNA-Pools gesehen (Kendzioriski et al. 2003). Die Sensitivität der GeneChip-Expressions-Plattform von Affymetrix liegt je nach vorhandener RNA-Ausgangskonzentration bei bis zu 100 %, wobei die Rate falsch positiver Ergebnisse unter 2 % liegt (Affymetrix 2004). Die DNA-Chip Daten können labortechnisch sowie mittels Literatur und gängiger Genomdatenbanken validiert werden (Chuaqui et al. 2002). Realtime-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion (RTq-PCR) oder Northern Blot dienen der labortechnischen Validierung. Mehrere Arbeiten zeigten eine gute Übereinstimmung der gewonnenen Daten im Vergleich von RTq-PCR bzw. Northern Blot mit DNA-Chips, wenngleich gewisse Einschränkungen bei kleinen Genexpressionsunterschieden auffielen (Rajeevan et al. 2001; Taniguchi et al. 2001). Aufgrund dieser Erkenntnisse ist es nicht zwingend notwendig die per DNA-Chip gewonnenen Ergebnisse durch eine der o. g. Methoden zu validieren, insbesondere dann nicht, wenn funktionelle Rückschlüsse nicht aufgrund von Einzelgenveränderungen sondern, wie in vorliegender Arbeit, in Gruppenvergleichen gezogen werden (Lipshutz et al. 1999; Lockhart et al. 2000).

Die biologische Signifikanz des einzelnen Genexpressionsunterschiedes bleibt indes fraglich. Der minimale Fold Change eines Expressionsunterschieds variiert in anderen Arbeiten zwischen $> 1,5$ (Durig et al. 2003) und > 3 (Tschentscher et al. 2003) um ein Gen als interessanten Kandidaten betrachten zu können. In dieser Arbeit wurde die Grenze bei 2 gesetzt.

Generell müssen die hohen Kosten und der Zeitaufwand zur Probenverarbeitung als limitierende Faktoren des Genchip-Verfahrens angesehen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden differenziell exprimierte Gene in NK-Zellen in Abhängigkeit vom klinischen Tumorstatus im Rahmen von Gruppenvergleichen detektiert, um ein Expressionsprofil von Gengruppen aufstellen zu können. Aufgrund des großen Datenumfangs wird der Hauptfokus dieser Arbeit auf die Detektion und Beschreibung der differenziell exprimierten Gene innerhalb enger cut-off Werte mit geringer statistischer Toleranz gesetzt.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Deskriptive Statistik

Das mittlere Alter der Patienten mit Kopf-Hals-Karzinom, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme noch keiner Therapie unterzogen worden waren und somit als neu diagnostiziert angesehen werden können, war 55,9 Jahre. Dies stimmt mit dem altersspezifischen Inzidenzpeak von Mundhöhlen- und Rachenkarzinomen aus dem Jahr 2004 überein (RKI 2008). Auch konnte die Prädilektion des männlichen Geschlechts, an einem bösartigen Tumor der Kopf-Hals-Region zu erkranken bestätigt werden. Frauen erkranken nach den Daten des Robert-Koch-Instituts ca. dreimal seltener an einem HNSCC (RKI 2008). Unter allen untersuchten 103 Tumorpatienten waren 85,4 % männlich. Für diesen Umstand wird u. a. der häufigere Alkohol- und Nikotinabusus bei Männern verantwortlich gemacht (Lang et al. 2002).

Im Einklang mit Sethi et al. zeigte sich als häufigste Tumormanifestation im Kopf-Hals-Bereich das Larynxkarzinom mit 35,0 % gefolgt vom Oropharynxkarzinom mit 32 % und Hypopharynx mit 13,6 % als Manifestationsort (Sethi et al. 2009). Histologisch handelt es sich bei den bösartigen Kopf-Hals-Tumoren mit 97,1 % um Plattenepithelkarzinome, was deutlich höher als die in einer amerikanischen Studie von Hoffman et al. beschriebenen 55,8 % ist, in welcher Adenokarzinome fast 20 % der Kopf-Hals-Karzinome ausmachten (Hoffman et al. 1998). Im untersuchten Patientengut fanden sich keine Zweitkarzinome als Resultat der klassischen Feldkanzerisierung, welche durch die im Hause standardmäßig durchgeführte Stagingdiagnostik gepaart mit Panendoskopie und PE detektiert worden wären. Den Anteil

an Zweitkarzinomen von bis zu 19 % wie von von Schwartz et al. beschrieben konnte durch die hier analysierte Klientel nicht bestätigt werden (Schwartz et al. 1994). Unter den bereits therapierten, rezidivfreien Patienten war zusammenfassend das T1 N0 M0-Stadium am häufigsten, was nicht zuletzt an dem hohen Anteil des Larynxkarzinoms (34 %) und dessen glottischer Manifestation im Vergleich zu anderen Lokalisationen eines HNSCC früh bemerkbaren Symptomatik und späten Metastasierung liegt (Lang et al. 2002; Probst et al. 2008; Waldfahrer et al. 2005). Insgesamt war jedoch unter allen Tumorpatienten das T3-Stadium mit 29,7 % und das N2-Stadium bei 38,6 % somit auch das fortgeschrittene UICC-Level III am häufigsten, was mit den Daten von Sethi et al. korreliert (Sethi et al. 2009).

Die chirurgische Tumoresektion mit anschließender adjuvanter Radiochemotherapie war übereinstimmend mit den Aussagen von Seiwert et al. bei dem Großteil der therapierten Tumorpatienten (43,3 %) Mittel der Wahl (Seiwert & Cohen 2005). Je nach Ausprägungsgrad und individuellem Befund erhielten weitere Patienten im Anschluß an die OP eine Strahlentherapie (30,1 %) bzw. eine alleinige chirurgische Therapie (21,7 %). Dies wurde im Rahmen interdisziplinärer Sprechstunden mit Radiologen, Strahlentherapeuten, HNO-Ärzten und zum Teil auch Kollegen anderer Fachgebiete individuell auf und mit dem einzelnen Patienten abgestimmt.

Das durchschnittliche rezidivfreie Intervall bis zum Untersuchungszeitpunkt der therapierten Patienten betrug 43,1 Monate, was somit ca. 1 Jahr unter der im Allgemeinen beschriebenen und zu erreichenden tumorfreien Überlebensrate von 5 Jahren lag, nach welcher nur noch ca. 10 % aller Tumorneumanifestationen auftreten (Haas et al. 2001; Lang et al. 2002). Insgesamt waren 18 der 83 therapierten Patienten (14,9 %) mehr als 5 Jahre tumorfrei. Gründe für diesen geringen Anteil könnten die willkürliche Patientenauswahl, die mangelhafte Compliance bezüglich der Nachsorgeuntersuchung und die sich vergrößernden Follow-up-Intervalle nach längerer Tumorfreiheit sowie die generell niedrige 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 50 % bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen sein (Haas et al. 2001).

Übereinstimmend mit Ostwald et al. zeigte sich, dass therapierte, rezidivfreie HNSCC-Patienten einen hochsignifikant ($p < 0,001$) höheren Anteil von NK-Zellen (25,93 %) an PBMC im Vergleich zu bislang nicht therapierten HNSCC-Patienten (15,47 %) und gesunden Kontrollprobanden (15,41 %) besitzen (Ostwald et al. 2004). In der gruppenabhängigen Rangkorrelationsanalyse konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhtem NK-Zellanteil und rezidivfreiem Intervall bei therapierten Patienten

gesehen werden, was die Aussagen von Brittenden et al. bestätigt (Brittenden et al. 1996). Der erhöhte NK-Zellanteil ist nach Korrelationsvergleich und Regressionsanalyse nicht vom klinischen Status, sondern vom Alter der untersuchten Patienten abhängig (Korrelationskoeffizient nach Spearman: $r = 0,216$, $p < 0,05$; Beta-Koeffizient: $0,239$, $p < 0,05$). Ursächlich für den erhöhten NK-Zellanteil an PBMC in der Gruppe „Therapiert“ scheint somit ein unausgewogener Altersunterschied zwischen den klinischen Gruppen zu sein („Therapiert“: $59,4 \pm 9,9$ Jahre vs. „Gesund“: $46,2 \pm 15,2$ Jahre, $p < 0,05$). Es zeigte sich jedoch ein signifikant erhöhter Anteil der NK-Zellen von $20,1\%$ an PBMC bei gesunden Frauen im Vergleich zu Männern mit $13,21\%$ ($p < 0,05$). Dieser geschlechtsspezifische Unterschied steht im Gegensatz zu Arbeiten von Bisset et al. und Santagostino et al., die mit $9,8\%$ zu $13,7\%$ in der Schweiz bzw. $12,1\%$ zu $13,9\%$ in Italien einen erniedrigten durchschnittlichen Anteil von NK-Zellen an PBMC bei gesunden Frauen im Vergleich zu Männern sahen (Bisset et al. 2004; Santagostino et al. 1999). Ursächlich hierfür könnte die Anzahl und Geschlechtsverteilung der in dieser Arbeit untersuchten Kontrollprobanden von $n = 22$ ($m = 15$, $w = 7$) und somit eingeschränkter Repräsentativität einer gesunden Population sein.

Die Genexpressionanalyse der NK-Zellen in Gruppenvergleichen soll Kandidatengene detektieren, die möglicherweise Einfluß auf das periphere Auftreten sowie Zytotoxizität bzw. Aktivität von NK-Zellen besitzen.

4.2.2 Genexpressionsanalyse

4.2.2.1 Gruppenvergleich „Therapiert vs. Krank“

Die funktionelle Interpretation der 9 differenziell exprimierten Gene im Gruppenvergleich „Therapiert vs. Krank“ zeigt eine Zuordnung zu jeweils mindestens einer biologischen Funktion nach GO. Zur Beeinflussung von erhöhtem peripherem Auftreten der NK-Zellen sind vor allem die Genprodukte mit den Funktionscharakteristika Chemotaxis (PROK2), Regulation von Zellwachstum (SOCS3), Hämatopoese (DLL1) und Zellproliferation (CDK5R1) befähigt. Hiervon sind in der Gruppe „Therapiert“ PROK2 und SOCS3 relativ über-, DLL1 und CDK5R1 relativ unterexprimiert.

Prokinectin-2 (PROK2) ist als Wachstumsfaktor nach LeCouter et al. in Verbindung mit VEGF und anderen Zytokinen über G-Protein gekoppelte Rezeptoren für Chemotaxis und

Entzündungsreaktionen verantwortlich (LeCouter et al. 2003). Eine positive Beeinflussung des peripheren Auftretens natürlicher Killerzellen scheint somit wahrscheinlich. Der Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) inhibiert die JAK2 Kinase und ist u. a. verantwortlich für ein negatives Feedback in der Zytokin-Signaltransduktion (z. B. IL-12) und hemmt die Zellproliferation und –motilität (Niwa et al. 2005; Yamamoto et al. 2003). In den NK-Zellen „kranker“ Patienten ist im Vergleich zu „Therapierten“ der Notch-Rezeptor-Ligand Delta-like protein 1 (DLL1) überexprimiert und für das Aufkommen von NK-Zellvorstufen verantwortlich, was möglicherweise als immunologische Antwort auf die bestehende Krebserkrankung gedeutet werden kann (Jaleco et al. 2001). Der Cyclin-dependent kinase 5 activator 1 (CDK5R1) wurde bislang hauptsächlich in Zusammenhang mit der Regulierung des kortikalen Neuronenwachstums und Morbus Alzheimer gebracht (Tsai et al. 1994). Eine CDK5-Aktivierung führt zu Apoptose von Prostatakarzinomzellen wie in einer Arbeit von Lin et al. beschrieben (Lin et al. 2004). Auch hier lässt sich eine indirekte Antwort von NK-Zellen auf ein HNSCC vermuten.

Bezüglich der NK-Zellaktivität bzw. Zytotoxizität kommen vor allem CES1 (Toxinantwort), TMEM49 (Formation intrazellulärer Vakuolen) und KLRC3 (zelluläre Abwehr) in Betracht. Die Carboxylesterase 1 (CES1) ist zur Detoxifikation von Xenobiotika befähigt und ein Mangel scheint mit Non-Hodgkin-Lymphom und B-Zell-Leukämie assoziiert zu sein (Glinsky et al. 2005; Yang et al. 2009). Das in NK-Zellen „therapierter“ Patienten hochregulierte Transmembranprotein 49 (TMEM49) wird für Interzellularkontakte sowie intrazelluläre Vakuolenbildung in Azinuszellen von Säugern mit akuter Pankreatitis und anschließender Autophagie verantwortlich gemacht (Ropolo et al. 2007). Eine Rolle bezüglich Proliferationskontrolle bzw. Zellabwehr von NK-Zellen wäre denkbar. Der Killerzellen aktivierende NKG2E-Rezeptor (KLRC3) ist im Vergleich zu „kranken“ Patienten bei „Therapierten“ unterexprimiert, was im Rahmen des akuten Krebsleidens als Abwehrreaktion der NK-Zellen gewertet werden könnte. KLRC3 erkennt HLA-E-Moleküle und führt zur Aktivierung der NK-Zellen (Kaiser et al. 2005).

In Bezug auf peripheres Aufkommen von NK-Zellen bei „therapierten“ Patienten sollte somit in diesem Gruppenvergleich der Hauptfokus auf den Wachstumsfaktor PROK2 gerichtet werden. Einen Zusammenhang mit zellulärer Abwehr lässt sich möglicherweise über die Hochregulierung des Transkriptionslevels von TMEM49 in der Gruppe „Therapiert“ sehen. Ebenso der in NK-Zellen „therapierter“ Patienten relativ überexprimierte basische Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktor MAFB ist ein Kandidat für den vergrößerten NK-Zellanteil im peripheren Blutbild. Eine zentrale Rolle in der humanen Monozytopoese mit erhöhtem

Aufkommen monomakrophagozytärer Differenzierungsstufen nach retroviraler Transduktion von MAFB in CD34⁺Vorstufen aus Nabelschnurblut konnte nachgewiesen werden (Gemelli et al. 2006).

4.2.2.2 Gruppenvergleich „Krank vs. Gesund“

Im Vergleich der Genexpressionsunterschiede von NK-Zellen zwischen den Gruppen „Krank“ und „Gesund“ liegt der Hauptfokus der funktionellen Interpretation der Genprodukte nicht auf Kandidatengen, die das periphere Auftreten beeinflussen sondern eher eine Fehlfunktion im Rahmen der „immunological surveillance“ verursachen. Unterschiede bezüglich der NK-Zellaktivierung bzw. Zytotoxizität könnten Hinweise für die Gründe der Manifestation einer malignen Zelltransformation aufzeigen. Übereinstimmend mit Ostwald et al. zeigte sich in beiden Gruppen ein gleichhoher NK-Zellanteil von ca. 15 % an PBMC (Ostwald et al. 2004).

Von den 47 detektierten differenziell exprimierten Genen sind 11 (23 %) der biologischen Funktion Immunantwort zu attribuieren. Hierunter war die alpha-Kette des T-Zellrezeptors (TRA@) in der Gruppe „Krank“ im Durchschnitt 85-fach relativ überexprimiert. Sie wird der Interaktion mit dem CD8-Corezeptor und folgender MHC-Erkennung und Signalinitiierung zugeschrieben (Mallaun et al. 2008). Die beta-Kette des T-Zell-Corezeptors CD8 (CD8B) ist ebenfalls bei „Kranken“ überexprimiert und wird der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität zugeschrieben (Devine et al. 2000). Das zur Zellerkennung und Apoptoseinduktion befähigte Oberflächenmolekül CD5 bindet u. a. an CD72/LYB-2 von B-Zellen und ist als Ausdruck der Immunantwort in der Gruppe „Krank“ ebenfalls hochreguliert (Van de Velde et al. 1991). Ebenso zeigte sich eine Überexpression des T-Zellrezeptor (TCR)-Adaptor-Moleküls TRAT1 (TRIM) in NK-Zellen „kranker“ Patienten. TRAT1 stabilisiert den TCR/CD3-Komplex an der Zelloberfläche und reguliert die intrazelluläre TCR-Signaltransduktion über dessen Expressierung (Kirchgessner et al. 2001). Die Detektierung dieser Gene zeigt die enge Interaktion zwischen NK- und T-Zellen im Rahmen der Immunantwort auf. Desweiteren sind der Interleukinrezeptor IL7R und der Apoptoseeffektor PERP im Expressionslevel „kranker“ NK-Zellen relativ hochreguliert. IL7R ist mit IL2RG an der Blockierung der Apoptose während der Lymphopoese beteiligt. Ein Mangel an IL7R geht mit einem Immundefizienzsyndrom und verminderter NK-Zellzahl einher (Puel et al. 1998). Der in der

Plasmamembran lokalisierte TP53 abhängige Effektor PERP ist in der Lage Apoptose in diversen Zelltypen zu induzieren, was an Mäusen bestätigt wurde (Ihrle et al. 2004).

Weitere relativ überexprimierte Gene in den NK-Zellen von „kranken“ Tumorpatienten sind die zur Chemotaxis zu attribuierenden Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR7 sowie der Sphingosin-Rezeptor S1PR1, der u. a. PDGF-induzierte Zellmigration fördert (Waters et al. 2006). Diese Hochregulierung scheint für die Rekrutierung von NK-Zellen im Rahmen der Tumorerkrankung mitverantwortlich zu sein.

Bei der Analyse der im Vergleich zur Gruppe „Krank“ überexprimierten Gene der „gesunden“ Probanden (vgl. Tab. 3.6) fällt auf, dass drei Rezeptoren für Fc-Fragmente von Antikörpern (IgA und IgG) bei „kranken“ NK-Zellen auf das bis zu 24-fache herunterreguliert sind. Diese Rezeptoren (FCAR, FCGR1A und FCGR1B) spielen eine entscheidene Rolle in der Immunantwort und sind für ADCC und Phagozytose opsonierter Targetzellen verantwortlich (Kim et al. 2003; Morton et al. 2001). Auch das sezernierte Protein Ficolin 1 (FCN1), was zur Opsonierung von Targetzellen und deren anschließender Phagozytose dient, war bei „kranken“ NK-Zellen im Expressionsniveau relativ herunterreguliert (Endo et al. 2007). Der DAP12 assoziierte Rezeptor TREM1, der für aktivierende Prozesse und Entzündungsreaktionen verantwortlich ist ebenfalls in NK-Zellen der Gruppe „Krank“ unterexprimiert (Colonna et al. 2003). Diese Umstände könnten eine Schlüsselrolle in der Manifestation einer malignen Zelltransformation durch fehlerhafte „immunological surveillance“ der NK-Zellen spielen.

Weitere Gene, die zur Immun- bzw. Zellabwehr attribuiert werden können, waren im Vergleich zu „gesunden“ NK-Zellen in „Kranken“ unterexprimiert. Hierunter fallen Aquaporin 9 (AQP9), die Regulierungskomponente der NADPH-Oxidase NCF4 und die beta-Untereinheit des Cytochrom b-245 (CYBB).

Desweiteren fiel eine in NK-Zellen der Gruppe „Krank“ relative Unterexprimierung des zur MAPK-Regulierung befähigten Proteins TRIB1 (Sung et al. 2007), des aktivierenden Leukozytenrezeptors FPR1 (Seifert et al. 2003), des die Monozytenproliferation hemmenden Plasminogenaktivator-Inhibitors SERPINB2 (Yu et al. 2002) und der MAPK-aktivierende Phosphatase DUSP6 (Furukawa et al. 2008). Auch in diesem Gruppenvergleich zeigte sich der Transkriptionsfaktor MAFB, der zur Monozytendifferenzierung attribuiert wird, in der Gruppe „Krank“ unterexprimiert (Gemelli et al. 2006).

Diese Veränderungen des relativen Expressionslevels in „kranken“ NK-Zellen zeigen mögliche Kandidatengene für eine herunterregulierte Zellaktivität bzw. Zytotoxizität und

somit Beeinträchtigung der Immunabwehr, was die Überwachung des Aufkommens neuer Krebszellen einschränken könnte.

4.2.2.3 Gruppenvergleich „Therapiert vs. Gesund“

Im Vergleich der in NK-Zellen differenziell exprimierten Gene der Gruppe „Therapiert“ mit „Gesund“ liegt der Fokus auf den Genen, die potenziell für das erhöhte periphere Aufkommen von NK-Zellen verantwortlich sein könnten.

Von den 43 detektierten Genen zeigen sich nach funktioneller Interpretation (GO, biological process) 9 zur Immunantwort, jeweils 5 zur Proliferations- bzw. Transkriptionsregulation sowie 2 zur Chemotaxis und 1 zur Zellmigration zuzuordnendes Genprodukt.

Auffällig ist hierbei eine Hochregulierung des Expressionsniveaus der Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR3 bei NK-Zellen „therapierter“ Patienten. CXCR3 vermittelt über die Liganden Mig, IP-10 und I-TAC/IP9 verstärkte Migration und Antitumoraktivität von Lymphozyten (Hensbergen et al. 2005), was in ähnlicher Weise auch für CCR7 und seine Liganden CCL19 und CCL21 bei dendritischen Zellen nachgewiesen wurde (Iijima et al. 2005). Der ebenfalls in „therapierten“ NK-Zellen überexprimierte aktivierende Rezeptor SLAMF1 (CD150) ist für Chemotaxis und Zytotoxizität verantwortlich, was an T-Lymphozyten gezeigt werden konnte (Mehrle et al. 2008). Das CD3D-Antigen (TCR-assoziiert) zeigt ebenfalls eine Überexpression, was als Nachweis für das Aufkommen junger, Zytotoxizität vermittelnder NK-Zellen in der Gruppe „Therapiert“ interpretiert werden kann (Phillips et al. 1992). Diese These kann durch die nachgewiesene Hochregulierung des für die Proliferation von hämatopoetischen Vorläuferzellen verantwortlichen FLT3-Liganden FLT3LG in der selben Gruppe gestützt werden (Weisel et al. 2009). Es zeigen sich somit verschiedene Auffälligkeiten im Genexpressionsunterschied, die über unterschiedliche Mechanismen das erhöhte periphere Aufkommen von NK-Zellen verursachen könnten.

Weitere mögliche Kandidatengene sind die zur Transkriptionsregulation befähigten Genprodukte von TCF7, LEF1 und MYC, die in „therapierten“ NK-Zellen relativ überexprimiert sind. Sie stellen wichtige Positionen des „Wnt signaling pathway“ dar, der für eine Reihe physiologischer Prozesse wie Zellproliferation aber auch für Karzinogenese verantwortlich ist (Nemeth et al. 2007; Urakami et al. 2006). Hierbei wurde die Relevanz zur NK-Zell-Rezeptor-Formation von TCF7 (Kunz et al. 2001), die zentrale Rolle von LEF1 in der Lymphozytendifferenzierung (Petropoulos et al. 2008) und der Einfluß auf die

Entwicklung hämatopoetischer Stammzellen sowie die von IL-15 gesteigerte KIR-Expression durch MYC nachgewiesen (Cichocki et al. 2009; Niu et al. 2009). Desweiteren sind die für Transkriptionregulation in Lymphozyten verantwortlichen Proteinkinasen CAMK4 und PASK in NK-Zellen der Gruppe „Therapiert“ hochreguliert.

An für die Immunantwort verantwortlichen Genen sind u. a. ICOS, das Zytokin LTB und der aktivierende NK-Zellrezeptor CRTAM in „therapierten“ NK-Zellen überexprimiert. Der induzierbare T-Zell-Costimulator ICOS ist als weiteres Kandidatengen dabei für Lymphozytenproliferation und Killerzellzytotoxizität sowie eine verlängerte Überlebensdauer derselben verantwortlich (Okamoto et al. 2003; Wang et al. 2009). CD27, ein zur TNF-Rezeptor-Superfamilie gehörendes Oberflächenprotein, wird zu reifen NK-Zellen geringerer Zytotoxizität attribuiert und ist ebenfalls in der Gruppe „Therapiert“ relativ überexprimiert (Vossen et al. 2008).

In der Gruppe „Gesund“ sind im Vergleich zur Gruppe „Therapiert“ 4 relativ überexprimierte Gene detektiert worden. Der Expression des Proteins DAB2 wird die Eigenschaft eines Tumorsuppressorgens zugeschrieben, was u. a. in ovariellen Tumorzellen nachgewiesen wurde (Fazili et al. 1999). In ähnlicher Weise wird IGFBP7 eine tumorsupprimierende Wirkung bei kolorektalem Karzinom zugesprochen (Ruan et al. 2007). Der Rezeptor des Wachstumsfaktors PDGFRB, dessen Expressionslevel bei „Gesunden“ relativ hochreguliert war, ist zum Wachstum von Zellen mesenchymalen Ursprungs befähigt und führt bei chromosomaler Abberation zu myeloproliferativer Störung im Sinne von Leukämien (Tefferi et al. 2009). Die 3 zuletzt beschriebenen Genprodukte könnten Ansätze für die NK-Zell-abhängigen Gründe des tumorfreien Status der Gruppe „Gesund“ darbieten.

4.2.2.4 Differenziell exprimierte Gene in mehr als einem Gruppenvergleich

Um den Kreis der detektierten Kandidatengene zu verdichten wurde analysiert, ob differenziell exprimierte Gene in mehr als einem Gruppenvergleich auftreten. Hierbei wurde die statistische Toleranz von 15 auf 13 von 16 Kreuzvergleichen, in denen der Expressionsniveauunterschied auftreten muß, herabgesetzt.

Es zeigte sich, dass es keine gleichgerichteten Genexpressionsniveauunterschiede in den beiden Gruppenvergleichen der Gruppe „Therapiert“ gab. Dieser Umstand ist dem Studiendesign im kreuzweisen Paarvergleich zugrunde zu legen.

Bezüglich der Gruppe „Krank“ war eine relative Unterexpression von Clusterin (CLU), der Monozyten-Serinesterase CES1, des Chemokinrezeptors CCR1, des NK-Zellrezeptors CLEC4D und des Transkriptionsfaktors MAFB in NK-Zellen beider Gruppenvergleiche auffällig. Clusterin, ein sezerniertes Glykoprotein, ist bei hohem intrazellulärem Aufkommen in Osteosarkomzelllinien mit erhöhter Sensibilität gegenüber oxidativem Stress und proapoptotischer Wirkung bzw. Zytostase assoziiert (Trougakos et al. 2005). Ein Mangel an der zur Detoxifikation von Xenobiotika befähigten Carboxylesterase CES1 scheint mit dem Aufkommen von Non-Hodgkin-Lymphomen kombiniert zu sein, was in Studien nachgewiesen werden konnte (Glinsky et al. 2005; Yang et al. 2009). Der C-type lectin receptor CLEC4D ist zur Antigenaufnahme und Weiterverarbeitung bzw. Präsentation befähigt und spielt daher in puncto Immunabwehr eine wichtige Rolle (Arce et al. 2004). Der ebenfalls in zwei Gruppenvergleichen der Gruppe „Krank“ herunterregulierte Chemokinrezeptor CCR1 ist zur lymphozytären Chemotaxis befähigt (Vaidehi et al. 2006). Der Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktor MAFB ist zur Regulation der humanen Monozytopoese befähigt und in NK-Zellen „kranker“ Patienten relativ unterexprimiert (Gemelli et al. 2006). Diese Ergebnisse zeigen mögliche Kandidatengene auf, die in NK-Zellen der Gruppe „Krank“ im Expressionslevel relativ herunterreguliert sind und an verminderter physiologischer NK-Zellfunktion bzw. Immunabwehr beteiligt und somit möglicherweise für das Aufkommen von Krebszellen mitverantwortlich sind.

Als mögliche Antwort auf die bestehende Tumorerkrankung bzw. die absolvierte Therapie zeigten sich im Vergleich zur Gruppe „Gesund“ bei den beiden Tumorgruppen „Krank“ und „Therapiert“ mehrere Gene mit hochregulierten Expressionsleveln. Zum einen handelt es sich hierbei um die Zytokinrezeptoren CXCR3, CCR7 und IL7R und zum anderen um die zur Immunantwort zu attribuierenden Gene TRAT1, CD8B und TRA@. Die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR7 sind zur Leukozytenrekrutierung bzw. Antitumoraktivitätsvermittlung befähigt (s. Kap. 4.2.2.3) (Hensbergen et al. 2005; Iijima et al. 2005; Lazzeri et al. 2005). Der Interleukin-Rezeptor IL7R trägt entscheidend zur Lymphopoese bei (s. Kap. 4.2.2.2) (Puel et al. 1998). TRAT1 stabilisiert den TCR/CD3-Komplex an der Zelloberfläche und reguliert die intrazelluläre TCR-Signaltransduktion über dessen Expressierung (Kirchgessner et al. 2001). Die alpha-Kette des TCR TRA@ wird der Interaktion mit dem CD8-Corezeptor und folgender MHC-Erkennung und Signalinitiierung zugeschrieben (Mallaun et al. 2008). Die beta-Kette des T-Zell-Corezeptors CD8 (CD8B) wird funktionell der T-Zell-vermittelten Zytotoxizität attribuiert (Devine et al. 2000). Es zeigen sich somit mehrere relativ überexprimierte Gene in den Tumorgruppen, die zur

Zellaktivierung beitragen und als Reaktion auf die maligne Erkrankung zu interpretieren werden könnten. Zusätzlich ist die Überexpression des Proteinkinase C-bindenden Proteins NELL2 in den NK-Zellen der Tumorgruppen auffällig. Dieses zur EGF-Familie gehörende Genprodukt ist in leukämischen Zelllinien früher hämatopoetischer Stufen in hohem Maße nachgewiesen worden, was auf eine proliferative Funktion schließen lassen könnte (Luce et al. 1999).

4.3 Klinische Perspektive

Die Prognose maligner Kopf-Hals-Tumoren ist trotz fortschreitender Forschung und Therapieoptimierung in den letzten 30 Jahren weitgehend unverändert und somit verbesserungswürdig (Ferlay J 2004). Die genaue Erforschung der Pathogenese und der für den jeweiligen Tumorstatus verantwortlichen Umstände ist zentraler Bestandteil für die Generierung neuer bzw. optimierter Therapieansätze. Der Einzug immunologischer Methoden in Diagnostik und Therapie maligner Erkrankungen zeigte entscheidene Vorteile und verdeutlicht das Potenzial der Kenntnis antitumoröser Mechanismen auf molekulargenetischer Ebene. Die Durchflußzytometrie (MACS), ELISA oder die PCR aber auch der EGFR-Antikörper Cetuximab sind heutzutage etablierte immunologische Verfahren in Diagnostik und Therapie (Mehra et al. 2008). Es existieren verschiedene vielversprechende Ansätze für neue aktive und passive Immuntherapieverfahren zur Behandlung von Krebserkrankungen (Agada et al. 2009; Lohr F 2005). Monoklonale Antikörper gegen EGFR, VEGF und CD44- oder CD89-Antagonisten sind Gegenstand intensivierter Forschung. Kombinierte Zytokinprodukte (Multikine) oder der p53 exprimierende adenovirale Vektor (IGN-201) stellen weitere immunologische Therapiemöglichkeiten für Patienten mit fortgeschrittenen inoperablen Tumoren dar, die zur Zeit in Studien erprobt werden (Lohr F 2005).

Über Antigen-präsentierende Zellen (z. B. Langerhans-Zellen, Makrophagen oder dendritische Zellen), T- und B-Lymphozyten und nicht zuletzt NK-Zellen ist das Immunsystem zur antitumorösen Antwort befähigt (Agada et al. 2009). Autologe Tumorzellvakzinierung zur T-Zellaktivitätserhöhung, dendritische Zellinduktion und –reifung über Vakzinierung mit nekrotischen HNSCC-Zelllinien und Gabe von rekombinantem IL-12 sind Ansätze zur adjuvanten Tumorthherapie (Agada et al. 2009).

Ebenso scheint spezifischen Adjuvanzen eine wichtige Rolle zuzukommen. Am Mausmodell führte eine Vakzinierung mit Tocotrienol versetzten dendritischen Zellen zu einer erhöhten peripheren NK-Zellzahl und vermindertem Tumorzellwachstum (Abdul Hafid SR et al. 2010).

Vor dem Hintergrund der „immunological surveillance“ bilden die genetischen Regulationsprozesse der NK-Zellfunktion eine Schlüsselrolle für Therapieansätze (Burnet 1970). Die Identifizierung von Zytotoxizität bzw. Zellaktivität steigernden Genen ist im Hinblick auf Inhibierung von Neuaufkommen maligne transformierter Zellen oder auch Rezidivmanifestierung von entscheidender Bedeutung.

Es konnten in der vorliegenden Arbeit u. a. hochregulierte Gene bei rezidivfreien Tumorpatienten identifiziert werden, die die Zytotoxizität und das periphere Aufkommen von NK-Zellen positiv beeinflussen. Ebenso konnten deutliche Unterschiede im Expressionsniveau von zur Immunabwehr befähigten Genprodukten zwischen gesunden Probanden und an einem Karzinom leidenden Patienten gesehen werden.

Mithilfe dieser Arbeit soll ein Teil im Puzzle der Grundlagenforschung geschaffen werden, die es ermöglichen soll, die Immunfunktionen von natürlichen Killerzellen besser zu verstehen. Für die genaue Charakterisierung der einzelnen detektierten Gene sind weitere Forschungsarbeiten erforderlich, für welche hier eine „Kandidatenübersicht“ gegeben wird.

5. Zusammenfassung

Natürliche Killerzellen sind als Bestandteil des angeborenen unspezifischen Immunsystems in der Lage, Targetzellen wie virusinfizierte und maligne transformierte Zellen zu erkennen und abzutöten („immunological surveillance“). Hauseigene Untersuchungen zeigten eine sowohl erhöhte absolute NK-Zellzahl im peripher-venösen Blut als auch einen erhöhten Anteil an peripher-mononukleären Zellen bei bereits therapierten, rezidivfreien Patienten mit Kopf-Hals-Karzinom. Vor dem Hintergrund des Potenzials der NK-Zellen, Krebszellen zu eliminieren, sollte das Phänomen der erhöhten Anzahl im Zusammenhang mit dem rezidivfreien Status der therapierten Patienten auf gesamt-genomischer Basis mithilfe einer Genexpressionsanalyse untersucht werden.

Es wurden drei klinische Gruppen aus 143 Probanden gebildet. Dies waren akut an einem Kopf-Hals-Karzinom erkrankte Patienten ohne bisherige Therapie („Krank“), bereits therapierte, rezidivfreie Tumorpatienten („Therapiert“) sowie gesunde, tumorfreie Kontrollprobanden („Gesund“). Es wurde peripher-venöses Blut gewonnen, die NK-Zellen von peripher-mononukleären Zellen isoliert, durchflußzytometrisch gezählt und immunophänotypisiert. Nach Gewinnung der Gesamt-RNA aus den NK-Zellen wurde diese für die anschließende Genexpressionsanalyse in Microarraytechnik aufbereitet. Es wurde das Expressionsniveau von über 47000 Transkripten analysiert und in drei Gruppen („Therapiert vs. Gesund“, „Krank vs. Gesund“ und „Therapiert vs. Krank“) vergleichend dargestellt und funktionell interpretiert.

Bestätigend mit früheren hauseigenen Untersuchungen zeigte sich ein hochsignifikant erhöhter Anteil von NK-Zellen an PBMC in der Gruppe „Therapiert“ von 25,9 % im Vergleich zu 15,5 % der Gruppe „Krank“ und 15,4 % bei „gesunden“ Probanden. Die Zellzahlerhöhung korrelierte hierbei signifikant gering mit dem Alter der Patienten.

Im Expressionsprofiling zeigten sich je nach Gruppenvergleich und Expressionsrichtung 3 bis 47 differenziell exprimierte Gene (innerhalb der Einschlusskriterien insgesamt 122). Es konnten Gene identifiziert werden, die in der Gruppe „Therapiert“ überexprimiert waren und unterschiedlichen biologischen Funktionen zugeschrieben werden. Eine zentrale Rolle zur Aufklärung des erhöhten NK-Zellanteils kommt den Chemotaxis vermittelnden Chemokinrezeptoren wie CCR7, CXCR3 sowie den Transkriptionsfaktoren MAFB, LCF7, CES1 und MYC zu, welche relativ überexprimiert waren. Ebenso konnten in der Gruppe „Therapiert“ für Immunantwort verantwortliche hochregulierte Gene wie ICOS, IL7R, CD5 und CRTAM identifiziert werden.

Zusätzlich wurden Gene detektiert, die im Gruppenvergleich „Krank vs. Gesund“ als auch in mehr als einem Gruppenvergleich differenziell exprimiert waren.

Intention dieser Arbeit war es, die für klinischen Status und erhöhten NK-Zellanteil bzw. –aktivität verantwortlichen Gene zu identifizieren. Die genaue Kenntnis der entsprechenden Genproduktfunktionen besitzt große klinische Relevanz und könnte einen Ansatzpunkt für Immunotherapien bei Tumorpatienten darstellen.

6. Literatur

1. Abdul Hafid SR, Radhakrishnan AK, Nesaretnam K. Tocotrienols are good adjuvants for developing cancer vaccines. *BMC Cancer*. 2010 Jan 6;10:5. [Epub ahead of print]. Available from: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2407-10-5.pdf>
2. Affymetrix, Inc.. Data Sheet: GeneChip® Human Genome Arrays. Part No. 701484 Rev. 4. Santa Clara: The Association; 2003-2004. Available from: http://www.affymetrix.com/support/technical/datasheets/human_datasheet.pdf
3. Affymetrix, Inc.. Technical Note: GeneChip® Expression Platform: Comparison, Evolution, and Performance. Part No. 701632 Rev. 2. Santa Clara: The Association; 2004. Available from: http://www.affymetrix.com/support/technical/technotes/expression_comparison_technote.pdf
4. Agada FO, Alhamarneh O, Stafford ND et al. Immunotherapy in head and neck cancer: current practice and future possibilities. *J Laryngol Otol* 2009; 123:19-28.
5. Arase H, Mocarski ES, Campbell AE et al. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* 2002; 296:1323-6.
6. Arce I, Martinez-Munoz L, Roda-Navarro P et al. The human C-type lectin CLECSF8 is a novel monocyte/macrophage endocytic receptor. *Eur J Immunol* 2004; 34:210-20.
7. Bancroft GJ, Schreiber RD, Unanue ER. Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. *Immunol Rev* 1991; 124:5-24.
8. Bandyopadhyay S, Perussia B, Trinchieri G et al. Requirement for HLA-DR+ accessory cells in natural killing of cytomegalovirus-infected fibroblasts. *J Exp Med* 1986; 164:180-95.
9. Barcena A, Galy AH, Punnonen J et al. Lymphoid and myeloid differentiation of fetal liver CD34+lineage- cells in human thymic organ culture. *J Exp Med* 1994; 180:123-32.
10. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D: World Health Organisation Classification of Tumors - Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors. Lyon: IARC Press 2005.
11. BD Biosciences. Simultest™ IMK Plus. In: Catalog No. 349217. Series Simultest™. San Jose: The Association; 2000. 56 p.
12. Bennett IM, Zatzepina O, Zamai L et al. Definition of a natural killer NKR-P1A+/CD56-/CD16- functionally immature human NK cell subset that differentiates in vitro in the presence of interleukin 12. *J Exp Med* 1996; 184:1845-56.

13. Biron CA, Byron KS, Sullivan JL. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med* 1989; 320:1731-5.
14. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC et al. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:189-220.
15. Biron CA, Turgiss LR, Welsh RM. Increase in NK cell number and turnover rate during acute viral infection. *J Immunol* 1983; 131:1539-45.
16. Bisset LR, Lung TL, Kaelin M et al. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *Eur J Haematol* 2004; 72:203-12.
17. Bloom BR. Natural killers to rescue immune surveillance? *Nature* 1982; 300:214-5.
18. Bose A, Chakraborty T, Chakraborty K et al. 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* 2008; 8:10.
19. Bourin P, Mansour I, Doinel C et al. Circadian rhythms of circulating NK cells in healthy and human immunodeficiency virus-infected men. *Chronobiol Int* 1993; 10:298-305.
20. Bouwens L, Wisse E. Pit cells in the liver. *Liver* 1992; 12:3-9.
21. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998; 391:795-9.
22. Brittenden J, Heys SD, Ross J et al. Natural killer cells and cancer. *Cancer* 1996; 77:1226-43.
23. Brodin P, Karre K, Hoglund P. NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat. *Trends Immunol* 2009; 30:143-9.
24. Bukowski JF, Biron CA, Welsh RM. Elevated natural killer cell-mediated cytotoxicity, plasma interferon, and tumor cell rejection in mice persistently infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Immunol* 1983; 131:991-6.
25. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 1970; 13:1-27.
26. Buttner P, Mosig S, Funke H. Gene expression profiles of T lymphocytes are sensitive to the influence of heavy smoking: A pilot study. *Immunogenetics* 2007; 59:37-43.
27. Cerwenka A, Lanier LL. NKG2D ligands: unconventional MHC class I-like molecules exploited by viruses and cancer. *Tissue Antigens* 2003; 61:335-43.
28. Chehimi J, Starr SE, Frank I et al. Natural killer (NK) cell stimulatory factor increases the cytotoxic activity of NK cells from both healthy donors and human immunodeficiency virus-infected patients. *J Exp Med* 1992; 175:789-96.

29. Chuaqui RF, Bonner RF, Best CJ et al. Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nat Genet* 2002; 32 Suppl:509-14.
30. Cichocki F, Hanson RJ, Lenvik T et al. The transcription factor c-Myc enhances KIR gene transcription through direct binding to an upstream distal promoter element. *Blood* 2009; 113:3245-53.
31. Colonna M, Facchetti F. TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells): a new player in acute inflammatory responses. *J Infect Dis* 2003; 187 Suppl 2:S397-401.
32. Colucci F, Caligiuri MA, Di Santo JP. What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol* 2003; 3:413-25.
33. Colucci F, Di Santo JP, Leibson PJ. Natural killer cell activation in mice and men: different triggers for similar weapons? *Nat Immunol* 2002; 3:807-13.
34. Criado M, Lindstrom JM, Anderson CG et al. Cytotoxic granules from killer cells: specificity of granules and insertion of channels of defined size into target membranes. *J Immunol* 1985; 135:4245-51.
35. Cuturi MC, Anegon I, Sherman F et al. Production of hematopoietic colony-stimulating factors by human natural killer cells. *J Exp Med* 1989; 169:569-83.
36. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2007; 356:1944-56.
37. Parkin DM, Wehlan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. Cancer Incidence in Five Continents Volume VIII. IARC Scientific Publications No. 155. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2002. Available from: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/epi/sp155/ci5v8-cover.pdf>
38. Dahlstrom KR, Adler-Storthz K, Etzel CJ et al. Human papillomavirus type 16 infection and squamous cell carcinoma of the head and neck in never-smokers: a matched pair analysis. *Clin Cancer Res* 2003; 9:2620-6.
39. Dealtry GB, Naylor MS, Fiers W et al. DNA fragmentation and cytotoxicity caused by tumor necrosis factor is enhanced by interferon-gamma. *Eur J Immunol* 1987; 17:689-93.
40. Desoize B. Metals and metal compounds in carcinogenesis. *In Vivo* 2003; 17:529-39.
41. Devine L, Kieffer LJ, Aitken V et al. Human CD8 beta, but not mouse CD8 beta, can be expressed in the absence of CD8 alpha as a beta beta homodimer. *J Immunol* 2000; 164:833-8.
42. Ding YS, Ashley DL, Watson CH. Determination of 10 carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream cigarette smoke. *J Agric Food Chem* 2007; 55:5966-73.
43. Dowdell KC, Cua DJ, Kirkman E et al. NK cells regulate CD4 responses prior to antigen encounter. *J Immunol* 2003; 171:234-9.

44. Duesberg P, Li R. Multistep carcinogenesis: a chain reaction of aneuploidizations. *Cell Cycle* 2003; 2:202-10.
45. Durig J, Nuckel H, Huttmann A et al. Expression of ribosomal and translation-associated genes is correlated with a favorable clinical course in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2003; 101:2748-55.
46. Endo Y, Matsushita M, Fujita T. Role of ficolin in innate immunity and its molecular basis. *Immunobiology* 2007; 212:371-9.
47. Fazili Z, Sun W, Mittelstaedt S et al. Disabled-2 inactivation is an early step in ovarian tumorigenicity. *Oncogene* 1999; 18:3104-13.
48. Fehniger TA, Caligiuri MA. Ontogeny and expansion of human natural killer cells: clinical implications. *Int Rev Immunol* 2001; 20:503-34.
49. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ et al. 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* 2003; 101:3052-7.
50. Ferlay J et al, editors. *Globocan 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide*. IARC Cancer Base No.5. Version 2.0. Lyon: IARC Press; 2004.
51. Ferlazzo G, Thomas D, Lin SL et al. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol* 2004; 172:1455-62.
52. Fitzgerald PA, Mendelsohn M, Lopez C. Human natural killer cells limit replication of herpes simplex virus type 1 in vitro. *J Immunol* 1985; 134:2666-72.
53. Friedl P. Cell fusion: new mechanisms of plasticity in cancer? *Lancet Oncol* 2005; 6:916-8.
54. Furukawa T, Tanji E, Xu S et al. Feedback regulation of DUSP6 transcription responding to MAPK1 via ETS2 in human cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 377:317-20.
55. Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol* 2003; 195:346-55.
56. Garcia-Penarrubia P, Koster FT, Kelley RO et al. Antibacterial activity of human natural killer cells. *J Exp Med* 1989; 169:99-113.
57. Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA et al. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:6115-9.
58. Gemelli C, Montanari M, Tenedini E et al. Virally mediated MafB transduction induces the monocyte commitment of human CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Death Differ* 2006; 13:1686-96.

59. Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C et al. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 195:327-33.
60. Gerstner AOH. Früherkennung von Kopf-Hals-Tumoren, Entwicklung, aktueller Stand und Perspektiven. *Laryngo-Rhino-Otol* 2008; S1:1-20.
61. Glinsky GV, Berezovska O, Glinskii AB. Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. *J Clin Invest* 2005; 115:1503-21.
62. Gorsch SM, Memoli VA, Stukel TA et al. Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res* 1992; 52:6949-52.
63. Gottschlich S, Ambrosch P, Cordes C et al. Gene expression profiling of head and neck squamous cell carcinoma using cDNA microarrays. *Int J Oncol* 2006; 29:605-13.
64. Gronbaek M, Becker U, Johansen D et al. Population based cohort study of the association between alcohol intake and cancer of the upper digestive tract. *Bmj* 1998; 317:844-7.
65. Gustavsson P, Jakobsson R, Johansson H et al. Occupational exposures and squamous cell carcinoma of the oral cavity, pharynx, larynx, and oesophagus: a case-control study in Sweden. *Occup Environ Med* 1998; 55:393-400.
66. Haas I, Hauser U, Ganzer U. The dilemma of follow-up in head and neck cancer patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2001; 258:177-83.
67. Hatcher FM, Kuhn RE. Destruction of *Trypanosoma cruzi* by Natural killer cells. *Science* 1982; 218:295-6.
68. Hensbergen PJ, Wijnands PG, Schreurs MW et al. The CXCR3 targeting chemokine CXCL11 has potent antitumor activity in vivo involving attraction of CD8+ T lymphocytes but not inhibition of angiogenesis. *J Immunother* 2005; 28:343-51.
69. Herberman RB, Djeu J, Kay HD et al. Natural killer cells: characteristics and regulation of activity. *Immunol Rev* 1979; 44:43-70.
70. Herberman RB, Holden HT. Natural cell-mediated immunity. *Adv Cancer Res* 1978; 27:305-77.
71. Herberman RB, Ortaldo JR. Natural killer cells: their roles in defenses against disease. *Science* 1981; 214:24-30.
72. Hersey P, Edwards A, Honeyman M et al. Low natural-killer-cell activity in familial melanoma patients and their relatives. *Br J Cancer* 1979; 40:113-22.
73. Hicklin DJ, Marincola FM, Ferrone S. HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol Med Today* 1999; 5:178-86.

74. Hidore MR, Murphy JW. Murine natural killer cell interactions with a fungal target, *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1989; 57:1990-7.
75. Hochman PS, Cudkowicz G, Dausset J. Decline of natural killer cell activity in sublethally irradiated mice. *J Natl Cancer Inst* 1978; 61:265-8.
76. Hoffman HT, Karnell LH, Funk GF et al. The National Cancer Data Base report on cancer of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 124:951-62.
77. Hoffmann D, Brunnemann KD, Prokopczyk B et al. Tobacco-specific N-nitrosamines and Aroclor-derived N-nitrosamines: chemistry, biochemistry, carcinogenicity, and relevance to humans. *J Toxicol Environ Health* 1994; 41:1-52.
78. Houchins JP, Yabe T, McSherry C et al. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med* 1991; 173:1017-20.
79. Huber V, Fais S, Iero M et al. Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology* 2005; 128:1796-804.
80. Igney FH, Behrens CK, Krammer PH. CD95L mediates tumor counterattack in vitro but induces neutrophil-independent tumor rejection in vivo. *Int J Cancer* 2005; 113:78-87.
81. Ihrie RA, Attardi LD. Perpetrating p53-dependent apoptosis. *Cell Cycle* 2004; 3:267-9.
82. Iijima N, Yanagawa Y, Clingan JM et al. CCR7-mediated c-Jun N-terminal kinase activation regulates cell migration in mature dendritic cells. *Int Immunol* 2005; 17:1201-12.
83. Jaleco AC, Neves H, Hooijberg E et al. Differential effects of Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation. *J Exp Med* 2001; 194:991-1002.
84. Joag S, Zychlinsky A, Young JD. Mechanisms of lymphocyte-mediated lysis. *J Cell Biochem* 1989; 39:239-52.
85. Kadish AS, Doyle AT, Steinhauer EH et al. Natural cytotoxicity and interferon production in human cancer: deficient natural killer activity and normal interferon production in patients with advanced disease. *J Immunol* 1981; 127:1817-22.
86. Kaiser BK, Barahmand-Pour F, Paulsene W et al. Interactions between NKG2x immunoreceptors and HLA-E ligands display overlapping affinities and thermodynamics. *J Immunol* 2005; 174:2878-84.
87. Karre K. Express yourself or die: peptides, MHC molecules, and NK cells. *Science* 1995; 267:978-9.
88. Karre K. Natural killer cells and the MHC class I pathway of peptide presentation. *Semin Immunol* 1993; 5:127-45.

89. Kendziorski CM, Zhang Y, Lan H et al. The efficiency of pooling mRNA in microarray experiments. *Biostatistics* 2003; 4:465-77.
90. Kiessling R, Klein E, Pross H et al. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* 1975; 5:117-21.
91. Kim MK, Huang ZY, Hwang PH et al. Fcγ receptor transmembrane domains: role in cell surface expression, γ chain interaction, and phagocytosis. *Blood* 2003; 101:4479-84.
92. Kirchgessner H, Dietrich J, Scherer J et al. The transmembrane adaptor protein TRIM regulates T cell receptor (TCR) expression and TCR-mediated signaling via an association with the TCR zeta chain. *J Exp Med* 2001; 193:1269-84.
93. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 1995; 14:5579-88.
94. Kramer IR, Lucas RB, Pindborg JJ et al. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978; 46:518-39.
95. Kunz B, Held W. Positive and negative roles of the trans-acting T cell factor-1 for the acquisition of distinct Ly-49 MHC class I receptors by NK cells. *J Immunol* 2001; 166:6181-7.
96. Lang S, Wollenberg B, Dellian M et al. [Clinical and epidemiological data of patients with malignomas of the head and neck]. *Laryngorhinootologie* 2002; 81:499-508.
97. Lazzeri E, Romagnani P. CXCR3-binding chemokines: novel multifunctional therapeutic targets. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2005; 5:109-18.
98. LeCouter J, Lin R, Tejada M et al. The endocrine-gland-derived VEGF homologue Bv8 promotes angiogenesis in the testis: Localization of Bv8 receptors to endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:2685-90.
99. Leffers N, Gooden MJ, de Jong RA et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2008.
100. Leibson PJ. Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer. *Immunity* 1997; 6:655-61.
101. Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT. *Williams Hematology*, 7th edition (October 14, 2005). New York: McGraw-Hill Professional; 2007, 1856 p.
102. Lin H, Juang JL, Wang PS. Involvement of Cdk5/p25 in digoxin-triggered prostate cancer cell apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279:29302-7.

103. Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR et al. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 1999; 21:20-4.
104. Litwin V, Gumperz J, Parham P et al. NKB1: a natural killer cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules. *J Exp Med* 1994; 180:537-43.
105. Liu CC, Perussia B, Young JD. The emerging role of IL-15 in NK-cell development. *Immunol Today* 2000; 21:113-6.
106. Liu ET, Karuturi KR. Microarrays and clinical investigations. *N Engl J Med* 2004; 350:1595-7.
107. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990; 11:237-44.
108. Lockhart DJ, Winzeler EA. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 2000; 405:827-36.
109. Lohr F DA, Hoos A. Modern Immunotherapeutic Approaches to Cancers of the Lung and Head and Neck. *Der Onkologe* 2005; 5:554-70.
110. Luce MJ, Burrows PD. The neuronal EGF-related genes NELL1 and NELL2 are expressed in hemopoietic cells and developmentally regulated in the B lineage. *Gene* 1999; 231:121-6.
111. Maier H, Dietz A, Gewelke U et al. Tobacco and alcohol and the risk of head and neck cancer. *Clin Investig* 1992; 70:320-7.
112. Maier H, Tisch M. [Occupation and cancer of the head-neck area]. *Hno* 1999a; 47:1025-37.
113. Maier H, Tisch M, Dietz A et al. [Construction workers as an extreme risk group for head and neck cancer?]. *Hno* 1999b; 47:730-6.
114. Maier H, Tisch M, Enderle G et al. [Occupational exposure to paint, lacquer and solvents, and cancer risk in the area of the upper aero-digestive tract]. *Hno* 1997; 45:905-8.
115. Mallaun M, Naeher D, Daniels MA et al. The T cell receptor's alpha-chain connecting peptide motif promotes close approximation of the CD8 coreceptor allowing efficient signal initiation. *J Immunol* 2008; 180:8211-21.
116. Marquez C, Trigueros C, Franco JM et al. Identification of a common developmental pathway for thymic natural killer cells and dendritic cells. *Blood* 1998; 91:2760-71.
117. Mehra R, Cohen RB, Burtness BA. The role of cetuximab for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Adv Hematol Oncol* 2008; 6:742-50.
118. Mehrle S, Schmidt J, Buchler MW et al. Enhancement of anti-tumor activity in vitro and in vivo by CD150 and SAP. *Mol Immunol* 2008; 45:796-804.

119. Michiels S, Le Maitre A, Buyse M et al. Surrogate endpoints for overall survival in locally advanced head and neck cancer: meta-analyses of individual patient data. *Lancet Oncol* 2009; 10:341-50.
120. Mirandola P, Ponti C, Gobbi G et al. Activated human NK and CD8+ T cells express both TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity. *Blood* 2004; 104:2418-24.
121. Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:656-63.
122. Molling JW, Kolgen W, van der Vliet HJ et al. Peripheral blood IFN-gamma-secreting V α 24+V β 11+ NKT cell numbers are decreased in cancer patients independent of tumor type or tumor load. *Int J Cancer* 2005; 116:87-93.
123. Mond JJ, Brunswick M. A role for IFN-gamma and NK cells in immune responses to T cell-regulated antigens types 1 and 2. *Immunol Rev* 1987; 99:105-18.
124. Moretta A. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:957-64.
125. Moretta A, Bottino C, Vitale M et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2001a; 19:197-223.
126. Moretta L, Bottino C, Cantoni C et al. Human natural killer cell function and receptors. *Curr Opin Pharmacol* 2001b; 1:387-91.
127. Morton HC, Brandtzaeg P. CD89: the human myeloid IgA Fc receptor. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2001; 49:217-29.
128. Mrozek E, Anderson P, Caligiuri MA. Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996; 87:2632-40.
129. Murphy WJ, Keller JR, Harrison CL et al. Interleukin-2-activated natural killer cells can support hematopoiesis in vitro and promote marrow engraftment in vivo. *Blood* 1992; 80:670-7.
130. Nemeth MJ, Bodine DM. Regulation of hematopoiesis and the hematopoietic stem cell niche by Wnt signaling pathways. *Cell Res* 2007; 17:746-58.
131. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 2002; 52:195-215.
132. Niu C, Zhang J, Breslin P et al. c-Myc is a target of Rbm15 in the regulation of adult hematopoietic stem cell and megakaryocyte development. *Blood* 2009.
133. Niwa Y, Kanda H, Shikauchi Y et al. Methylation silencing of SOCS-3 promotes cell growth and migration by enhancing JAK/STAT and FAK signalings in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2005; 24:6406-17.

134. Okamoto N, Tezuka K, Kato M et al. PI3-kinase and MAP-kinase signaling cascades in AILIM/ICOS- and CD28-costimulated T-cells have distinct functions between cell proliferation and IL-10 production. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310:691-702.
135. Ortaldo JR, Herberman RB. Heterogeneity of natural killer cells. *Annu Rev Immunol* 1984; 2:359-94.
136. Ostwald J, Dommerich S, Schulz U et al. [Long-term changes in peripheral blood leukocyte and lymphocyte populations in ENT-carcinoma patients. A flow cytometric study in 346 ENT-carcinoma patients and 31 healthy controls]. *Hno* 2004; 52:685-92.
137. Perkins TM, Perkins I. Chronic alcoholism: a common risk factor in oral cancer and alcoholic cirrhosis. *Compend Contin Educ Dent* 2001; 22 (3 Spec No):49-51.
138. Perussia B, Acuto O, Terhorst C et al. Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. II. Studies of B73.1 antibody-antigen interaction on the lymphocyte membrane. *J Immunol* 1983; 130:2142-8.
139. Perussia B, Loza MJ. Assays for antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and reverse ADCC (redirected cytotoxicity) in human natural killer cells. *Methods Mol Biol* 2000; 121:179-92.
140. Pesch B, Pierl CB, Gebel M et al. Occupational risks for adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses in the German wood industry. *Occup Environ Med* 2008; 65:191-6.
141. Petropoulos K, Arseni N, Schessl C et al. A novel role for Lef-1, a central transcription mediator of Wnt signaling, in leukemogenesis. *J Exp Med* 2008; 205:515-22.
142. Phillips JH, Hori T, Nagler A et al. Ontogeny of human natural killer (NK) cells: fetal NK cells mediate cytolytic function and express cytoplasmic CD3 epsilon,delta proteins. *J Exp Med* 1992; 175:1055-66.
143. Pisa P, Halapi E, Pisa EK et al. Selective expression of interleukin 10, interferon gamma, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in ovarian cancer biopsies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:7708-12.
144. Plch J, Par I, Navratilova I et al. Long term follow-up study of laryngeal precancer. *Auris Nasus Larynx* 1998; 25:407-12.
145. Ploegh HL. Viral strategies of immune evasion. *Science* 1998; 280:248-53.
146. Plum J, De Smedt M, Verhasselt B et al. In vitro intrathymic differentiation kinetics of human fetal liver CD34+CD38- progenitors reveals a phenotypically defined dendritic/T-NK precursor split. *J Immunol* 1999; 162:60-8.
147. Probst R, Grevers G, Iro H. *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*, 3. Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag KG; 2008. 309 p.

148. Pross H. Natural killer cell activity in human malignant disease. *Natural Immunity Cancer and Biological Response Modification* 1986;p 196.
149. Puel A, Ziegler SF, Buckley RH et al. Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nat Genet* 1998; 20:394-7.
150. Rajeevan MS, Vernon SD, Taysavang N et al. Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. *J Mol Diagn* 2001; 3:26-31.
151. RKI (Robert Koch Institut), *Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends.*, 6. überarbeitete Auflage. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). 2008.
152. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 1990; 76:2421-38.
153. Ropolo A, Grasso D, Pardo R et al. The pancreatitis-induced vacuole membrane protein 1 triggers autophagy in mammalian cells. *J Biol Chem* 2007; 282:37124-33.
154. Rosenquist K, Wennerberg J, Schildt EB et al. Oral status, oral infections and some lifestyle factors as risk factors for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. A population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol* 2005; 125:1327-36.
155. Ruan W, Xu E, Xu F et al. IGFBP7 plays a potential tumor suppressor role in colorectal carcinogenesis. *Cancer Biol Ther* 2007; 6:354-9.
156. Sanchez MJ, Muench MO, Roncarolo MG et al. Identification of a common T/natural killer cell progenitor in human fetal thymus. *J Exp Med* 1994; 180:569-76.
157. Santagostino A, Garbaccio G, Pistorio A et al. An Italian national multicenter study for the definition of reference ranges for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults. *Haematologica* 1999; 84:499-504.
158. Santoli D, Trinchieri G, Lief FS. Cell-mediated cytotoxicity against virus-infected target cells in humans. I. Characterization of the effector lymphocyte. *J Immunol* 1978; 121:526-31.
159. Scherubl H, Steinberg J, Schwertner C, et al. [Coincidental squamous cell cancers of the esophagus, head, and neck: risk and screening]. *Hno* 2008;56:603-8.
160. Schwartz LH, Ozsahin M, Zhang GN et al. Synchronous and metachronous head and neck carcinomas. *Cancer* 1994; 74:1933-8.
161. Seifert R, Wenzel-Seifert K. The human formyl peptide receptor as model system for constitutively active G-protein-coupled receptors. *Life Sci* 2003; 73:2263-80.
162. Seino K, Kayagaki N, Okumura K et al. Antitumor effect of locally produced CD95 ligand. *Nat Med* 1997; 3:165-70.
163. Seiwert TY, Cohen EE. State-of-the-art management of locally advanced head and neck cancer. *Br J Cancer* 2005; 92:1341-8.

164. Sethi S, Lu M, Kapke A et al. Patient and tumor factors at diagnosis in a multi-ethnic primary head and neck squamous cell carcinoma cohort. *J Surg Oncol* 2009; 99:104-8.
165. Shafer WG, Waldron CA. Erythroplakia of the oral cavity. *Cancer* 1975; 36:1021-8.
166. Shibuya A, Nagayoshi K, Nakamura K et al. Lymphokine requirement for the generation of natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1995; 85:3538-46.
167. Shresta S, Pham CT, Thomas DA et al. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol* 1998; 10:581-7.
168. Silva MR, Hoffman R, Srour EF et al. Generation of human natural killer cells from immature progenitors does not require marrow stromal cells. *Blood* 1994; 84:841-6.
169. Sivori S, Falco M, Marcenaro E et al. Early expression of triggering receptors and regulatory role of 2B4 in human natural killer cell precursors undergoing in vitro differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:4526-31.
170. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953; 6:963-8.
171. Smith HR, Heusel JW, Mehta IK et al. Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:8826-31.
172. Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K et al. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:850-61.
173. Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M et al. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 1993; 72:767-78.
174. Sorensen RB, Svane IM, Straten PT et al. A survivin specific T-cell clone from a breast cancer patient display universal tumor cell lysis. *Cancer Biol Ther* 2008; 7 (12).
175. Statistisches Bundesamt Deutschland: Pressemitteilung Nr. 303 vom 22.08.2008. 2007: Krankheiten des Herz-/Kreislaufsystems weiterhin häufigste Todesursache. Wiesbaden: The Association; 2008. Available from: http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2008/08/PD08__303__232,templateId=renderPrint.psml
176. Storkus WJ, Howell DN, Salter RD et al. NK susceptibility varies inversely with target cell class I HLA antigen expression. *J Immunol* 1987; 138:1657-9.
177. Strayer DR, Carter WA, Mayberry SD et al. Low natural cytotoxicity of peripheral blood mononuclear cells in individuals with high familial incidences of cancer. *Cancer Res* 1984; 44:370-4.
178. Sulica A, Morel P, Metes D et al. Ig-binding receptors on human NK cells as effector and regulatory surface molecules. *Int Rev Immunol* 2001; 20:371-414.

179. Sullivan JL, Byron KS, Brewster FE et al. Deficient natural killer cell activity in x-linked lymphoproliferative syndrome. *Science* 1980; 210:543-5.
180. Sung HY, Guan H, Czibula A et al. Human tribbles-1 controls proliferation and chemotaxis of smooth muscle cells via MAPK signaling pathways. *J Biol Chem* 2007; 282:18379-87.
181. Takasugi M, Mickey MR, Terasaki PI. Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumor cells. *Cancer Res* 1973; 33:2898-902.
182. Talamini R, Bosetti C, La Vecchia C et al. Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer Causes Control* 2002; 13:957-64.
183. Taniguchi M, Miura K, Iwao H et al. Quantitative assessment of DNA microarrays--comparison with Northern blot analyses. *Genomics* 2001; 71:34-9.
184. Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW. The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos. *Cancer* 2009.
185. Timonen T, Ortaldo JR, Herberman RB. Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells. *J Exp Med* 1981; 153:569-82.
186. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989; 47:187-376.
187. Trinchieri G, Perussia B. Human natural killer cells: biologic and pathologic aspects. *Lab Invest* 1984; 50:489-513.
188. Trougakos IP, Lourda M, Agiostratidou G et al. Differential effects of clusterin/apolipoprotein J on cellular growth and survival. *Free Radic Biol Med* 2005; 38:436-49.
189. Tsai LH, Delalle I, Caviness VS, Jr. et al. p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* 1994; 371:419-23.
190. Tschentscher F, Husing J, Holter T et al. Tumor classification based on gene expression profiling shows that uveal melanomas with and without monosomy 3 represent two distinct entities. *Cancer Res* 2003; 63:2578-84.
191. Turesky RJ. The role of genetic polymorphisms in metabolism of carcinogenic heterocyclic aromatic amines. *Curr Drug Metab* 2004; 5:169-80.
192. Urakami S, Shiina H, Enokida H et al. Epigenetic inactivation of Wnt inhibitory factor-1 plays an important role in bladder cancer through aberrant canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Clin Cancer Res* 2006; 12:383-91.
193. Vaidehi N, Schlyer S, Trabanino RJ et al. Predictions of CCR1 chemokine receptor structure and BX 471 antagonist binding followed by experimental validation. *J Biol Chem* 2006; 281:27613-20.

194. Van de Velde H, von Hoegen I, Luo W et al. The B-cell surface protein CD72/Lyb-2 is the ligand for CD5. *Nature* 1991; 351:662-5.
195. van Herpen CM, van der Voort R, van der Laak JA et al. Intratumoral rhIL-12 administration in head and neck squamous cell carcinoma patients induces B cell activation. *Int J Cancer* 2008; 123:2354-61.
196. Vankayalapati R, Klucar P, Wizel B et al. NK cells regulate CD8+ T cell effector function in response to an intracellular pathogen. *J Immunol* 2004; 172:130-7.
197. Vignery A. Macrophage fusion: are somatic and cancer cells possible partners? *Trends Cell Biol* 2005; 15:188-93.
198. Vossen MT, Matmati M, Hertoghs KM et al. CD27 defines phenotypically and functionally different human NK cell subsets. *J Immunol* 2008; 180:3739-45.
199. Waldfahrer F, Hauptmann B, Iro H. [Lymph node metastasis of glottic laryngeal carcinoma]. *Laryngorhinootologie* 2005; 84:96-100.
200. Wang J, He M, Shi W et al. Inducible costimulator (ICOS) enhances the cytolytic activity of cytokine-induced killer cells against gallbladder cancer in vitro and in vivo. *Cancer Invest* 2009; 27:244-50.
201. Waters CM, Long J, Gorshkova I et al. Cell migration activated by platelet-derived growth factor receptor is blocked by an inverse agonist of the sphingosine 1-phosphate receptor-1. *Faseb J* 2006; 20:509-11.
202. Weisel KC, Yildirim S, Schweikle E et al. Regulation of FLT3 and its ligand in normal hematopoietic progenitor cells. *Ann Hematol* 2009; 88:203-11.
203. Weissler JC, Nicod LP, Lipscomb MF et al. Natural killer cell function in human lung is compartmentalized. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:941-9.
204. Welsh RM, Haspel MV, Parker DC et al. Natural cytotoxicity against mouse hepatitis virus-infected cells. II. A cytotoxic effector cell with a B lymphocyte phenotype. *J Immunol* 1986; 136:1454-60.
205. Williams NS, Klem J, Puzanov IJ et al. Natural killer cell differentiation: insights from knockout and transgenic mouse models and in vitro systems. *Immunol Rev* 1998; 165:47-61.
206. Wittekind C, Meyer HJ, Bootz F. *TNM-Klassifikation maligner Tumoren*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 2002.
207. Wu J, Cherwinski H, Spies T et al. DAP10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative, receptor complexes in natural killer cells. *J Exp Med* 2000; 192:1059-68.
208. Yamamoto K, Yamaguchi M, Miyasaka N et al. SOCS-3 inhibits IL-12-induced STAT4 activation by binding through its SH2 domain to the STAT4 docking site in the IL-12 receptor beta2 subunit. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310:1188-93.

209. Yang D, Pearce RE, Wang X et al. Human carboxylesterases HCE1 and HCE2: ontogenic expression, inter-individual variability and differential hydrolysis of oseltamivir, aspirin, deltamethrin and permethrin. *Biochem Pharmacol* 2009; 77:238-47.
210. Young JD, Cohn ZA. Cellular and humoral mechanisms of cytotoxicity: structural and functional analogies. *Adv Immunol* 1987a; 41:269-332.
211. Young JD, Damiano A, DiNome MA et al. Dissociation of membrane binding and lytic activities of the lymphocyte pore-forming protein (perforin). *J Exp Med* 1987b; 165:1371-82.
212. Yu H, Maurer F, Medcalf RL. Plasminogen activator inhibitor type 2: a regulator of monocyte proliferation and differentiation. *Blood* 2002; 99:2810-8.
213. Yuan D, Koh CY, Wilder JA. Interactions between B lymphocytes and NK cells. *Faseb J* 1994; 8:1012-8.

7. Anhang

7.1 Charakterisierung der Probanden der Genchipanalyse

Im Folgenden ist eine tabellarische Übersicht über die jeweiligen zur Genchipanalyse herangezogenen Probanden gegeben (Tab. 7.1).

Tab. 7.1: Probandenübersicht der Genchipanalyse.

Gruppe	Proben-ID	♀ / ♂	Alter (Jahre)	Tumor-lokalisation	UICC-Stadium	Zeit nach Therapie (Monate)	NK-Zellanteil an PBMC (%)
Krank	268	♀	51	Larynx	IV	-	13,47
Krank	271	♂	45	Larynx	IV	-	16,42
Krank	286	♂	67	Oropharynx	II	-	12,31
Krank	289	♂	55	Oropharynx	IV	-	13,21
Therap.	46	♂	66	Oropharynx	IV	14	25,84
Therap.	80	♂	63	Hypopharynx	IV	12	31,19
Therap.	147	♂	44	Hypopharynx	I	108	25,06
Therap.	150	♂	53	Oropharynx	II	60	25,56
Gesund	250	♂	40	-	-	-	15,25
Gesund	252	♂	18	-	-	-	13,78
Gesund	301	♀	48	-	-	-	15,99
Gesund	304	♀	51	-	-	-	13,48

7.2 Lebenslauf

persönliche Daten:

Geburtsdatum: 13. 05. 1980
Geburtsort: Güstrow
Eltern: Böttcher, Günter, Dipl.-Ingenieur
Böttcher, Hanna, geb. Breese, FÄ für Allgemeinmedizin
Familienstand: ledig

Schulbildung

1986 – 89 Artur-Becker-Oberschule, Güstrow
1989 – 92 43. Oberschule / 8. Grundschule, Berlin-Hellersdorf
1992 – 99 Leonard-Bernstein-Oberschule, Berlin
1999 Abitur

universitäre Ausbildung

2000 – 02 Humanmedizin, vorklinischer Abschnitt,
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
2002 – 06 Humanmedizin, klinischer Abschnitt,
Universität Rostock
2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Staatsexamen
Approbation als Arzt

berufliche Tätigkeit

seit 2007 Assistenzarzt, Klinik und Poliklinik für HNO-
Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie „Otto Körner“,
Universität Rostock

7.3 Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die fachliche Beratung möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. B. Kramp, leitender Oberarzt und stellvertretender Direktor der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie „Otto Körner“ der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock herzlich bedanken.

Herrn Dr. Jürgen Ostwald kommt ein spezieller Dank für die fachliche und auch moralische Unterstützung sowie die Bereitstellung des Laborplatzes samt technischer Ausrüstung zu.

Herrn Dr. Dirk Koczan möchte ich besonders für die freundliche und geduldige Beratung in fachspezifischen Fragen danken. Mein Dank gilt zudem Frau Ildiko Todt für die nette Zusammenarbeit im Labor.

Weiterer Dank gebührt Frau Dr. Gisela Sparmann und Frau Dr. Helga Krentz für die nützlichen Tipps sowie Schwester Dagmar für das gut sortierte Tumorarchiv.

Ebenso danke ich meinen Brüdern Andreas, Christian und Excel-Genie Gunnar Müller, meinen Freunden und ehemaligen Kommilitonen, die mich auf diesem Weg begleitet haben.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern für die umfassende Unterstützung und Motivation bedanken.

Diese Arbeit möchte ich meinem Großvater Hans-Joachim Breese widmen, der mir sowohl menschlich als auch intellektuell stets Vorbild war.

7.4 Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den darin aufgeführten Hilfsmitteln angefertigt habe. Wörtlich oder inhaltlich aus anderen Werken entnommene Passagen sind unter Angaben der Quellen kenntlich gemacht.

Außerdem bestätige ich, dass eine Antragsstellung auf Eröffnung des Promotionsverfahrens ausschließlich an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock erfolgte.

Rostock, den

Arne Böttcher

8. Thesen

1. Die häufigste Manifestationsart von bösartigen Kopf-Hals-Tumoren ist mit 35,0 % das Larynxplattenepithelkarzinom. Hierbei liegt eine Prädilektion des männlichen Geschlechts von ca. 5 : 1 vor. Das mittlere Manifestationsalter eines Kopf-Hals-Karzinoms liegt bei 55,9 Jahren.
2. In Abhängigkeit von Manifestationsart und Ausdehnung werden Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs mit einem Anteil von 43,4 % am häufigsten mittels Operation und anschließender adjuvanter Radiochemotherapie behandelt.
3. Zweitkarzinome sind eine seltene Tumormanifestation bei Kopf-Hals-Karzinomen. Bei den 103 untersuchten Tumorpatienten konnte kein Zweitkarzinom im Sinne der klassischen Feldkanzerisierung diagnostiziert werden.
4. Rezidivfreie, therapierte Kopf-Hals-Karzinompatienten haben einen hochsignifikant erhöhten mittleren Anteil von NK-Zellen ($25,93 \pm 11,68$ %, $p < 0,001$) an PBMC im Vergleich zu gesunden, tumorfreien Probanden ($15,41 \pm 6,87$ %) bzw. unbehandelten Patienten mit neu diagnostiziertem Kopf-Hals-Karzinom ($15,47 \pm 7,31$ %).
5. Der erhöhte Anteil der NK-Zellen an PBMC korreliert signifikant gering mit dem Alter der Patienten ($r = 0,216$, $p < 0,05$) und liegt mit einem Maximum in der 7. Lebensdekade von $26,18 \pm 12,45$ % gesamtdurchschnittlich bei $21,96 \pm 11,35$ %.
6. Es liegt keine Korrelation zwischen NK-Zellanteil an PBMC und rezidivfreier Zeit nach abgeschlossener Therapie bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinom vor ($r = -0,060$, $p > 0,05$).
7. Der erhöhte Anteil von NK-Zellen an PBMC therapierter, rezidivfreier Patienten geht u. a. mit einer Überexpression von für Chemotaxis verantwortlichen Genprodukten wie Chemokinrezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren, NK-Zellrezeptoren und Zytokinen in NK-Zellen einher.

8. In NK-Zellen von Tumorpatienten, die sich bislang keiner Therapie unterzogen haben, sind hochregulierte Gene identifiziert worden, deren Genproduktfunktionen als Immunantwort auf die manifeste Krebserkrankung interpretiert werden können. Hierzu gehören u. a. Interleukin- und Chemokinrezeptoren sowie Apoptoseinduktoren und –effektoren.

9. Gesunde, tumorfreie Patienten besitzen ein differenzielles Expressionsmuster in NK-Zellen im Vergleich zu Tumorpatienten. Zur ADCC und Phagozytose befähigte Rezeptoren sowie weitere zur Immunantwort zu attribuierende Gene sind bei Tumorpatienten relativ unterexprimiert, was eine mögliche Ursache für die Tumormanifestation im Sinne einer gestörten „immunological surveillance“ darstellt.

10. Vor dem Hintergrund im Rahmen der „immunological surveillance“ maligne transformierte Targetzellen eliminieren zu können, stellen NK-Zellen einen zentralen Ansatzpunkt für zukünftige immunologische Tumortherapiestrategien dar. Die in dieser Arbeit unter funktionellen Aspekten detektierten Gene bilden eine Kandidatenübersicht, die als Grundlage für die Erforschung neuer Immuntherapieansätze von Krebserkrankungen fungiert.