

Identifikation einer endogenen Typ I Interferon-assoziierten zytotoxischen
Entzündung im Plattenepithelkarzinom der Haut:
Eine prospektive histologische und immunhistologische Analyse
an 60 Fällen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Anja Stephanie Vahsen

aus Bonn

2011

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. J. Wenzel
2. Gutachter: Prof. Dr. med. H. P. Fischer

Tag der Mündlichen Prüfung: 17.05.2011

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. ès sci. T. Bieber

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	5
1.1.	Charakteristika des Plattenepithelkarzinoms.....	6
1.2.	Spontane Regression bei aktinischer Keratose und initialem Plattenepithelkarzinom.....	13
1.3.	Bedeutung von Entzündung in der Tumorentstehung.....	14
1.4.	Cancer Immunosurveillance und Immunoediting.....	15
1.5.	Rolle des Typ I Interferon-Systems bei verschiedenen Erkrankungen der Haut.....	17
2.	Arbeitshypothese.....	18
3.	Material & Methoden.....	19
3.1.	Gewebeproben.....	19
3.2.	Histologie.....	19
3.3.	Immunhistologie.....	19
3.4.	Statistische Analyse.....	23
4.	Ergebnisse.....	25
4.1.	Peritumorale Entzündung.....	25
4.2.	T-Lymphozyten als wesentliche Zellen im inflammatorischen Infiltrat.....	26
4.3.	Hohe Anzahl zytotoxischer Zellen.....	29
4.4.	Erhöhte Expression von Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO).....	33
4.5.	Hohe Expression von MxA.....	35
4.6.	Erhöhte Expression Interferon-induzierter Chemokine.....	37
4.7.	Hohe Anzahl CXCR3+ Lymphozyten.....	41
5.	Diskussion.....	48
5.1.	Rolle des Immunsystems beim Plattenepithelkarzinom der Haut.....	49
5.2.	Peritumorale Entzündung im Plattenepithelkarzinom der Haut.....	50
5.3.	T-Lymphozyten als Effektorzellen.....	51
5.4.	Hinweis auf eine zytotoxische Immunantwort.....	52
5.5.	MxA als Hinweis auf eine Typ I Interferon-induzierte zytotoxische Immunantwort.....	54

5.6. Interferon-Induktion der Chemokine CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 und CXCL11/I-TAC	55
5.7. Interferon-Rekrutierung von CXCR3+ Lymphozyten	56
5.8. Rolle von Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)	58
6. Zusammenfassung	59
7. Abbildungsverzeichnis	60
8. Tabellenverzeichnis	62
9. Quellen- und Literaturverzeichnis	63
10. Danksagung	67

1. Einleitung

„Neue epidemiologische Untersuchungen weisen darauf hin, dass das Auftreten von Hauttumoren weiter zunimmt. Dies trifft sowohl auf das maligne Melanom als auch und in noch bedeutenderem Ausmaß auf die nichtmelanozytären Tumoren – das Basalzellkarzinom (Basaliom) und das Plattenepithelkarzinom (Spinaliom) – zu.“ (Lautenschlager und Itin, 2005)

Beim Hautkrebs wird – wie bereits angedeutet – zwischen „schwarzem“ (engl. „melanoma skin cancer“) und „weißem“ (engl. „nonmelanoma skin cancer“) Hautkrebs unterschieden, wobei sich diese Einteilung nach den Ursprungszellen der Entartung richtet. So zählt das Melanom der Haut, welches durch Entartung von Melanozyten entsteht, zum „schwarzen“ Hautkrebs, während das Spinaliom und das Basaliom der Haut unter dem Begriff „weißer“ Hautkrebs subsumiert werden können, da beide von entarteten Keratinozyten bzw. von deren Stammzellen, den Basalzellen, ausgehen (s. Abb. 1).

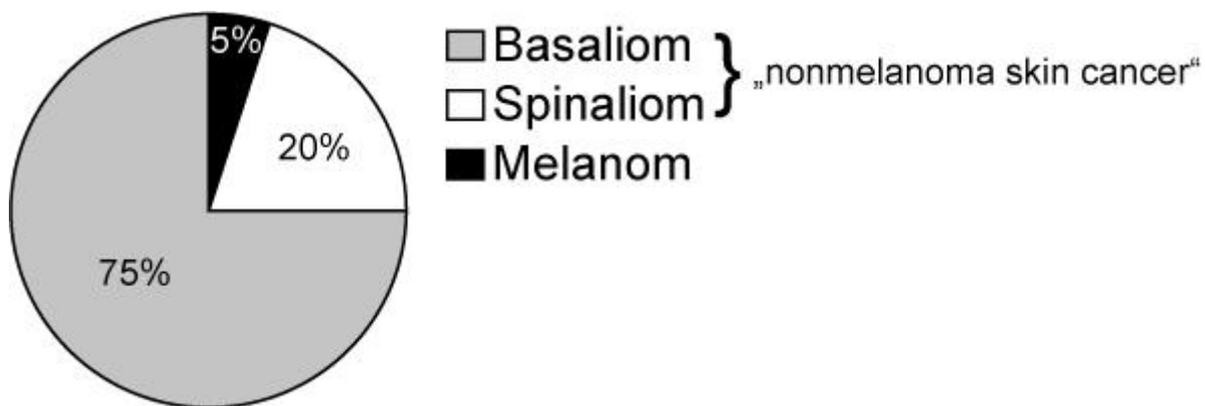


Abb. 1: Inzidenzen der drei häufigsten Hautkrebsarten

1.1. Charakteristika des Plattenepithelkarzinoms

Das Plattenepithelkarzinom ist der zweithäufigste maligne Tumor der Haut (Synonym: Spinaliom, engl. „squamous cell carcinoma“). Seine Inzidenz ist mit 25-30 Neuerkrankungen je 100.000 Einwohner pro Jahr in Europa hoch, liegt jedoch in einigen Teilen der Welt noch höher („geographische Inzidenz“). (Braun-Falco, 1997) So erkranken beispielsweise in Australien mehr als 60 Personen je 100.000 Einwohner pro Jahr, was einerseits auf die erhöhte UVB-Exposition, andererseits auf das gehäufte Vorkommen der Hauttypen 1 + 2 zurückgeführt werden kann. Weitere prädisponierende Faktoren für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen sind in Tabelle 1 zu finden.

Physikalisch	Chemisch	Immunsuppression	Genodermatosen	Individuelle Prädisposition
UVB-Licht (kumulativ), UVA als Kokarzinogen	Arsen	Organtransplantierte	Epidermodysplasia verruciformis	Lichttyp 1 + 2
PUVA- Bestrahlung	Teer	Zytostatika	Xeroderma pigmentosum	Chronische Wunden, Fisteln, Ulzera
Ionisierende Strahlung	Polyzyklische Aromaten	AIDS	Albinismus	Langbestehende Narben
Mäßige Hitzeexposition		Lymphoproliferative Erkrankungen		Chronische Dermatosen (z.B. Lupus erythematodes, Lupus vulgaris, Lichen ruber, u.a.)

Tab. 1: Prädisponierende Faktoren für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen

Klinisch manifestiert sich das Plattenepithelkarzinom als schmerzloser, häufig ulzerierter oder erodierter Knoten mit aufgeworfenem Rand und derb palpabler Tumorbasis, der sich durch langsames Wachstum über Monate bis Jahre auszeichnet (s. Abb. 2). Die Umgebung ist meist gerötet, was auf eine peritumorale Entzündungsreaktion hinweist. Im Falle einer lymphogenen Metastasierung ist der Palpationsbefund oft sehr typisch – die betroffenen Lymphknoten imponieren als derbe, untereinander und mit der Haut verbackene Knoten und Pakete. Die Fünf-Jahres-Überlebenszeit bei lymphogener Metastasierung liegt nur bei etwa 26 %, allerdings können früh diagnostizierte und gut differenzierte Tumore mittels Exzision geheilt werden und haben somit eine sehr gute Prognose.



Abb. 2: Klinik des Plattenepithelkarzinoms als neoplastische, ulzerierte Knoten in typischer Lokalisation (links: Nase, weiblich, 94 J.; rechts: Ohr, männlich, 55 J.; DermIS Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg)

Histologisch ist das Plattenepithelkarzinom durch von der Epidermis ausgehende eosinophile Tumorzellproliferate charakterisiert, die fingerförmig oder in breiten Verbänden die Basalmembran durchbrechend in die Tiefe reichen. Dabei sind die Zellgrenzen und Interzellularbrücken der Tumorzellen aufgebaut, wie es für Zellen des Stratum spinosum üblich ist. Dieser Tatsache verdankt das Spinaliom seinen Namen. In

der Tiefe finden sich unterschiedlich große Tumorzellinseln mit scharfer Randbegrenzung. Des Weiteren sind – häufig im Zentrum des Tumors gelegene – Hornperlen (engl. „squamous eddies“), die sich mikroskopisch als konzentrisch geschichtete Hornkugeln darstellen, charakteristisch. Außerdem ist in fast allen Fällen eine starke Stromareaktion um die proliferierenden Tumorstränge mit Anreicherung von Lymphozyten und Plasmazellen nachzuweisen (s. Abb. 3). (Braun-Falco, 1997)

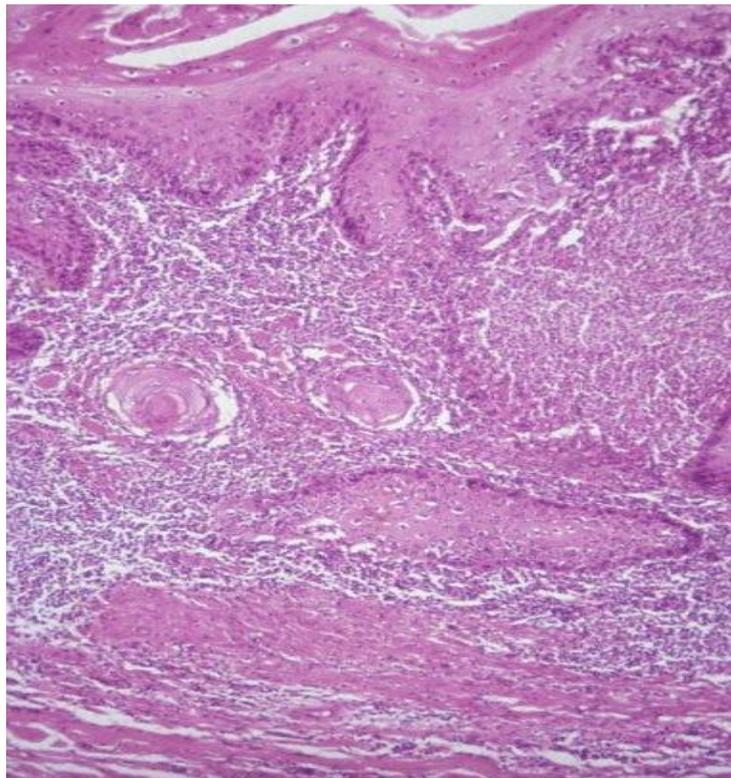


Abb. 3: Histologie des Plattenepithelkarzinoms mit ungeordnetem Aufbau und proliferierenden epithelialen Zellen im Korium sowie starker Stromareaktion

Die Einteilung der Plattenepithelkarzinome kann anhand verschiedener Merkmale vorgenommen werden, allerdings hat sich nach neueren Untersuchungen gezeigt, dass das TNM-System, welches sich nur auf die klinische Ausdehnung des Plattenepithelkarzinoms bezieht, und die Einteilung nach Broders (s. Tab. 2), die ausschließlich den Entdifferenzierungsgrad der Tumorzellen beschreibt, für eine Risikobewertung nicht ausreichend sind.

G1	Gut differenziert	Broders Grad 1	<25 % entdifferenzierte Tumorzellen
G2	Mäßig differenziert	Broders Grad 2	<50 % entdifferenzierte Tumorzellen
G3	Schlecht differenziert	Broders Grad 3	<75 % entdifferenzierte Tumorzellen
G4	Undifferenziert	Broders Grad 4	>75 % entdifferenzierte Tumorzellen

Tab. 2: Grading der Plattenepithelkarzinome nach Broders

Prognostisch aussagekräftigere Kriterien sind neben den klinischen Eigenschaften des einzelnen Plattenepithelkarzinoms vor allem dessen spezifische histologische Charakteristika (s. Tab. 3).

- Gesamttumordicke (GTD) nach Breslow mehr als 4 mm
- Eindringtiefe ab Clark-Level 4-5 (s. Tab. 6)
- Entdifferenzierungsgrad ab Broders Grad 4 (s. Tab. 4)
- Hoher Mitoseindex
- Tumortyp (insbesondere spindelzelliger und akantholytischer Zelltyp)
- Perineurale Invasion
- Ulzerationen

Tab. 3: Prognostisch ungünstige histologische Kriterien bei Plattenepithelkarzinomen

Dabei spielen insbesondere die Gesamttumordicke (GTD) nach Breslow, die durch Ausmessen der größten Tumordicke vom Stratum granulosum bis zur untersten Tumorzelllage festgelegt wird, sowie die Einteilung nach Clark (s. Tab. 4) bezüglich der Eindringtiefe des Plattenepithelkarzinoms eine wichtige Rolle. Diese beiden histologischen Kriterien korrelieren gut mit der klinischen Prognose. (Kerl, 2003)

Clark-Level 1	In-situ-Karzinom
Clark-Level 2	Tumorzellen reichen bis in das Stratum papillare
Clark-Level 3	Tumorzellen reichen bis in die Grenzzone des Stratum papillare + Stratum reticulare
Clark-Level 4	Invasion der Tumorzellen in das Stratum reticulare
Clark-Level 5	Invasion der Tumorzellen bis in die Subkutis

Tab. 4: Klassifikation der Plattenepithelkarzinome bezüglich ihrer Eindringtiefe (Clark-Level)

Prädilektionsstellen für die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms sind allgemein alle stark lichtexponierten Hautareale wie Gesicht – hier treten 90 % aller Plattenepithelkarzinome auf – unbehaarte Kopfhaut (Alopezie) und Handrücken (s. Abb. 4). (McKee et al., 2005)

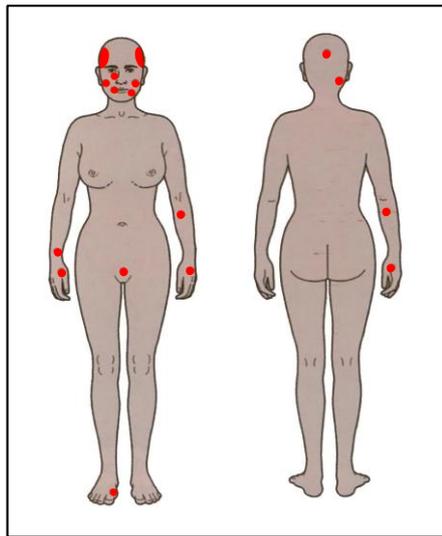


Abb. 4: Prädilektionsstellen für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen sind die sogenannten natürlichen Lichtterrassen

Die Wahrscheinlichkeit, an einem Plattenepithelkarzinom zu erkranken, steigt linear mit dem Lebensalter, das Durchschnittsalter liegt bei etwa 70 Jahren. Dabei sind Männer im Allgemeinen etwa doppelt so häufig betroffen wie Frauen. Als obligate Präkanzerose des Plattenepithelkarzinoms ist die aktinische Keratose (s. Abb. 6) anzusehen, auf deren Grundlage die meisten der Plattenepithelkarzinome entstehen. (Kerl, 2003) Ursprungszellen der malignen Entartung sind, wie bereits erwähnt, die Stammzellen der Keratinozyten der Haut, in denen in 60-75 % der Fälle Alterationen des Tumorsuppressorgens p53 und in 40-50 % der Fälle ras-Gen-Mutationen nachgewiesen werden konnten, die wahrscheinlich auf UV-induzierte spezifische Punktmutationen zurückzuführen sind. (Kerl, 2003; Pacifico und Leone, 2007) Es ist von einer Multistrittkarzinogenese beim Plattenepithelkarzinom der Haut auszugehen. In Abbildung 5 wird diese Entwicklung von der aktinischen Keratose (Carcinoma in situ) zu einem invasiven Plattenepithelkarzinom der Haut verdeutlicht.

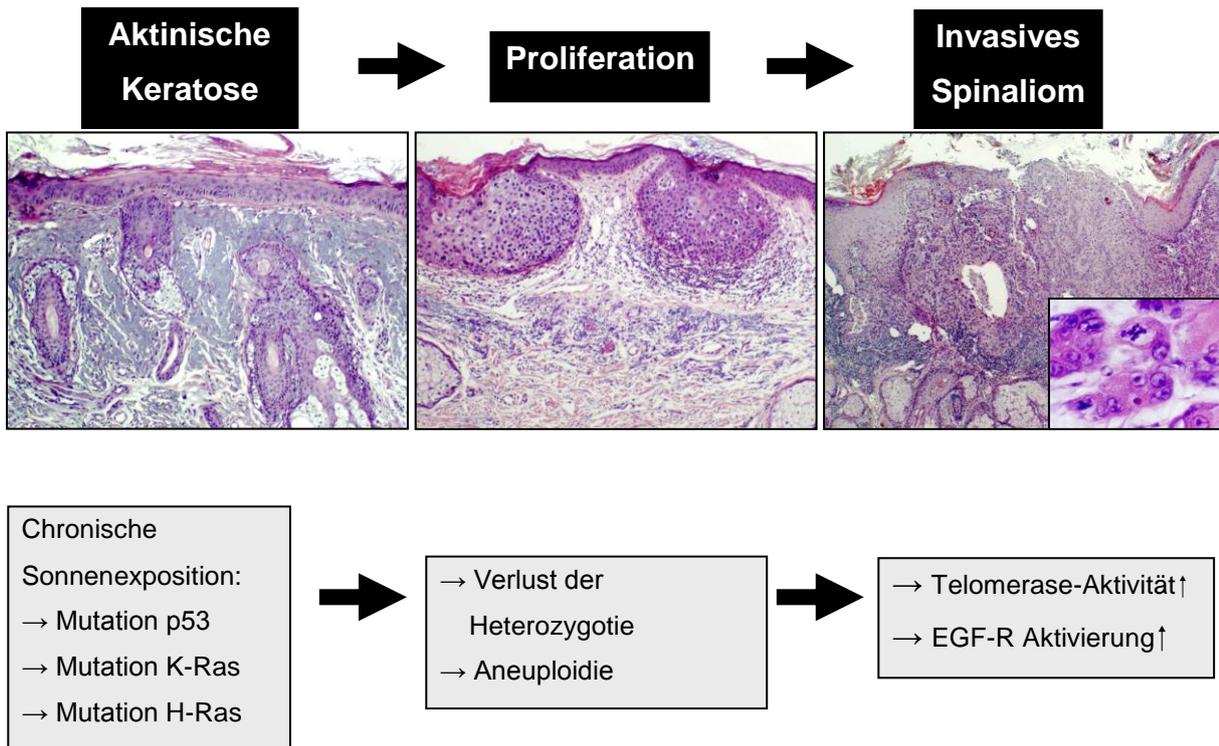


Abb. 5: Multistrittkarzinogenese des Plattenepithelkarzinoms

Das Metastasierungsrisiko ist mit 6 % relativ gering, kann allerdings bei ungünstiger Tumorlokalisation und anderen prognostisch ungünstigen klinischen Kriterien bis zu 30 % betragen (s. Tab. 5). Dabei erfolgt die Metastasierung in 85 % der Fälle lymphogen in die regionären Lymphknoten, nur selten sind Fernmetastasen in Lunge und Leber zu finden. Diese treten ausschließlich im Rahmen weit fortgeschrittener Plattenepithelkarzinome auf. Allgemein kann festgehalten werden, dass das Metastasierungsrisiko mit der Tumorgröße korreliert.

- Tumordurchmesser mehr als 2 cm
- Rezidivierende Plattenepithelkarzinome
- Ulzerationen
- Schnelles Wachstum
- Lokalisation: Ohr, Lippe, Skrotum, Anus
- Ätiologie: Chronische Narben, chronisch-fistulierende Entzündungen, chronische Dermatosen
- Immunsuppression

Tab. 5: Prognostisch ungünstige klinische Kriterien bei Plattenepithelkarzinomen

Immunhistologischer Marker des Plattenepithelkarzinoms sind Zytokeratine. Durch die Bestimmung des Zytokeratin-Molekulargewichtes kann zusätzlich die Differenzierung des Tumors festgestellt werden. So exprimieren hochdifferenzierte Plattenepithelkarzinome Zytokeratine mittleren bis hohen Molekulargewichts, schlecht beziehungsweise undifferenzierte Plattenepithelkarzinome Zytokeratine niederen Molekulargewichts.

Die Therapie des Plattenepithelkarzinoms der Haut richtet sich nach Lokalisation, Größe und Ausbreitung des Tumors. Therapeutisches Ziel sollte immer die vollständige chirurgische Entfernung mit topographisch zugeordneter histopathologischer Kontrolle der Schnittränder sein, allerdings kann bei lokaler oder allgemeiner Inoperabilität, großer Tumorausdehnung oder Operationsverweigerung des Patienten auch die Strahlentherapie vergleichbare Ergebnisse erzielen. (Kunte und Konz, 2007) Eine Besonderheit stellt die Option einer konservativen Therapie von aktinischen Keratosen dar. Diese werden idealerweise frühzeitig behandelt, um eine Entartung zum Plattenepithelkarzinom zu verhindern. Neben anderen Therapieoptionen (Kürettage, Kryotherapie, topische Applikation von 5-Fluorouracil, Solaraze Gel) kommt Aldara® 5 % Creme (Wirkstoff Imiquimod) zum Einsatz. (s. auch Kapitel 5.3.).

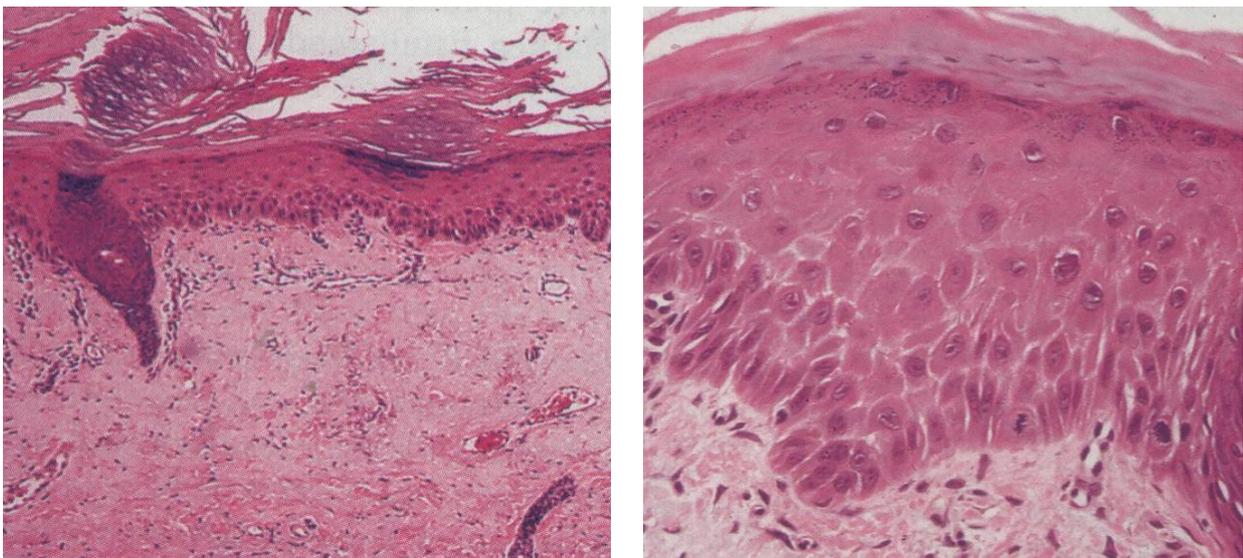


Abb. 6: Histologie der aktinischen Keratose mit wechselnder Orthohyper- und Hyperparakeratose (links) sowie aufgehobener Histoarchitektur der Epidermis (rechts)

1.2. Spontane Regression bei aktinischer Keratose und initialem Plattenepithelkarzinom

Bereits seit langem ist bekannt, dass aktinische Keratosen, die, wie bereits erwähnt, eine obligate Präkanzerose des Plattenepithelkarzinoms darstellen, sich spontan zurückentwickeln können. (Sanderson und MacKie, 1979) Die Häufigkeit dieses Phänomens wurde jedoch erst später beschrieben: So zeigte eine 12-monatige Beobachtung von 1.040 australischen Patienten, von denen 616 an einer aktinischen Keratose erkrankt waren, dass es in 224 Fällen zu einem spontanen Verschwinden gekommen war. Das entspricht einer Quote von 36,4 %. (Marks et al., 1986) Die Tatsachen, dass histologisch in beinahe jeder aktinischen Keratose Lymphozyten und Plasmazellen nachgewiesen werden können (Pinkus et al., 1963) und dass das Risiko einer Entartung zum Plattenepithelkarzinom nach Nierentransplantation unter iatrogenen Immunsuppression erhöht ist (Alam und Ratner, 2001; Ulrich et al., 2003) deuten darauf hin, dass hier eine Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem Tumor eine Rolle spielen könnte.

1.3. Bedeutung von Entzündung in der Tumorentstehung

Entzündung kann unterschiedliche Effekte auf die Entwicklung von Tumoren haben. So konnte einerseits nachgewiesen werden, dass akute Entzündungen dem Tumorstadium entgegenwirken können, andererseits, dass chronische Entzündungen ein Risiko zur Tumorentstehung darstellen und den Progress bereits existierender Tumoren unterstützen können. Hierbei spielt die sogenannte NFkappaB-Kaskade eine wichtige Rolle: Der Tumornekrosefaktor (TNF), ein proinflammatorisches Zytokin, kann, wenn er an seinen Rezeptor TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) bindet, je nach biochemischer Modifikation, NFkappaB aktivieren und dadurch pro-onkogen wirken, oder – modifiziert – Caspasen rekrutieren und somit eine anti-onkogene Apoptose entarteter Zellen einleiten. Ein weiteres Beispiel für entgegengesetzte Effekte des Immunsystems auf das Tumorstadium stellt die Wirkung von IL6 und Interferonen dar. IL6 kann Apoptose verhindern und dadurch den Tumorstadium verstärken. Andererseits können Interferone durch Unterstützung der DNA-Reparation das Tumorsuppressorgen p53 stabilisieren und somit anti-onkogen wirken. (Philip et al., 2004) Auch scheint das komplexe System des tumorumgebenden Mikromilieus eine entscheidende Rolle zu spielen, in dem Immunzellen entweder Tumorzellen attackieren, ihre Gegenwart ignorieren oder sogar deren Entwicklung und Überleben erleichtern. Welche Art von Immunzellen welche Effekte zeigt und welche Charakteristika des Tumors diese beeinflusst, konnte bisher noch nicht genauer geklärt werden. (Bui und Schreiber, 2007) Allerdings wurde nachgewiesen, dass maligne Zellen besonders gut in einem hochspezialisierten Milieu gedeihen, welches sowohl aus Bindegewebszellen als auch aus Blutgefäßen und diversen Leukozyten-Populationen besteht. So sezernieren die intratumoralen Immunzellen – ebenso wie die Tumorzellen selbst – eine Reihe von Zytokinen und Chemokinen, welche die lokale Angiogenese antreiben und dadurch das Tumorstadium fördern können. Hierfür mögliche Gegenspieler sind Zytokine wie IFN γ , IL2 und IL12, die die Aktivität zytotoxischer T-Zellen steigern und gleichzeitig die Angiogenese blockieren können. (Nelson und Ganss, 2006) Von Nelson und Ganss konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Tumorstadium assoziiert ist mit unzureichender peri- und intratumoraler Angiogenese, Infiltration zytotoxischer Effektorzellen, sowie der Produktion proinflammatorischer Zytokine und angiostatischer Chemokine wie CXCL9/MIG und CXCL10/IP-10. (Nelson und Ganss, 2006)

1.4. Cancer Immunosurveillance und Immunoediting

Die Hypothese, dass das Immunsystem in der Lage ist, entartete Zellen zu erkennen und zu eliminieren, existiert bereits sehr lange. (Burnet, 1957) Dunn et al. benennen diese Fähigkeit des Immunsystems, transformierte Zellen zu erkennen und zu bekämpfen, Cancer Immunosurveillance. Tumore, die trotz dieses Angriffs weiter wachsen, müssen sich anpassen – dieser Prozess wird Immunoediting genannt. (Dunn et al., 2006) Insgesamt werden im Verlauf des Cancer Immunoeditings drei Phasen unterschieden: Elimination (protecting) – früher Cancer Immunosurveillance genannt – Equilibrium (persistence) und Escape (progression). Die erste Phase besteht dabei aus dem Erkennen der entarteten Zellen durch das angeborene und das erworbene Immunsystem (CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten, Antikörper-produzierende B-Lymphozyten) und der Zerstörung dieser, welche zusätzlich durch Chemokine und Zytokine erleichtert wird. Falls nach der ersten Phase noch einige Tumorzellen leben, kommt es zur zweiten Phase, in der der Tumor zwar weiterhin besteht, aber vom Immunsystem daran gehindert wird, sich auszudehnen. Sobald dieses Gleichgewicht in Richtung Tumorstadium umschwenkt – sei es durch Erschöpfung des Immunsystems, Immunsuppression oder die Entstehung von Tumorzell-Varianten –, beginnt die dritte Phase, in der es dem Tumor gelingt, dem Immunsystem zu entkommen (s. Abb. 7, modifiziert nach Dunn et al.).

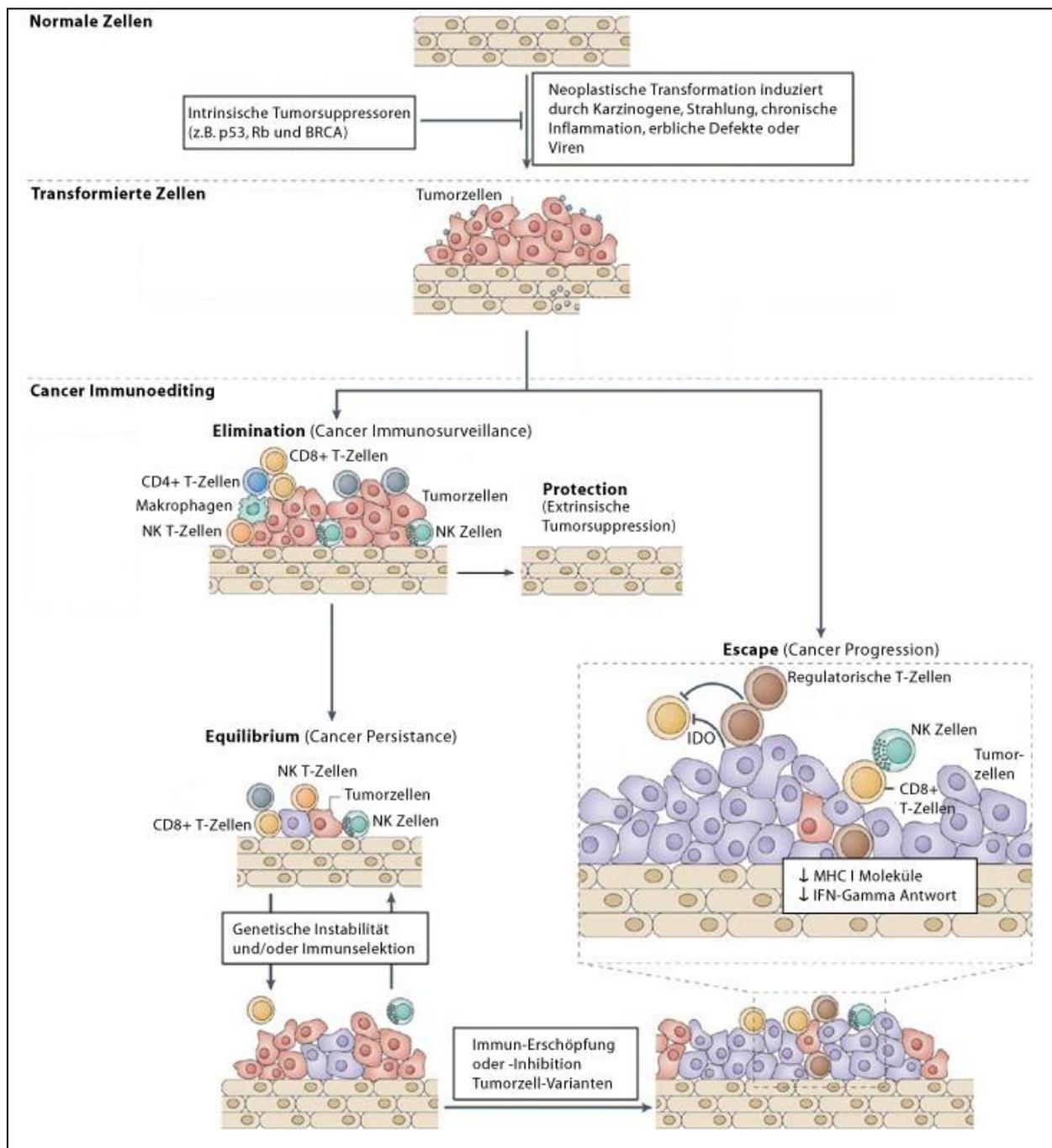


Abb. 7: Konzept der „Cancer Immunosurveillance“ und des „Immunoeditings“: Aus den unterschiedlichsten Gründen können aus normalen Zellen durch neoplastische Transformation Tumorzellen entstehen. Werden diese vom Immunsystem erkannt, kann es zur Eliminierung (Cancer Immunosurveillance) oder aber – unter anderem durch gegenregulatorischen Mechanismen des Tumors (Immunoediting) – zum Tumorprogress kommen.

1.5. Rolle des Typ I Interferon-Systems bei verschiedenen Erkrankungen der Haut

Das Immunsystem spielt, neben den gegensätzlichen Effekten, die es in Bezug auf Tumorentstehung und -progress zeigt, bei den unterschiedlichsten Hauterkrankungen eine große Rolle. Dabei ist das Typ I Interferon-System im Speziellen physiologischerweise bei Tumoren und in der Virusabwehr (z.B. Herpes Simplex-Infektionen) zu finden, auf der anderen Seite kann es Entzündungen im Rahmen von Autoimmunerkrankungen bedingen und unterhalten.

So sind beispielsweise antimelanozytäre autoreaktive T-Lymphozyten der Auslöser für die Autoimmunerkrankung Vitiligo, mit der Folge einer Depigmentierung der Haut im Bereich der Entzündung. (Steitz et al., 2005) Die sogenannten Halo-Naevi, welche benigne melanozytäre Naevi der Haut darstellen, können, ebenso wie aktinische Keratosen und initiale Plattenepithelkarzinome, spontan in Regression gehen. (Saleh et al., 2003) Für maligne Melanome konnte nachgewiesen werden, dass eine Typ I Interferon-assoziierte Rekrutierung zytotoxischer T-Lymphozyten zur Tumorregression führen kann. Insbesondere spielen hier eine hohe Expression des antiviralen Proteins MxA, welches spezifisch durch Typ I Interferon induziert wird, das Chemokin CXCL10/IP-10, der Chemokin-Rezeptor CXCR3 und das zytotoxische Molekül Granzym B eine wichtige Rolle. Als Produzent von Typ I Interferon konnten plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) nachgewiesen werden, welche in hoher Zahl in entzündlich-regressiven Melanomen gefunden wurden. (Wenzel et al., 2005) Beim Krankheitsbild des Lupus erythematodes dagegen handelt es sich um autoimmun bedingte keratinozytäre Hautläsionen, ausgelöst durch eine Typ I Interferon-assoziierte Rekrutierung von CXCR3+ und GranzymB+ Lymphozyten.

Ob gezeigt werden kann, dass für das Plattenepithelkarzinom der Haut ein ähnlicher immunologischer Mechanismus als Ursache für eine spontane Regression vorliegt, ist unter anderem Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

2. Arbeitshypothese

Es ist gut belegt, dass epitheliale Tumore der Haut, insbesondere aktinische Keratosen und initiale Plattenepithelkarzinome, sich spontan, das heißt ohne Therapie, zurückbilden können. Da eine deutlich erhöhte Inzidenz von weißem Hautkrebs bei Patienten unter iatrogener Immunsuppression zu finden ist, (Alam und Ratner, 2001; Ulrich et al., 2003) scheint das Immunsystem bei der Tumorkontrolle eine wichtige Rolle zu spielen.

Allerdings war bisher nicht bekannt, welche konkreten Mechanismen in der Haut bei der Tumorkontrolle von Bedeutung sind. Vorarbeiten bei melanozytären Läsionen, die in Regression gehen (Halo Nävi, regressive Melanome), bieten Anhalt für eine Rolle einer Typ I Interferon-assoziierten zytotoxischen Immunantwort. (Saleh et al., 2003; Wenzel et al., 2005) Am Beispiel des kutanen Lupus erythematoses konnte nachgewiesen werden, dass entsprechende Mechanismen auch beim Untergang epithelialer Läsionen eine Rolle spielen. (Wenzel et al., 2005)

Auf Grund dieser Hinweise ergab sich die Arbeitshypothese der vorliegenden Dissertation, dass Interferon-assoziierte, regressiv-entzündliche Mechanismen ebenfalls in der Tumorkontrolle beim Plattenepithelkarzinom der Haut beteiligt sein könnten.

3. Material & Methoden

Im folgenden Kapitel wird zunächst die Herkunft und Art des untersuchten Materials erläutert (3.1.), um im Anschluss daran sowohl die hier eingesetzten Methoden der Immunhistologie (3.2.) als auch die Grundlagen der statistischen Analyse darzustellen (3.3.).

3.1. Gewebeproben

Die verwendeten Gewebeproben der vorliegenden Studie stammen aus dem Archiv der Dermatologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn und wurden als Zufallsstichprobe aus den in den Jahren 2004 – 2006 entnommenen Stanzbiopsien von Plattenepithelkarzinomen ausgewählt. Dabei wurden 60 Plattenepithelkarzinome verwendet, von denen bereits für die Routine-Untersuchung Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Schnitte hergestellt worden waren. Als Kontrollgruppe wurden fünf nicht entzündete, das heißt gesunde, Hautbiopsien verwendet, die aus plastischen Operationen stammten. Die vorliegende Studie wurde in Übereinstimmung mit den geltenden ethischen Richtlinien der Deklaration des Weltärztebundes von Helsinki durchgeführt. (Weltärztebund 2004)

3.2. Histologie

Zunächst wurden die Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnitte der ausgewählten Plattenepithelkarzinome mikroskopiert. Durch eine semiquantitative Analyse der entzündlichen Infiltrate konnten diese 60 Plattenepithelkarzinome schließlich klassifiziert und in „nicht bis gering“ (+) und „mäßig bis stark“ (+++) entzündete Plattenepithelkarzinome eingeteilt werden. Nach dieser Klassifikation wurden sowohl die zehn Plattenepithelkarzinome, die am schwächsten, als auch die zehn Plattenepithelkarzinome, die am stärksten entzündet waren, ausgewählt. Mit diesen 20 Plattenepithelkarzinomen und den 5 gesunden Hautbiopsien der Kontrollgruppe wurde im Anschluss die immunhistologische Charakterisierung durchgeführt.

3.3. Immunhistologie

Der Zweck immunhistologischer Färbetechniken besteht darin, Gewebe- bzw. Zellantigene zu visualisieren. In der vorliegenden Arbeit wurde die indirekte immunhistologische Methode, genauer die Labeled Strept Avidin-Biotin-Methode (LSAB-

Methode), verwendet. Das bedeutet, dass zunächst ein spezifischer, aber unkonjugierter Primär-Antikörper an das Antigen der Probe bindet und anschließend ein zweiter, enzymgekoppelter Antikörper, der gegen das Fc-Fragment des Primär-Antikörpers gerichtet ist, aufgetragen wird. Im dritten Schritt folgt dann die Substrat-Chromogenreaktion (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000) Das in diesem Fall eingesetzte LSAB 2™-System von DakoCytomation™ beinhaltet als Sekundär-Antikörper einen biotinylierten Brückenantikörper, welcher Streptavidin-Enzymkonjugate trägt. Bei dem Enzym handelt es sich um die alkalische Phosphatase, als Chromogen wird Fast Red verwendet (s. Abb. 8).

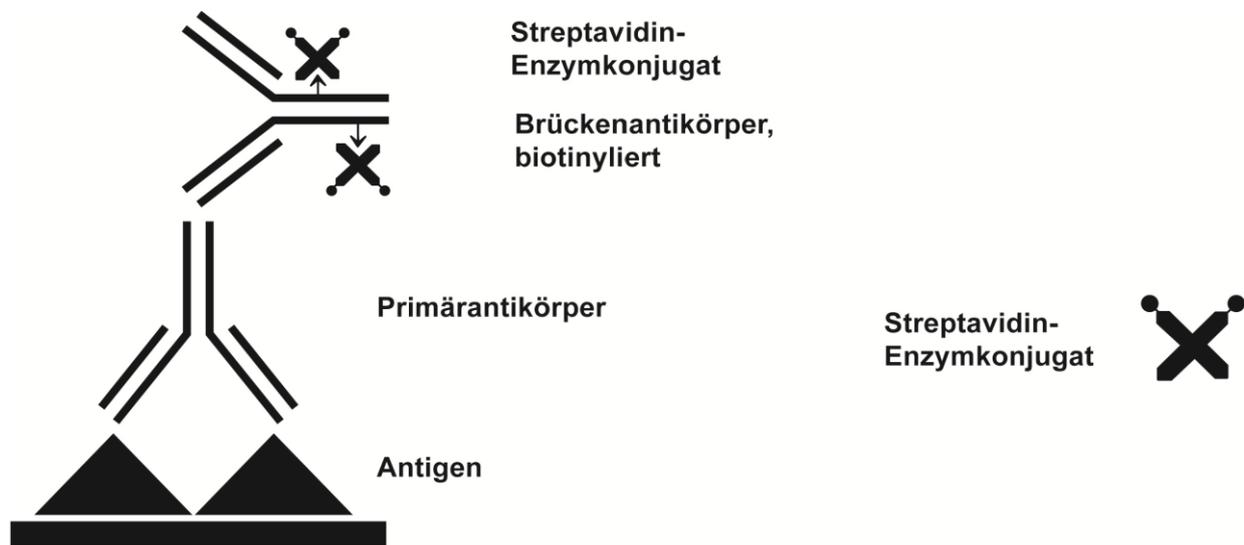


Abb. 8: Schema der LSAB-Methode mit Darstellung von Primärantikörper, biotinyliertem Brückenantikörper und Streptavidin-Enzym-Komplex

Die 25 ausgewählten, Formalin-fixierten und in Paraffin gebetteten Stanzbiopsien wurden von der Verfasserin dieser Arbeit mit dem Mikrotom (Leica RM 2155™) in jeweils 15 Serienschnitte à 4 µm geschnitten, über Nacht im Inkubator (Mettler™) bei 37° Celsius getrocknet, am folgenden Tag im Medite TST 50™ automatisch entparaffinisiert, je nach Antikörper entsprechend vorbehandelt und schließlich im Dako™ Autostainer mit Hilfe des bereits erwähnten LSAB 2™-Systems und Fast Red als Chromogen immunhistologisch gefärbt. Danach wurde für eine Minute mit Hämalun von Hand gegengefärbt und die Schnitte mit Deckgläschen versehen. Da es für die Antikörper CXCL9/MIG und CXCL11/I-TAC noch keine Herstellerprotokolle für die

Anwendung bei Paraffinschnitten gab, wurden diese beiden Färbungen im Vorhinein durch Variation der Faktoren Vorbehandlung, Antikörperkonzentration und Einwirkdauer in mehreren Versuchen von der Verfasserin etabliert. Tabelle 6 liefert eine Übersicht über die verwendeten monoklonalen Antikörper.

Name	Klon	Typ	Hersteller	Vorbehandlung	Einwirkdauer
Monoclonal Antibody CD3	PS1	Mouse IgG 2a	Immunotech™	AK 9	60 Minuten
Mouse Monoclonal Antibody CD4	1F6	IgG 1	Novocastra™	AK 9	60 Minuten
Monoclonal Mouse Anti-Human T-Cell, CD8	C8/144B	IgG 1	DAKOPATTS™	AK 6	60 Minuten
Monoclonal Mouse Anti-Human B-Cell, L26 (CD20)	L26 (1)	IgG 2a, kappa	DAKO™	AK 6	30 Minuten
Monoclonal Mouse Anti-Human Macrophage, CD68	PG-M1	IgG 3, kappa	DAKO™	AK 6	30 Minuten
Purified Mouse Anti-Human Monoclonal Antibody CD183 (CXCR3)	1C6/CXCR3	Mouse IgG 1, kappa	BD Pharmingen™	Proteinase K + AK 9	60 Minuten
Monoclonal Antibody TIA-1-1	2G9 or 2G9A10F5 or TIA-1-1	Mouse IgG 1	Immunotech™	AK 6	60 Minuten
Monoclonal Mouse Anti-Human Granzyme B	GrB-7	IgG 2a, kappa	DakoCytomation™	AK 9	60 Minuten
Lyophilized Mouse Monoclonal Antibody CD56 (NCAM)	1B6	IgG 1	Novocastra™	AK 9	60 Minuten

Monoclonal Mouse Anti-Human CD57	TB01	IgM, kappa	DakoCytomation™	AK 9	30 Minuten
Mouse Monoclonal Anti-MxA (M143)	M143	IgG 2a + IgG 1 heavy chain	Spende von Prof. Haller, Freiburg	keine	60 Minuten
Monoclonal Anti-Human CXCL9/MIG Antibody	49106	Mouse IgG 1	R&D Systems™	AK 6	60 Minuten
Monoclonal Anti-Human CXCL10/IP-10 Antibody	33036	Mouse IgG 1	R&D Systems™	AK 6	60 Minuten
Monoclonal Anti-Human CXCL11/I-TAC Antibody	87328	Mouse IgG 2A	R&D Systems™	Proteinase K + AK 9	60 Minuten
Mouse Anti-Indoleamine 2, 3-Dioxygenase Monoclonal Antibody (IDO)	10.1	Mouse IgG 3	Chemicon international™	Proteinase K + AK 6	60 Minuten

Tab. 6: Immunhistologische Charakterisierung mit Daten zu den verwendeten monoklonalen Antikörpern und Hinweisen zur spezifischen Vorbehandlung: AK 6 bzw. AK 9 sind Detergenzien zur Hitzedemaskierung, die früher im Autoklaven vorgenommen wurde, mit einem pH-Wert von 6 bzw. 9. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Dampfgerar verwendet.

Diese 375 immunhistologisch gefärbten Serienschnitte wurden anschließend mikroskopiert. Dabei erfolgte die Auszählung der einzelnen Zellarten (Zellen/Gesichtsfeld in der Vergrößerung x200), sowie die semiquantitative Beurteilung von MxA, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 und CXCL11/I-TAC (0 = keine Expression; 1 = schwache Expression; 2 = mäßige Expression; 3 = starke Expression).

Von exemplarischen Schnitten aller drei Gruppen und jedem der 15 immunhistologischen Marker wurden Fotos mit dem 4er, 10er, 20er und 40er Objektiv mit Hilfe der Olympus dp 70™ Kamera angefertigt. Die Bedeutung der verwendeten monoklonalen Antikörper wird in Tabelle 7 dargestellt.

Marker	Nachweis	Bedeutung
CD3	T-Lymphozyten	Oberflächenmarker / Inflammation
CD4	T-Helferzellen	Oberflächenmarker / Inflammation
CD8	Zytotoxische T-Lymphozyten	Oberflächenmarker / Inflammation
CD20	B-Lymphozyten	Oberflächenmarker / Inflammation
CD68	Makrophagen	Oberflächenmarker / Inflammation
CXCR3	Chemokin-Rezeptor / IFN- Rekrutierung	Oberflächenmarker / Inflammation
TIA-1	Zytotoxische Zellen	Zytotoxischer Marker / Inflammation
Granzym B	Zytotoxische Zellen	Zytotoxischer Marker / Inflammation
CD56	Natürliche Killerzellen	Oberflächenmarker / Inflammation
CD57	T-Killerzellen	Oberflächenmarker / Inflammation
MxA	Antivirales Protein / Typ 1 Interferon	Interferon-Signatur
CXCL9/MIG	Interferon-induziertes Chemokin / Ligand von CXCR3	Interferon-Signatur
CXCL10/IP-10	Interferon-induziertes Chemokin / Ligand von CXCR3	Interferon-Signatur
CXCL11/I-TAC	Interferon-induziertes Chemokin / Ligand von CXCR3	Interferon-Signatur
IDO	Depression von T-Lymphozyten	Regulation / Antiinflammation

Tab. 7: Erläuterung der verwendeten immunhistochemischen Marker

3.4. Statistische Analyse

Die vorliegenden Daten beruhen auf dem Vergleich der zehn nicht bis gering entzündeten Plattenepithelkarzinome (+) mit den zehn mäßig bis stark entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+++), während die fünf Biopsien der gesunden Haut die Kontrollgruppe darstellen. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe von SPSS™ 13.0 für Windows (2004) (SPSS 2004). Anhand nicht-parametrischer Tests wurde die Expression der verschiedenen Marker ausgewertet. Dabei wurde der Mann-Whitney-U-Test eingesetzt, um das Ausmaß des entzündlichen Infiltrates, welches durch die immunhistologische Charakterisierung deutlich gemacht worden war, in den drei Gruppen zu vergleichen. Die Unterschiede $p < 0,05$ wurden als signifikant (*) und $p < 0,01$ als hoch signifikant (**) gewertet. Da ausschließlich gerichtete Hypothesen getestet wurden, erfolgte die Signifikanzüberprüfung einseitig. (Bortz, 1999) Des Weiteren wurden zur Überprüfung von Zusammenhangshypothesen Korrelationen nach Spearman berechnet.

4. Ergebnisse

Das folgende Kapitel erläutert zunächst die Aufteilung der initialen Plattenepithelkarzinome in zwei Gruppen durch eine semiquantitative Analyse der Begleitinfiltrate (4.1.). Danach werden die Ergebnisse der genaueren Charakterisierung der Zellen, die die peritumoralen Infiltrate ausmachten, beschrieben. Dabei werden erst die immunhistologischen Färbungen beschrieben, die die Art der Zellen bestimmten (4.2., 4.3.), um dann im Weiteren die immunhistologischen Färbungen mit jenen monoklonalen Antikörpern zu erläutern, die deren spezifische Zell-Eigenschaften verdeutlichten (4.4., 4.5., 4.6., 4.7.).

4.1. Peritumorale Entzündung

Während des Mikroskopierens der 60 Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Plattenepithelkarzinome, die durch eine Zufallsstichprobe ausgewählt worden waren, fiel auf, dass das Ausmaß der peritumoralen Entzündung in den einzelnen Plattenepithelkarzinomen unterschiedlich ausgeprägt war (s. Abb. 9). Aus diesem Befund wurde die bereits erwähnte Klassifikation in nicht bis gering (+) und mäßig bis stark (+++) entzündete Plattenepithelkarzinome abgeleitet. In Abbildung 9 werden exemplarisch Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Schnitte der drei untersuchten Gruppen in der Vergrößerung x100 dargestellt.

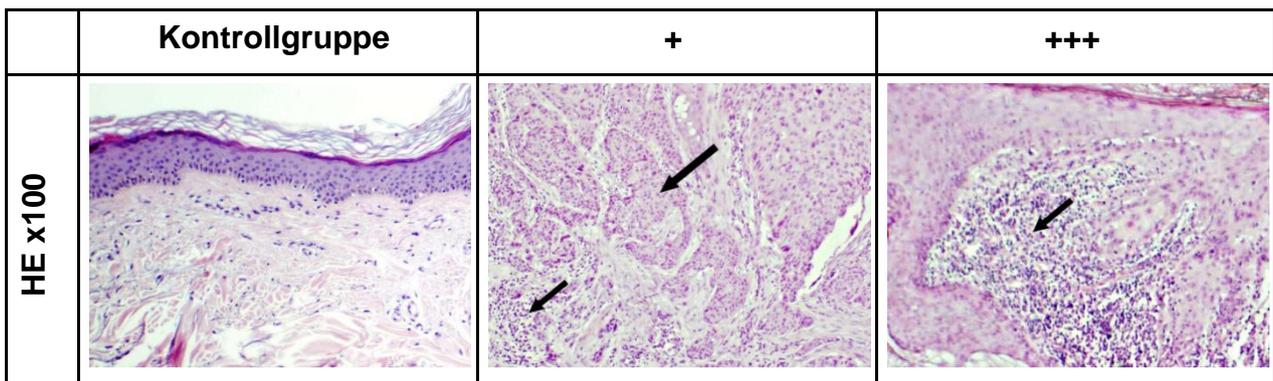


Abb. 9: Hämatoxylin-Eosin-Färbung; Vergrößerung x100. In der Kontrollgruppe regelrechte Histoarchitektur der Haut ohne Nachweis von Entzündungszellen. Der große Pfeil deutet exemplarisch auf Tumorzellen, der kleine auf Infiltration durch Lymphozyten.

4.2. T-Lymphozyten als wesentliche Zellen im inflammatorischen Infiltrat

Zur näheren Charakterisierung der Zellen im peritumoralen Infiltrat wurden die Methoden der Immunhistologie eingesetzt. Dabei wurden die folgenden drei Gruppen untersucht: Gesunde Haut (Kontrollgruppe) n=5, nicht bis gering entzündete Plattenepithelkarzinome (+) n=10, mäßig bis stark entzündete Plattenepithelkarzinome (+++) n=10. Verwendet wurden die monoklonalen Antikörper gegen CD3 (PS1, Immunotech™), CD4 (1F6, Novocastra™), CD8 (C8/144B, DAKOPATTS™), CD20 (L26(1), DAKO™) und CD68 (PG-M1, DAKO™).

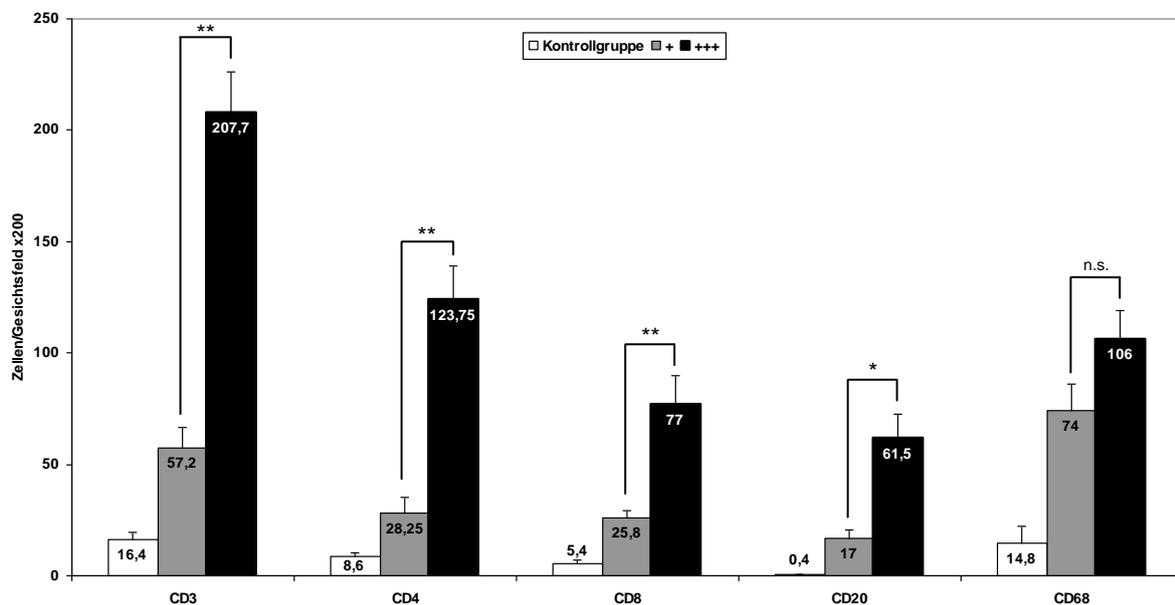


Abb. 10: Charakterisierung der Zellen des peritumoralen Infiltrats
Anzahl der Zellen/Gesichtsfeld in der Vergrößerung x200
 (p<0,05 (*) = signifikant, p<0,01 (**) = hoch signifikant, n.s. = nicht signifikant)

Die Anzahl der CD3+, CD4+ und CD8+ Zellen war bei den mäßig bis stark entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+++) im Vergleich zu den nicht bis gering entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+) hoch signifikant erhöht, die Anzahl CD20+ Zellen signifikant erhöht. Einzig der Unterschied in der Anzahl CD68+ Zellen in diesen beiden Gruppen war nicht signifikant (s. Abb. 10). Die Vergleiche zwischen der Kontrollgruppe und den nicht bis gering entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+) sowie zwischen Kontrollgruppe und den mäßig bis stark entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+++)

wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit hier und auch in den folgenden Kapiteln nicht graphisch dargestellt, sollen aber an dieser Stelle kurz erläutert werden: So war die Anzahl CD3+, CD20+ und CD68+ Zellen bei den nicht bis gering entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+) im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht, während die Unterschiede bei CD4+ und CD8+ Zellen nicht signifikant waren. Im Vergleich der mäßig bis stark entzündeten Plattenepithelkarzinome (+++) mit der Kontrollgruppe war die Anzahl CD3+, CD4+, CD8+ und CD20+ Zellen dagegen hoch signifikant, die der CD68+ Zellen signifikant erhöht (s. Tab. 8). Im Vordergrund stand bei den untersuchten Plattenepithelkarzinomen folglich quantitativ eine T-zelluläre Immunantwort (CD3, CD4, CD8), jedoch konnten in geringerer Zahl auch B-Lymphozyten (CD20) und Makrophagen (CD68) nachgewiesen werden. Beispielhaft werden in Abbildung 11 immunhistologisch gefärbte Schnitte der drei untersuchten Gruppen in der Vergrößerung x100 dargestellt.

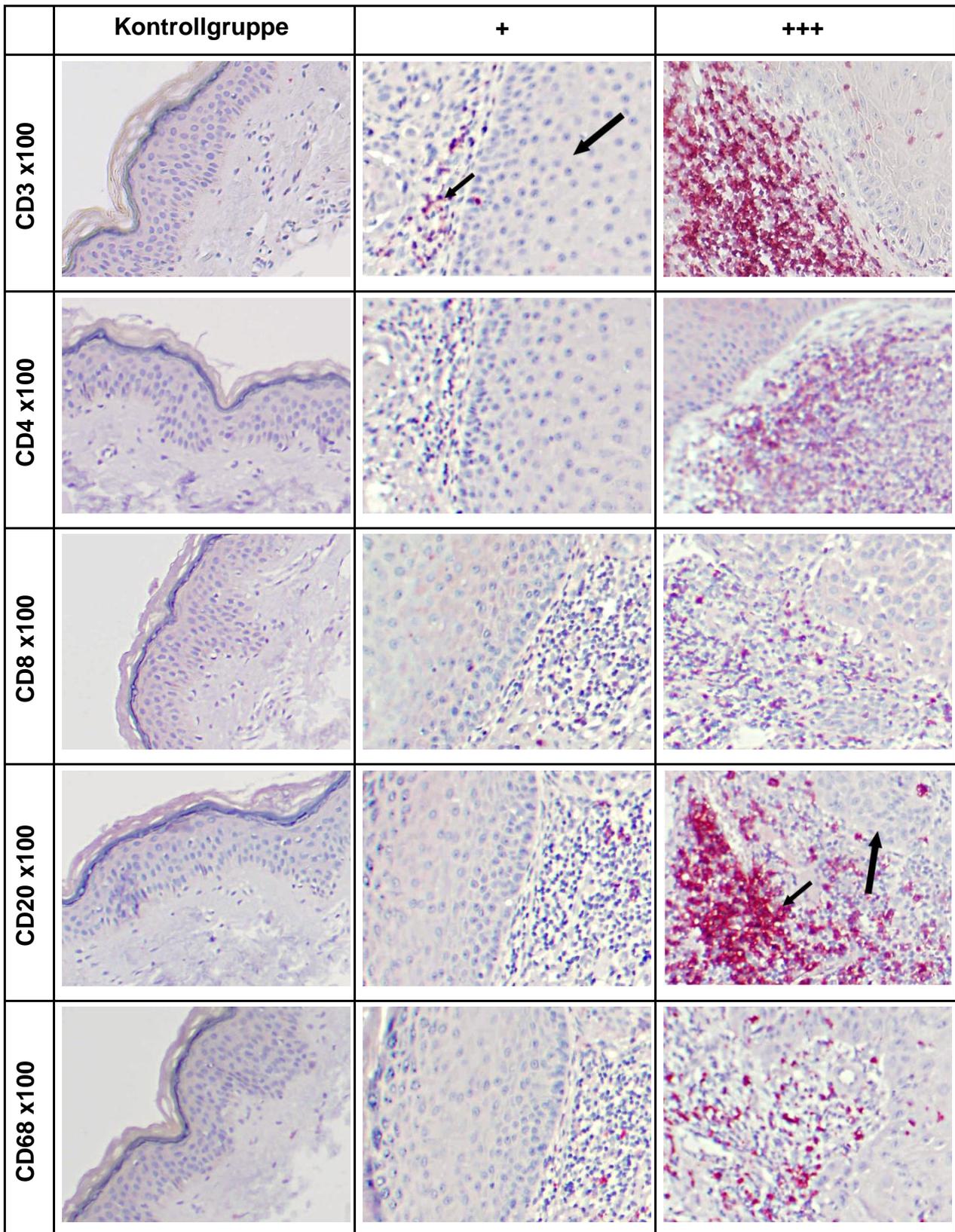


Abb. 11: Immunhistologische Färbungen mit Hilfe der Antikörper CD3, CD4, CD8, CD20 und CD68; Vergrößerung x100. Großer Pfeil: Tumorzellen; kleiner Pfeil: Lymphozyten mit entsprechendem Oberflächenmarker (dunkelrot).

4.3. Hohe Anzahl zytotoxischer Zellen

Zur weiteren Charakterisierung des Infiltrats wurde mit Hilfe der Immunhistologie die Expression zytotoxischer Marker auf den einzelnen Zellen nachgewiesen. Dabei wurden die folgenden drei Gruppen untersucht: Gesunde Haut (Kontrollgruppe) n=5, nicht bis gering entzündete Plattenepithelkarzinome (+) n=10, mäßig bis stark entzündete Plattenepithelkarzinome (+++) n=10. Verwendet wurden die monoklonalen Antikörper gegen CD 56 (1B6, Novocastra™), CD57 (TB01, DakoCytomation™), Granzym B (GrB-7, DakoCytomation™) und TIA-1 (TIA-1-1, Immunotech™).

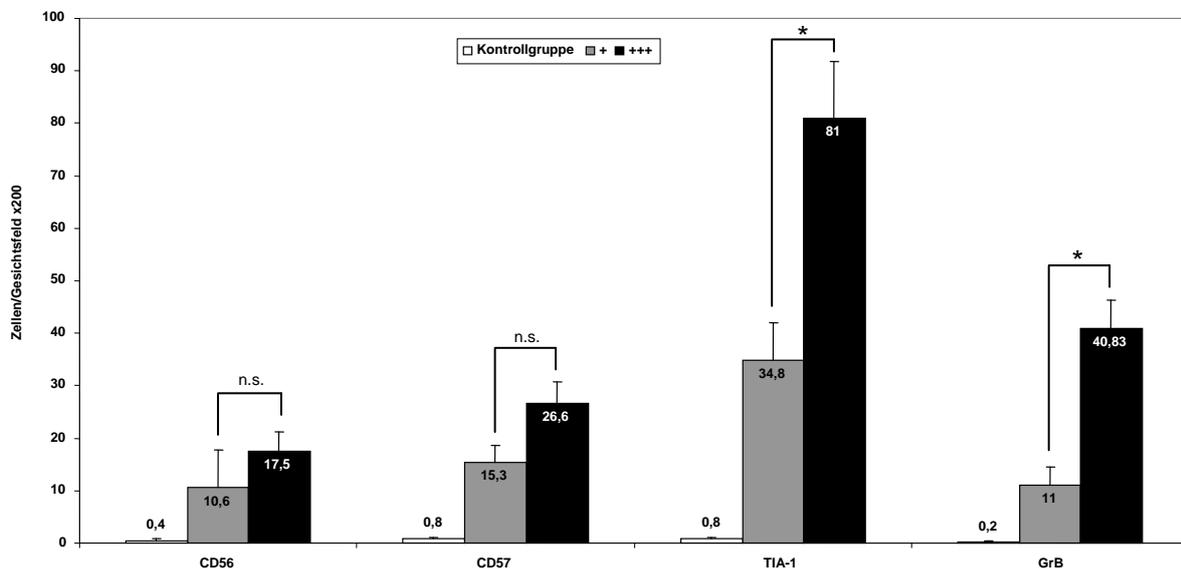


Abb. 12: Charakterisierung zytotoxischer Zellen des peritumoralen Infiltrats
Anzahl der Zellen/Gesichtsfeld in der Vergrößerung x200
 (p<0,05 (*)) = signifikant, p<0,01 (**)) = hoch signifikant, n.s. = nicht signifikant)

Die Anzahl CD56+ und CD57+ NK-Zellen war bei den mäßig bis stark entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+++) im Vergleich zu den nicht bis gering entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+) nicht signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu waren die Unterschiede in der Anzahl zytotoxischer TIA-1+ und GrB+ Zellen signifikant (s. Abb. 12). Auch an dieser Stelle wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit auf die graphische Darstellung der Vergleiche zwischen Kontrollgruppe und den nicht bis gering entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+) sowie zwischen Kontrollgruppe und den mäßig bis stark entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+++) verzichtet, diese sollen

aber trotzdem kurz erwähnt werden: So war die Anzahl CD56+, CD57, TIA-1+ und GrB+ Zellen bei den nicht bis gering entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+) im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Im Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und den mäßig bis stark entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+++) konnten hoch signifikante Unterschiede bei den CD57+, TIA-1+ und GrB+ Zellen nachgewiesen werden, während der Unterschied in der Anzahl CD56+ Zellen nicht signifikant war (s. Tab. 8). Abbildung 13 zeigt exemplarisch immunhistologisch gefärbte Schnitte der drei untersuchten Gruppen in der Vergrößerung x100.

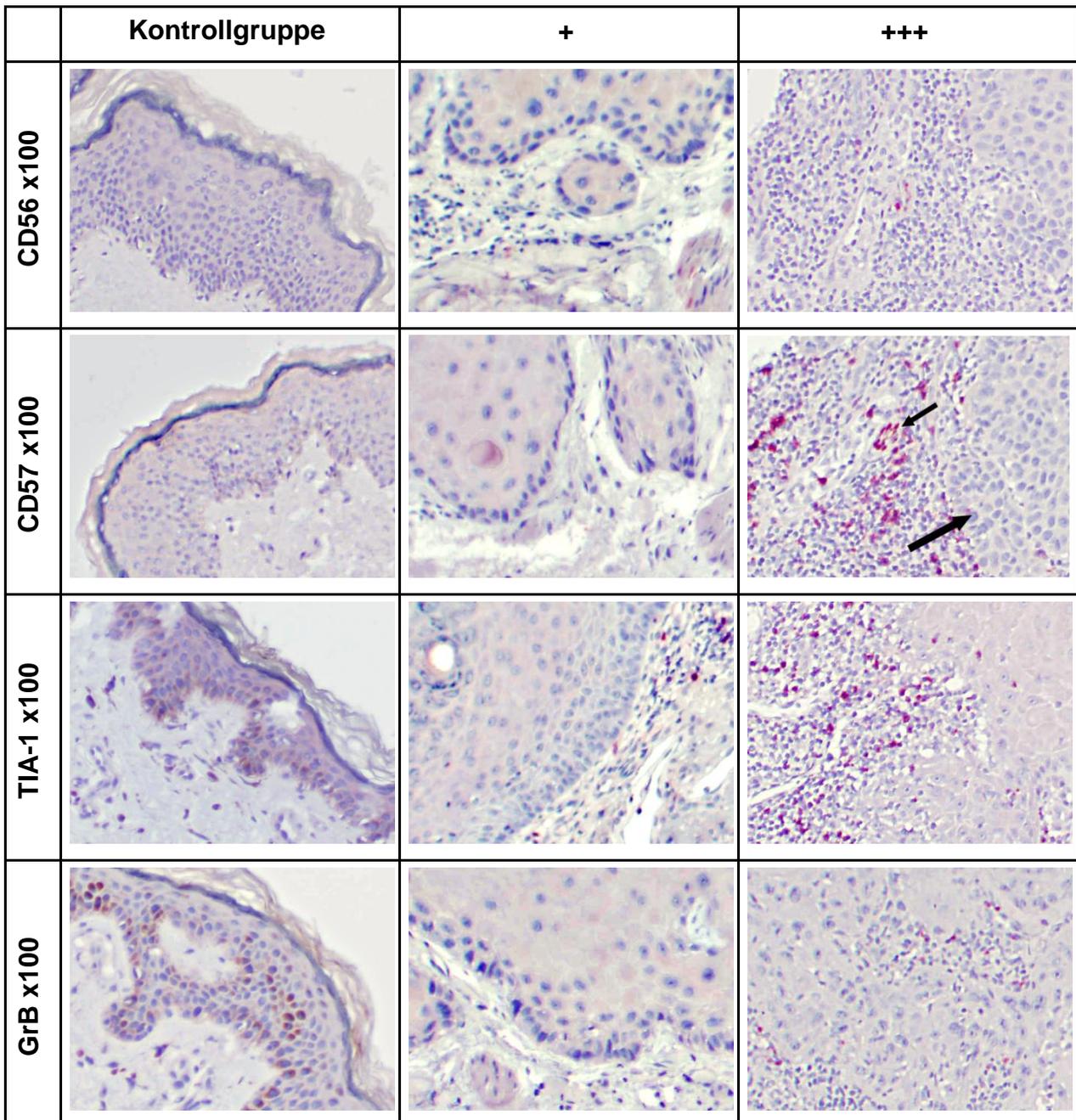


Abb. 13: Immunhistologische Färbungen mit Hilfe der Antikörper CD56, CD57, TIA-1 und GrB; Vergrößerung x100. In der Kontrollgruppe regelrechte Histoarchitektur der Haut ohne Nachweis von Entzündungszellen. Der große Pfeil deutet exemplarisch auf Tumorzellen, der kleine auf Infiltration durch Lymphozyten mit den entsprechenden zytotoxischen Oberflächenmarkern.

Da sich die zytotoxischen Zellen – und unter ihnen insbesondere GrB+ Zellen – in direkter Nähe, das heißt am Rand der initialen Plattenepithelkarzinome befanden und dort gehäuft apoptotische Tumorzellen nachgewiesen werden konnten, wurde zusätzlich eine Färbung mit Caspase3 durchgeführt. Bei Caspasen handelt es sich um Enzyme, die den programmierten Zelltod (Apoptose) induzieren können. Caspase3 tritt dabei als Schlüsselenzym in der Apoptosekaskade auf.

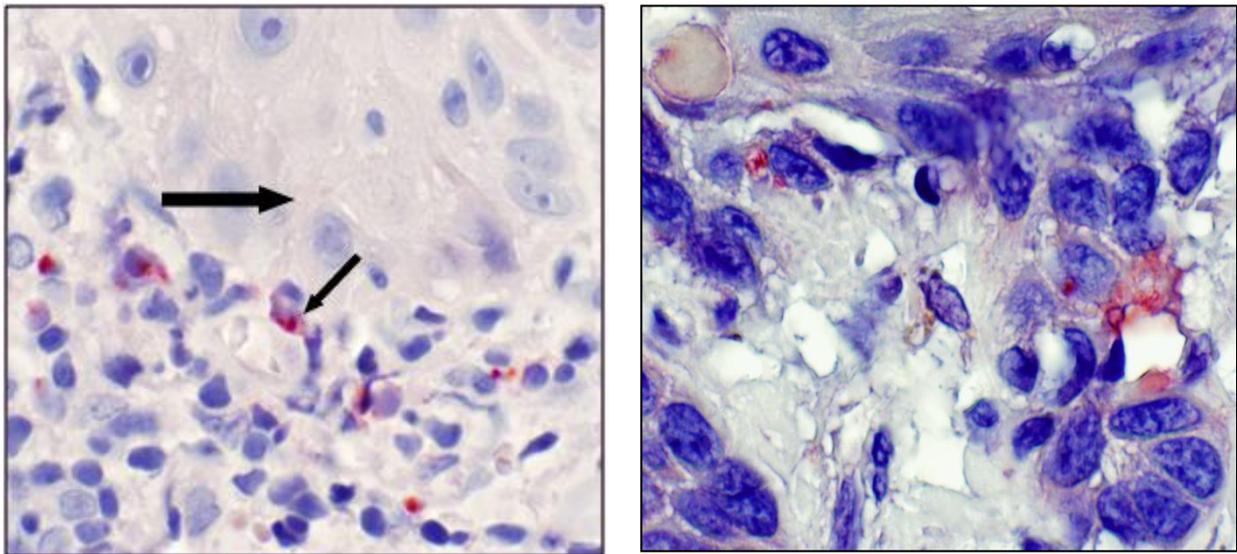


Abb. 14: Immunhistologische Färbungen mit Hilfe der Antikörper GrB und Caspase3: Nachweis von GrB+ zytotoxischen Zellen bei der Infiltration eines initialen Plattenepithelkarzinoms (links) und Nachweis apoptotischer Tumorzellen mittels Caspase3 (rechts); Vergrößerung x1000. Großer Pfeil: Tumorzellen; kleiner Pfeil: GrB+ zytotoxische Zelle in direkter Nähe zum Tumor.

4.4. Erhöhte Expression von Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)

IDO ist ein immunregulatorisches Enzym, welches eine wichtige Rolle in der Kontrolle von Entzündungsreaktionen spielt (Puccetti, 2007) und sowohl durch Typ I (IFN α und β) als auch durch Typ II (IFN γ) Interferone induziert werden kann. So katalysiert es unter anderem den Abbau von Tryptophan und ist in der Lage, lokal zu einem Proliferationsstillstand von T-Lymphozyten zu führen. (Uyttenhove et al., 2003) In der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden drei Gruppen in Bezug auf die Expression von IDO untersucht: Gesunde Haut (Kontrollgruppe) n=5, nicht bis gering entzündete Plattenepithelkarzinome (+) n=10, mäßig bis stark entzündete Plattenepithelkarzinome (+++) n=10. Verwendet wurde der monoklonale Antikörper gegen IDO (10.1, Chemicon international™).

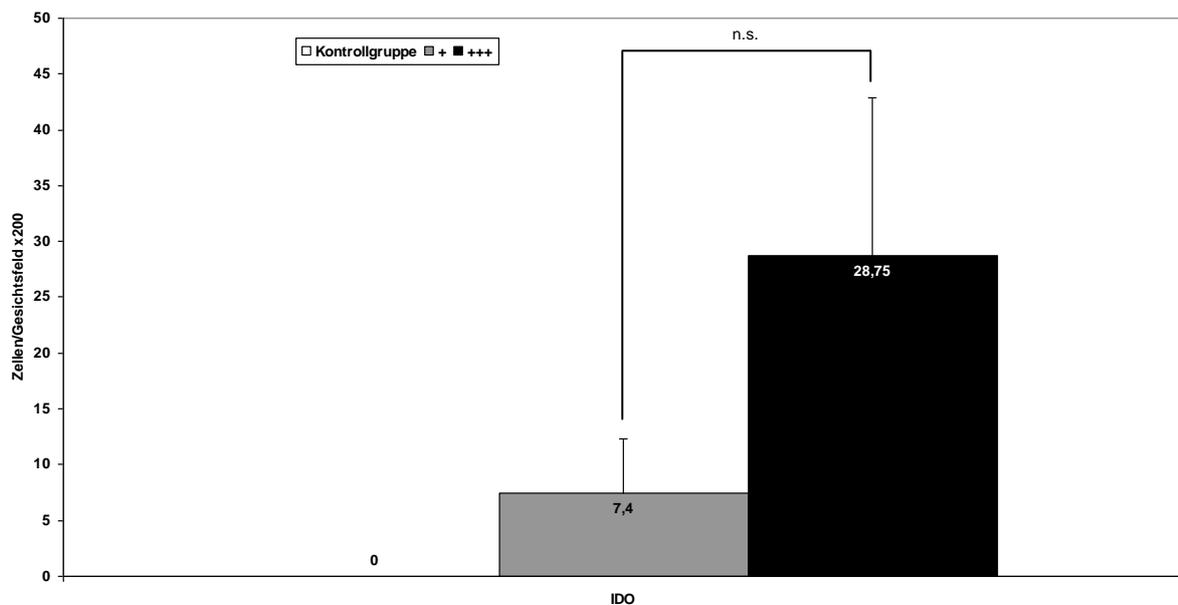


Abb. 15: Expression von IDO auf den Tumorzellen
Anzahl der Zellen/Gesichtsfeld in der Vergrößerung x200
 (p<0,05 (*)) = signifikant, p<0,01 (**)) = hoch signifikant, n.s. = nicht signifikant)

Die Expression von IDO auf den Tumorzellen verglichen mit den nicht bis gering entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+) und den mäßig bis stark entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+++) war nicht signifikant erhöht (s. Abb. 15). Die Ergebnisse der Vergleiche zwischen Kontrollgruppe und den nicht bis gering entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+) sowie zwischen Kontrollgruppe und den mäßig bis stark

entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+++) finden sich wie in den vorangehenden Kapiteln in Tabelle 8. Die Expression von IDO auf den Tumorzellen war im Vergleich der Kontrollgruppe mit den nicht bis wenig entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+) signifikant erhöht, im Vergleich der Kontrollgruppe mit den mäßig bis stark entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+++) hoch signifikant erhöht. In der immunhistologischen Färbung der Kontrollgruppe konnte keine Expression von IDO nachgewiesen werden. In Abbildung 16 werden erneut exemplarisch immunhistologisch gefärbte Schnitte der drei untersuchten Gruppen in der Vergrößerung x100 dargestellt.

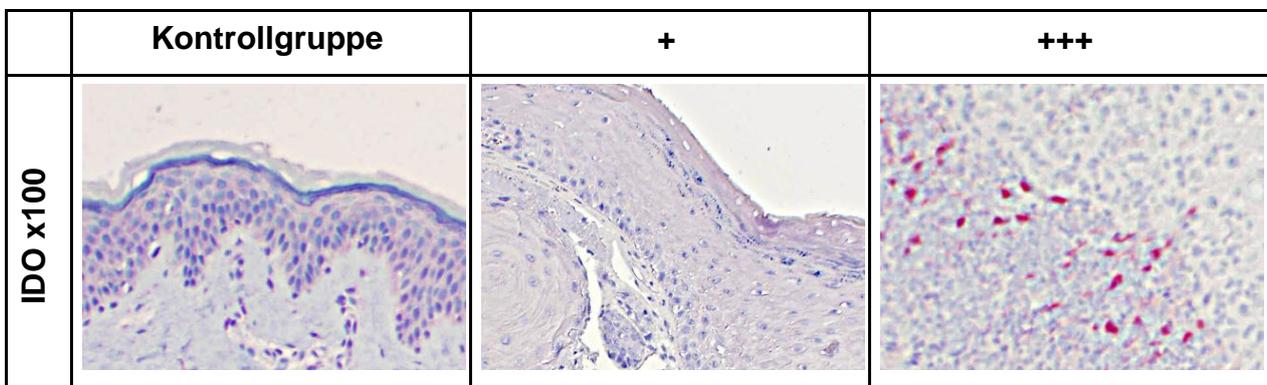


Abb. 16: Immunhistologische Färbungen mit Hilfe des Antikörpers IDO; Vergrößerung x100. Nachweis des immunregulatorischen Enzyms IDO in der Gruppe der stark entzündeten Spinaliome.

4.5. Hohe Expression von MxA

MxA ist ein antivirales Protein, dessen Expression spezifisch durch Typ I Interferone (IFN α und β) induziert wird. (Haller et al., 2007) Zum Nachweis einer solchen Typ I Interferon-assoziierten zytotoxischen Entzündung wurde die Expression dieses Markers auf epidermalen Zellen und auf Zellen des peritumoralen Infiltrats bestimmt. Dabei wurden wiederum die folgenden drei Gruppen untersucht: Gesunde Haut (Kontrollgruppe) n=5, nicht bis gering entzündete Plattenepithelkarzinome (+) n=10, mäßig bis stark entzündete Plattenepithelkarzinome (+++) n=10. Verwendet wurde der monoklonale Antikörper gegen MxA (M143, Prof. Haller, Freiburg), der gut paraffin-gängig und ein häufig verwendeter immunhistochemischer Marker für Typ I Interferon ist. (Wenzel et al., 2005)

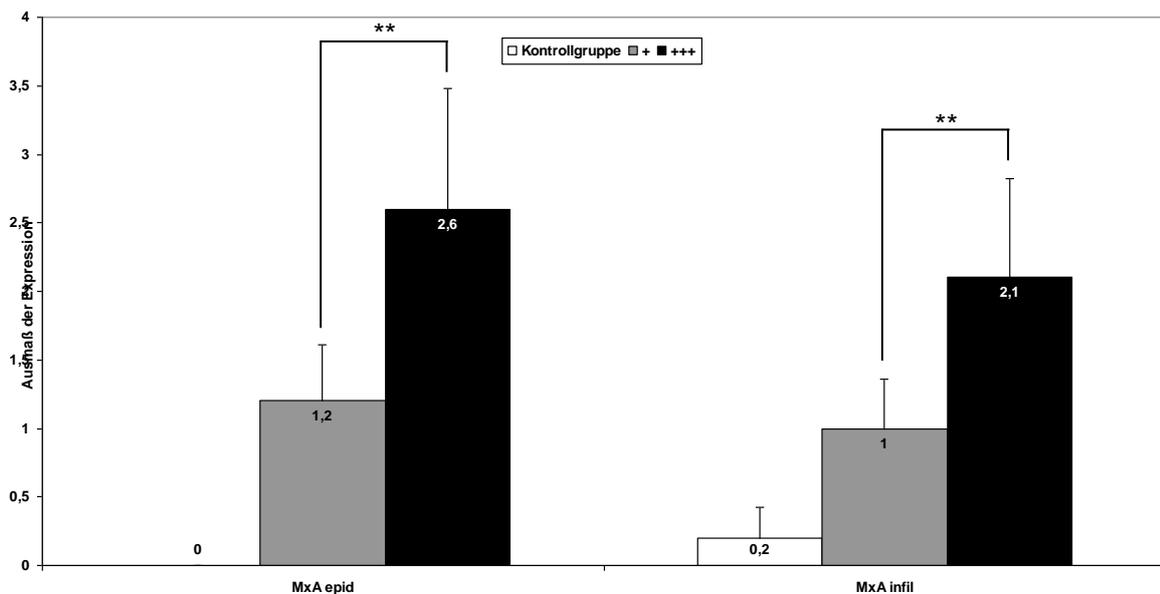


Abb. 17: Expression des antiviralen Proteins MxA auf epidermalen Zellen und Zellen des peritumoralen Infiltrats
Semiquantitative Beurteilung positiver Zellen/Gesichtsfeld in der Vergrößerung x200 (0 = keine Expression, 1 = schwache Expression, 2 = mäßige Expression, 3 = starke Expression)
 (p<0,05 (*)) = signifikant, p<0,01 (**)) = hoch signifikant, n.s. = nicht signifikant)

Der Unterschied der Expression des antiviralen Proteins MxA auf epidermalen Zellen im Vergleich der nicht bis gering entzündeten Plattenepithelkarzinome (+) mit den mäßig bis stark entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+++) war hoch signifikant, auf Zellen

des peritumoralen Infiltrats signifikant erhöht (s. Abb. 17). Die Vergleiche zwischen Kontrollgruppe und den nicht bis gering entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+) sowie zwischen Kontrollgruppe und den mäßig bis stark entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+++) ergaben folgende Ergebnisse: Die Expression von MxA auf epidermalen Zellen und auf Zellen des peritumoralen Infiltrats war im Vergleich der Kontrollgruppe mit den nicht bis wenig entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+) signifikant erhöht, im Vergleich der Kontrollgruppe mit den mäßig bis stark entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+++) hoch signifikant erhöht (s. Tab. 8). Auf den epidermalen Zellen der Kontrollgruppe konnte keine Expression von MxA nachgewiesen werden. In Abbildung 18 werden exemplarisch immunhistologisch gefärbte Schnitte der drei untersuchten Gruppen in der Vergrößerung x100 dargestellt.

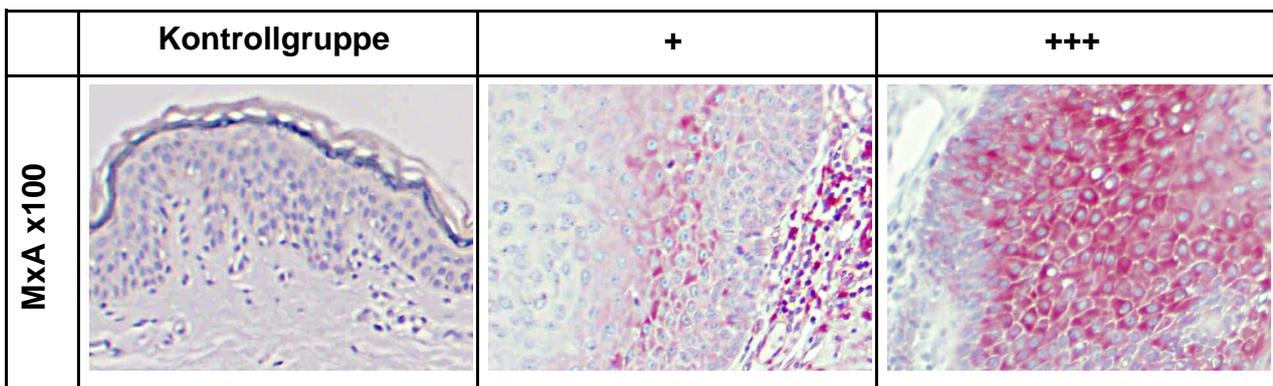


Abb. 18: Immunhistologische Färbungen mit Hilfe des Antikörpers MxA; Vergrößerung x100. Nachweis einer Typ I Interferon-assoziierten Entzündung durch den Oberflächenmarker MxA in den wenig und stark entzündeten Plattenepithelkarzinomen (rot gefärbte Bereiche).

4.6. Erhöhte Expression Interferon-induzierter Chemokine

CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 und CXCL11/I-TAC sind Interferon-induzierte Liganden des proinflammatorischen Chemokin-Rezeptors CXCR3 und stellen eine Verbindung zwischen einer Typ I Interferon-Produktion und Rekrutierung von CXCR3+ Lymphozyten dar. (Wenzel et al., 2005) Zum Nachweis der Expression der einzelnen Chemokine wurden die ausgewählten Plattenepithelkarzinome immunhistologisch gefärbt. Dabei wurden erneut die folgenden drei Gruppen untersucht: Gesunde Haut (Kontrollgruppe) n=5, nicht bis gering entzündete Plattenepithelkarzinome (+) n=10, mäßig bis stark entzündete Plattenepithelkarzinome (+++) n=10. Verwendet wurden die monoklonalen Antikörper gegen CXCL9/MIG (49106, R&D Systems™), CXCL10/IP-10 (33036, R&D Systems™) und CXCL11/I-TAC (87328, R&D Systems™).

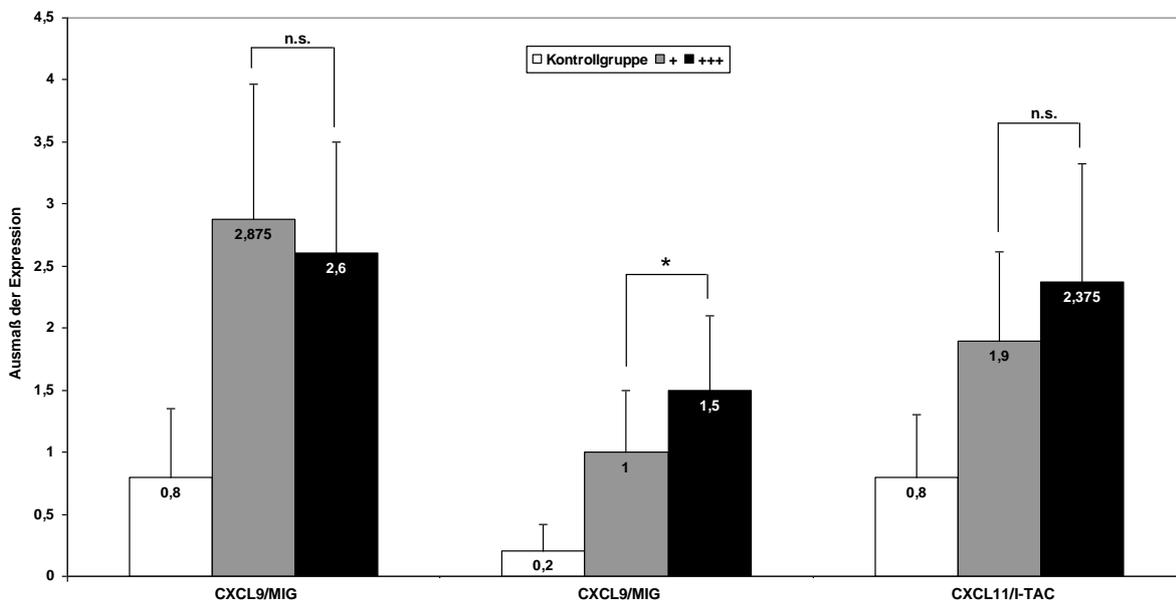


Abb. 19: Expression der Interferon-induzierten Chemokine CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 und CXCL11/I-TAC auf Zellen des peritumoralen Infiltrats
Semiquantitative Beurteilung positiver Zellen/Gesichtsfeld in der Vergrößerung x200 (0 = keine Expression, 1 = schwache Expression, 2 = mäßige Expression, 3 = starke Expression)
 (p<0,05 (*) = signifikant, p<0,01 (**) = hoch signifikant, n.s. = nicht signifikant)

Die Expression der Interferon-induzierten Chemokine CXCL9/MIG und CXCL11/I-TAC auf Zellen des peritumoralen Infiltrats war im Vergleich der nicht bis gering entzündeten Plattenepithelkarzinome (+) mit den mäßig bis stark entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+++) nicht signifikant erhöht, während die Expression von CXCL10/IP-10

bei den mäßig bis stark entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+++) signifikant erhöht war (s. Abb. 19). Die Vergleiche zwischen Kontrollgruppe und den nicht bis gering entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+) sowie zwischen Kontrollgruppe und den mäßig bis stark entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+++) wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit wiederum nicht graphisch dargestellt, sollen aber kurz erläutert werden: Die Expression der Interferon-induzierten Chemokine CXCL9/MIG und CXCL10/IP-10 war im Vergleich der Kontrollgruppe mit den nicht bis wenig entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+) signifikant, im Vergleich der Kontrollgruppe mit den mäßig bis stark entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+++) hoch signifikant erhöht. Die Expression des Chemokins CXCL11/I-TAC dagegen war nur im Vergleich der Kontrollgruppe mit den mäßig bis stark entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+++) signifikant (s. Tab. 8). Abbildung 20 zeigt exemplarisch immunhistologisch gefärbte Schnitte der drei untersuchten Gruppen in der Vergrößerung x100.

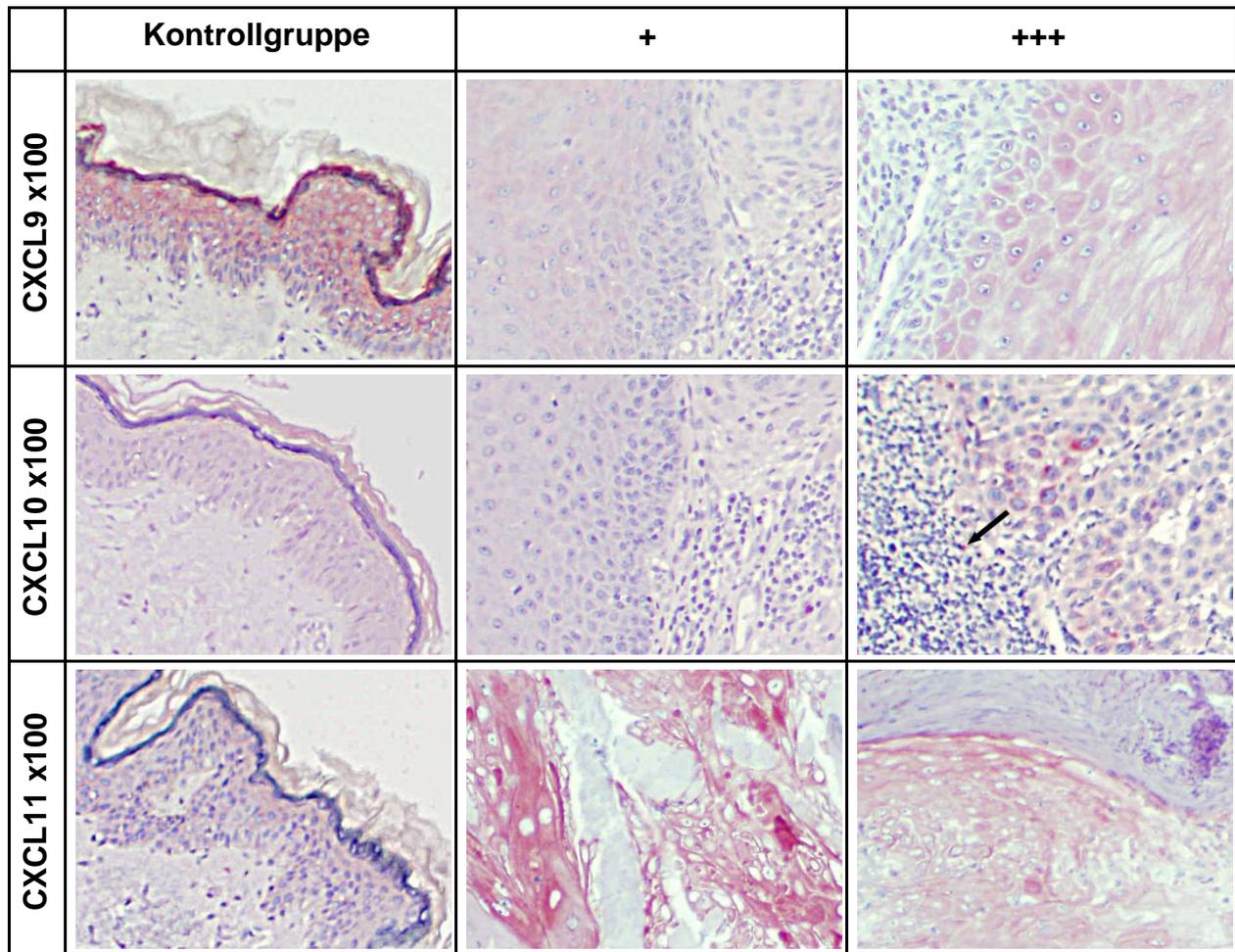


Abb. 20: Immunhistologische Färbungen mit Hilfe der Antikörper CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 und CXCL11/I-TAC; Vergrößerung x100. Nachweis der Interferon-induzierten Liganden des proinflammatorischen Chemokin-Rezeptors CXCR3 auf infiltrierenden Lymphozyten (s. kleiner Pfeil).

Darüber hinaus konnte insbesondere für CXCL10/IP-10 eine erhöhte Expression nachgewiesen werden, die sich in direkter Nähe zum Tumor befand.

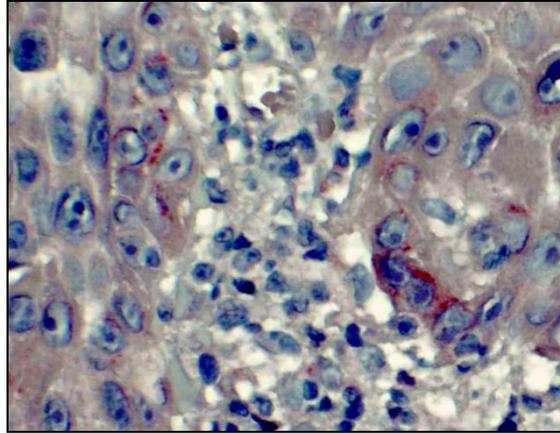


Abb. 21: Immunhistochemische Färbung mit Hilfe des Antikörpers CXCL10/IP-10 und dem Nachweis erhöhter Expression in direkter Tumornähe (rot gefärbte Zellen).

4.7. Hohe Anzahl CXCR3+ Lymphozyten

Der Chemokinrezeptor CXCR3, welcher auf aktivierten T-Zellen, natürlichen Killerzellen und einigen B-Zellen exprimiert wird (Loetscher et al., 1996) und auf eine Interferon-induzierte Rekrutierung von Lymphozyten hinweist, wurde immunhistologisch nachgewiesen. Dabei wurden die folgenden drei Gruppen untersucht: Gesunde Haut (Kontrollgruppe) n=5, nicht bis gering entzündete Plattenepithelkarzinome (+) n=10, mäßig bis stark entzündete Plattenepithelkarzinome (+++) n=10. Verwendet wurde der monoklonale Antikörper gegen CXCR3 (1C6/CXCR3, BD Pharmingen™).

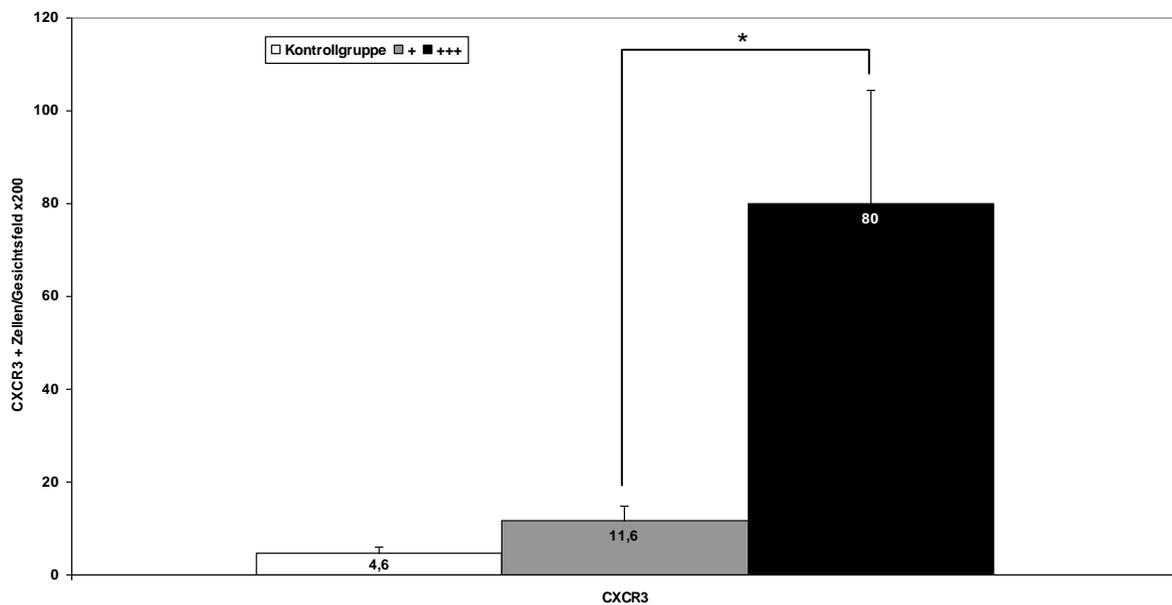


Abb. 22: Expression des Chemokinrezeptors CXCR3 auf Zellen des peritumoralen Infiltrats
Anzahl der Zellen/Gesichtsfeld in der Vergrößerung x200
 ($p < 0,05$ (*) = signifikant, $p < 0,01$ (**) = hoch signifikant, n.s. = nicht signifikant)

Die Expression des Chemokinrezeptors CXCR3 auf den Zellen des peritumoralen Infiltrats war im Vergleich der nicht bis gering entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+) mit den mäßig bis stark entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+++) signifikant erhöht (s. Abb. 22). Die Vergleiche zwischen Kontrollgruppe und den nicht bis gering entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+) sowie zwischen Kontrollgruppe und den mäßig bis stark entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+++) ergaben folgendes Bild: So war die Expression von CXCR3 im Vergleich der Kontrollgruppe mit den nicht bis wenig

entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+) zwar nicht signifikant, im Vergleich der Kontrollgruppe mit den mäßig bis stark entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+++) jedoch signifikant erhöht (s. Tab. 8). Beispielhaft werden in Abbildung 23 immunhistologisch gefärbte Schnitte der drei untersuchten Gruppen in der Vergrößerung x100 dargestellt.

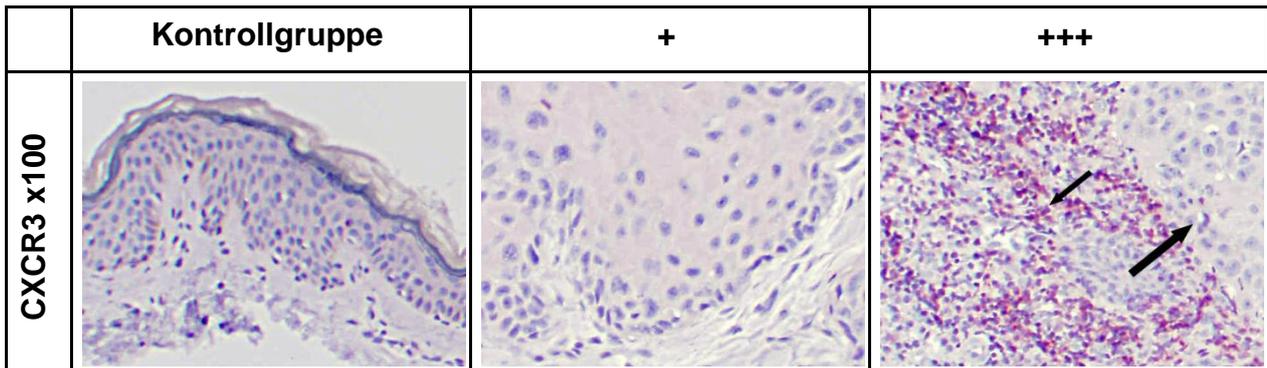


Abb. 23: Immunhistologische Färbungen mit Hilfe des Antikörpers CXCR3; Vergrößerung x100. Nachweis von CXCR3-exprimierenden Lymphozyten bei den stark entzündeten Plattenepithelkarzinomen. Der große Pfeil deutet auf den Tumor, der kleine Pfeil exemplarisch auf CXCR3+ Lymphozyten (dunkelrote Zellen).

Zur Unterstützung der These, dass es sich hierbei am ehesten um eine Typ I Interferon-assoziierte Entzündung handelt, wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der Expression von MxA, welches ein speziell durch Typ I Interferon induziertes antivirales Protein ist, und der Anzahl von CD3+ T-Lymphozyten, GrB+ zytotoxischer Zellen und CXCR3+ Lymphozyten, sowie der Expression vonIDO auf den Tumorzellen anhand von Korrelationen überprüft (s. Abb. 24, 25, 26 und 27). Da die genannten Variablen Ordinalskalenniveau aufwiesen, wurde jeweils eine Rangkorrelation nach Spearman (r_s) berechnet. (Bortz, 1999)

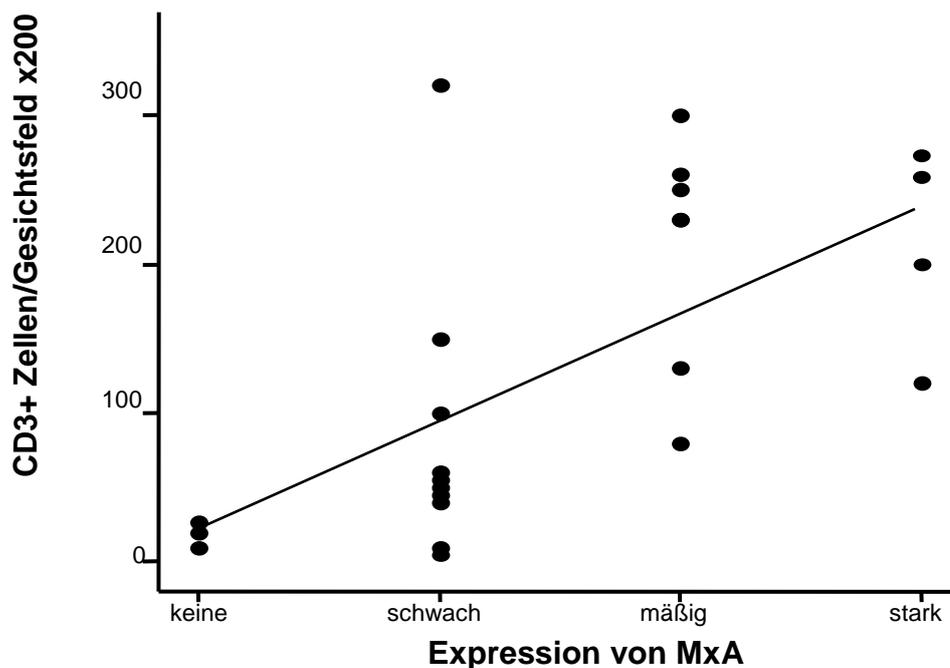


Abb. 24: Korrelation zwischen der Expression von MxA und der Anzahl CD3+ T-Lymphozyten

Hierbei ergab sich ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen der Expression von MxA und der Anzahl CD3+ T-Lymphozyten ($r_s = 0,8$, $p < 0,01$ (**)) (s. Abb. 24).

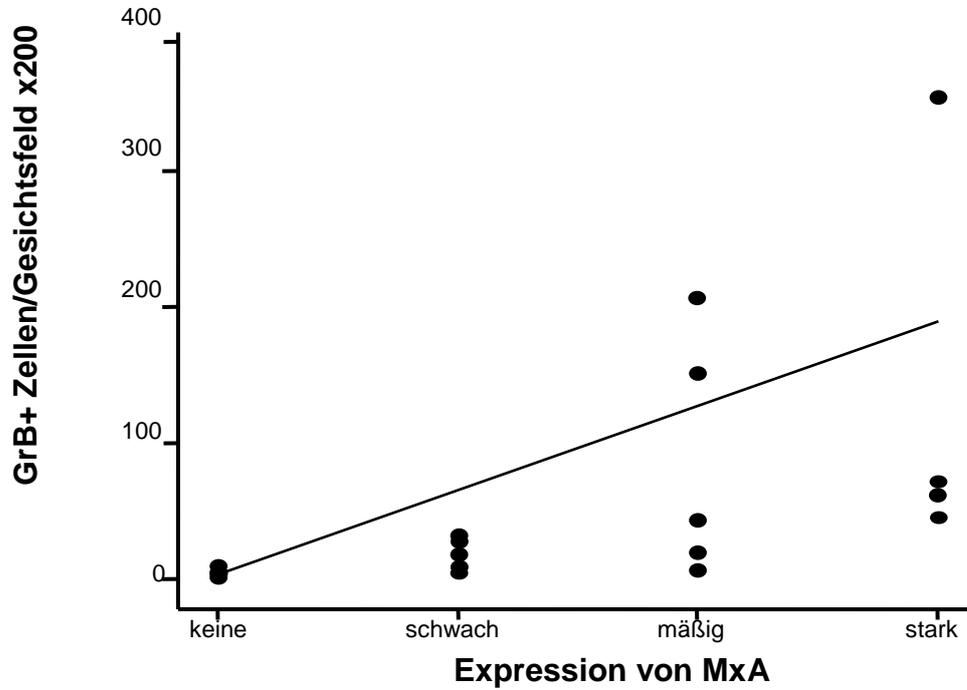


Abb. 25: Korrelation zwischen der Expression von MxA und der Anzahl GrB+ zytotoxischer Zellen

Weiterhin zeigte sich ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen der Expression von MxA und der Anzahl GrB+ zytotoxischer Zellen ($r_s = 0,89$, $p < 0,01$ (**)) (s. Abb. 25).

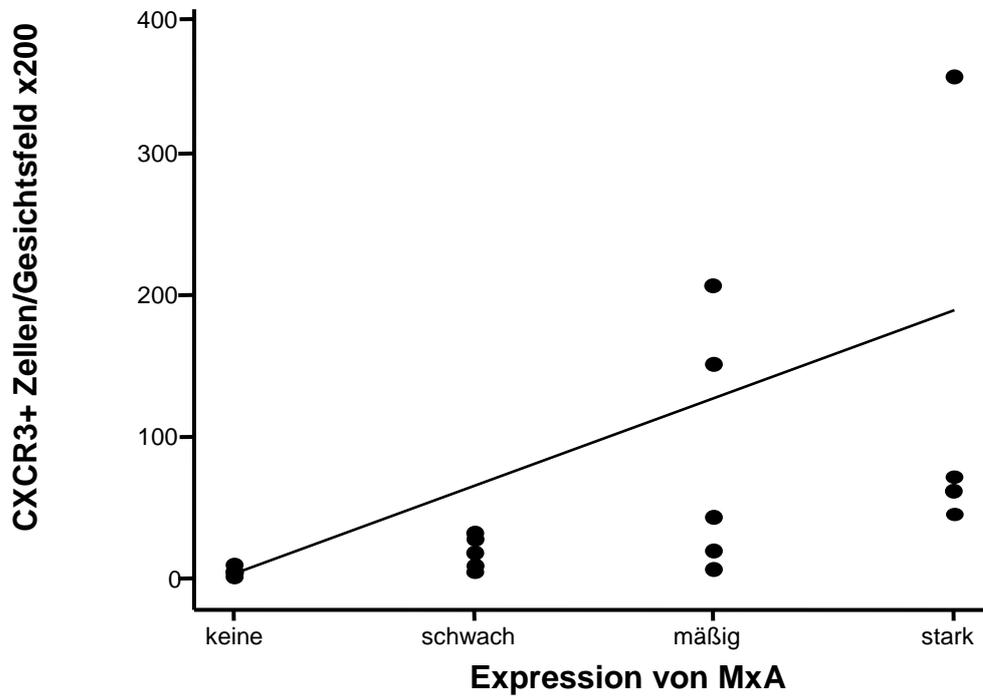


Abb. 26: Korrelation zwischen der Expression von MxA und der Anzahl CXCR3+ Lymphozyten

Außerdem wies die Expression von MxA einen signifikant positiven Zusammenhang mit der Anzahl CXCR3+ Lymphozyten auf ($r_s = 0,83$, $p < 0,01$ (**)) (s. Abb. 26).

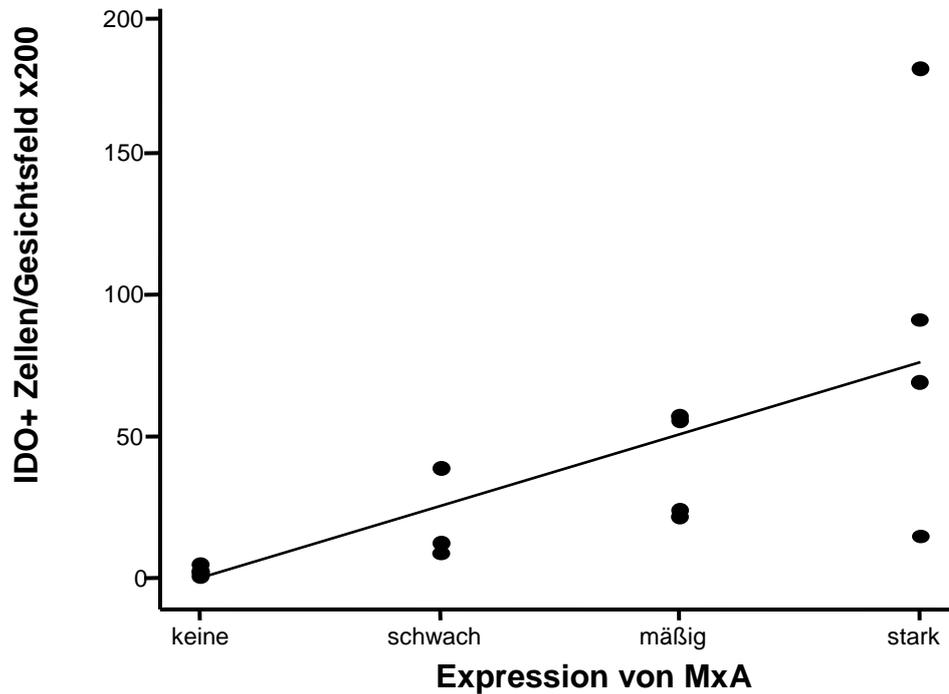


Abb. 27: Korrelation zwischen der Expression von MxA und der Expression von IDO auf den Tumorzellen

Darüber hinaus korrelierte die Expression von MxA positiv mit der Expression von IDO auf den Tumorzellen ($r_s = 0,86$, $p < 0,01$ (**)) (s. Abb. 27).

Insgesamt war also eine erhöhte Expression von MxA mit einer erhöhten Anzahl von CD3+ T-Lymphozyten, GrB+ zytotoxischen Zellen, CXCR3+ Lymphozyten und einer erhöhten Expression von IDO auf den Tumorzellen assoziiert.

Antikörper	Gruppe + gegen +++ (siehe Graphiken)	Kontrollgruppe gegen +	Kontrollgruppe gegen +++
CD3	**	*	**
CD4	**	n.S.	**
CD8	**	n.S.	**
CD20	*	*	**
CD68	n.S.	*	*
CD56	n.S.	*	n.S.
CD57	n.S.	*	**
TIA-1	*	*	**
GrB	*	*	**
CXCR3	*	n.S.	**
MxA (Epidermis)	**	*	**
MxA (Infiltrat)	*	*	**
CXCL9/MIG	n.S.	*	**
CXCL10/IP-10	*	*	**
CXCL11/I-TAC	n.S.	n.S.	*
IDO	n.S.	*	**

Tab. 8: Übersicht über die Signifikanzen im Vergleich der einzelnen Gruppen
($p < 0,05$ (*) = signifikant, $p < 0,01$ (**) = hoch signifikant, n.s. = nicht signifikant)

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Ausmaß und Art der Entzündung im initialen Plattenepithelkarzinom der Haut untersucht. Dazu wurden Serienschnitte von Stanzbiopsien 60 per Zufallsstichprobe ausgewählter Plattenepithelkarzinome mikroskopiert. Im Folgenden wurden 20 Plattenepithelkarzinome aus dieser Probe mit 15 unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern immunhistologisch gefärbt. Zunächst wurden die 10 nicht bis gering (+) und die 10 mäßig bis stark (+++) entzündeten Plattenepithelkarzinome hinsichtlich der Zusammensetzung des Begleitinfiltrats analysiert. So konnte mit Hilfe der monoklonalen Antikörper CD3, CD4, CD8, CD20, CD56, CD57 und CD68 das Verhältnis der einzelnen Lymphozytenarten im peritumoralen Infiltrat deutlich gemacht werden. Der Anteil zytotoxischer Zellen wurde mit den monoklonalen Antikörpern CD8, Granzym B und TIA-1 bestimmt. MxA, welches ein spezifisch durch Typ I Interferon-induziertes antivirales Protein ist, wurde zum Nachweis einer Interferon-Signatur genutzt. Des Weiteren wurden das Ausmaß der Expression des Rezeptors CXCR3, welcher zu den proinflammatorischen Chemokinrezeptoren gezählt wird, und das Vorkommen von dessen Liganden CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 und CXCL11/I-TAC immunhistologisch bestimmt. Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers IDO wurde eine Antiinflammation im Sinne einer Immunregulation durch den Tumor untersucht (s. Tab. 8).

Die Ergebnisse der Studie sollen im folgenden Kapitel nun abschließend rekapituliert und – auch im Hinblick auf zukünftige Fragestellungen – diskutiert werden.

5.1. Rolle des Immunsystems beim Plattenepithelkarzinom der Haut

Die Bedeutung des Immunsystems für die Entwicklung des Plattenepithelkarzinoms und der Mechanismus der spontanen Regression wurden bisher nur wenig erforscht. Typ I - (IFN α und IFN β) und Typ II - (IFN γ) Interferone wirken in unterschiedlicher, bisher nicht näher bekannter Weise dem Tumorprogress entgegen. (Dunn et al., 2006) Für IFN α konnte nachgewiesen werden, dass es die antitumoröse Immunantwort verstärkt. (Gogas et al., 2006) Dabei scheint für die Interferon-Induktion in Tumoren eine Schädigung der DNA, welche mit einer Entartung von Zellen assoziiert ist, eine wichtige Rolle zu spielen. (Xu, 2006) So geht die DNA-Schädigung unter anderem mit einer erhöhten Expression von Liganden einher, welche bei der Aktivierung von natürlichen Killerzellen und CD8+ T-Lymphozyten involviert sind. (Gasser und Raulet, 2006; Xu, 2006) Als Angriffsziel der zytotoxischen Zellen konnten beim Plattenepithelkarzinom der Haut UV-induzierte mutierte Epitope des Tumorsuppressorgens p53 in den entarteten Keratinozyten ausgemacht werden (Black und Ogg, 2003; Pacifico und Leone, 2007) , welche primär in aktinischen Keratosen nachgewiesen worden waren. (Nomura et al., 1997) Des Weiteren spielt für den Tumorprogress das Enzym Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) eine wichtige Rolle, welches von Tumorzellen exprimiert wird. Es katalysiert unter anderem den Abbau von Tryptophan und ist dadurch in der Lage, lokal zu einem Proliferationsstillstand von T-Lymphozyten zu führen. Der Nachweis, dass die meisten humanen Tumore IDO exprimieren, konnte in der Vergangenheit bereits erbracht werden. (Uyttenhove et al., 2003) Es handelt sich dabei folglich um eine tumorinduzierte Immunsuppression. Die Hypothese von Dunn et al., dass der Einfluss des Immunsystems die immunogene Qualität des wachsenden Tumors beeinflussen kann (Dunn et al., 2006), wird durch die Tatsache, dass es Plattenepithelkarzinome gibt, die aufgrund einer verminderten STAT-1-Rezeptor-Expression – ein Rezeptor, der aktiviert im Kern als Transkriptionsfaktor (STAT = signal transducer and activator of transcription) wirkt – Interferon-resistent geworden sind (Xi et al., 2006), gestützt.

5.2. Peritumorale Entzündung im Plattenepithelkarzinom der Haut

Es ist bekannt, dass in Plattenepithelkarzinomen der Haut histologisch in beinahe allen Fällen eine starke Stromareaktion um die proliferierenden Tumorstränge mit Anreicherung von Lymphozyten und Plasmazellen nachgewiesen werden kann. (Braun-Falco, 1997) Ziel der vorliegenden Arbeit war es, herauszufinden, ob und wie sich diese peritumoralen Infiltrate in Bezug auf ihr Ausmaß in einzelnen initialen Plattenepithelkarzinomen unterscheiden. Die erhobenen Daten an den zunächst nur Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten der ausgewählten 20 Plattenepithelkarzinome zeigten, dass das Ausmaß der peritumoralen Entzündung in den einzelnen Plattenepithelkarzinomen zwar stark divergierte, im Vergleich zu den Proben der Kontrollgruppe, in denen keine oder nur vereinzelt Immunzellen nachgewiesen werden konnten, jedoch bei allen untersuchten Plattenepithelkarzinomen deutlich vorhanden war. Diese Tatsache passt zu Ergebnissen von Hussein und Ahmed, die im Jahr 2005 die entzündlichen Infiltrate unterschiedlicher keratinozytärer Hautläsionen (Psoriasis vulgaris / Verruca vulgaris / seborrhoische Keratose / Lichen planus als Vertreter nicht-tumoröser Läsionen, aktinische Keratosen als Präkanzerose und Plattenepithelkarzinome als Vertreter tumoröser Läsionen) untersucht hatten und entdeckten, dass bei allen drei untersuchten Krankheitsentitäten die Anzahl der infiltrierenden mononukleären Zellen signifikant höher war als in der Kontrollgruppe (gesunde Haut). (Hussein und Ahmed, 2005)

5.3. T-Lymphozyten als Effektorzellen

Des Weiteren sollten die Zellen der hier nachgewiesenen Entzündungsreaktion näher charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden immunhistologische Färbungen mit den monoklonalen Antikörpern CD3, CD4, CD8, CD20 und CD68 durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass die Zellen, die das Infiltrat quantitativ ausmachten, T-Lymphozyten waren (CD3, CD4 und CD8+). B-Lymphozyten (CD20+) und Makrophagen (CD68+) konnten nur in geringer Zahl nachgewiesen werden. Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten entzündeten initialen Plattenepithelkarzinomen handelte es sich demzufolge nachweislich um eine T-zellulär- gestützte Immunantwort. Zu ähnlichen Ergebnissen kam die bereits unter 5.1. erwähnte Studie von Hussein und Ahmed, die ebenfalls die Zusammensetzung der Zellinfiltrate genauer beschrieb. Allerdings wurden dort neben massiv erhöhten Anzahlen von T-Lymphozyten (CD3+ Lymphozyten als vorherrschende Immunzellen) auch vermehrt B-Lymphozyten gefunden. Als Ursache für die ausgeprägte Immunreaktion bei aktinischen Keratosen und Plattenepithelkarzinomen schlugen Hussein und Ahmed eine veränderte Antigenität der keratinozytären Läsionen bzw. eine vermehrte Zytokin-Produktion entarteter Keratinozyten vor. (Hussein und Ahmed, 2005) Barnetson und Halliday untersuchten die spontane Regression bei unterschiedlichen Hauttumoren und fanden heraus, dass sowohl bei Melanomen und Basaliomen als auch bei Keratokanthomen und multiplen selbstheilenden squamösen Epitheliomen (als Variante des Plattenepithelkarzinoms) vermehrt CD3+ und – höchstwahrscheinlich über Zytokine aktivierte – CD4+ T-Lymphozyten nachgewiesen werden konnten. (Barnetson und Halliday, 1997) Die Befunde dieser und der hier vorliegenden Studie könnten somit bereits als ein erstes Zeichen für die von der Verfasserin hypothetisierte endogene Anti-Tumor-Immunabwehr gewertet werden.

5.4. Hinweis auf eine zytotoxische Immunantwort

Nachdem der Nachweis gelungen war, dass es sich im peritumoralen Infiltrat der untersuchten Plattenepithelkarzinome quantitativ um eine T-zelluläre Immunantwort handelte, stellte sich die Frage, ob die vorhandenen T-Lymphozyten, ebenso wie die Zellen, die als Ursache für eine spontane Regression bei Melanomen nachgewiesen werden konnten (Wenzel et al., 2005), zytotoxische Zellen waren. Hierzu wurden die monoklonalen Antikörper CD8, Granzym B und TIA-1 verwendet. Bei Granzym B handelt es sich um eine Serin-Esterase, die mit zytotoxischen T-Lymphozyten assoziiert ist, wohingegen TIA-1 ein intrazelluläres membranassoziertes Protein ist, welches direkt einen apoptotischen Zelltod induzieren kann. (Hussein und Ahmed, 2005) Neben einem hohen Anteil von CD8+ T-Lymphozyten im peritumoralen Infiltrat konnten in dieser Arbeit signifikant erhöhte Anzahlen an GrB+ und TIA-1+ Lymphozyten im Vergleich der nicht bis gering entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+) mit den mäßig bis stark entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+++) nachgewiesen werden. Darüber hinaus fiel auf, dass GrB genau an den Stellen zu finden war, an denen die Zellen im Begriff waren, den Tumor zu infiltrieren. Diese Befunde bestätigen die These, dass eine DNA-Schädigung von Zellen unter anderem zu einer Aktivierung von CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten führen kann. (Gasser und Raulet, 2006; Xu, 2006) Als mögliches Angriffsziel dieser zytotoxischen Zellen konnten beim Plattenepithelkarzinom der Haut, wie bereits erwähnt, UV-induzierte mutierte Epitope des Tumorsuppressorgens p53 in den entarteten Keratinozyten ausgemacht werden. (Black und Ogg, 2003; Pacifico und Leone, 2007) Auch konnte nachgewiesen werden, dass es – zumindest bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Bereich der Mundschleimhaut und des oberen Gastrointestinaltraktes – zu einer verminderten Präsentation des p53-Epitops auf der Tumorzelloberfläche und somit einer weniger ausgeprägten Antigenität im Sinne eines Immunoescape kommen kann. (Hoffmann et al., 2002) Ein neuer Therapieansatz könnte sein, das Ansprechverhalten der zytotoxischen T-Lymphozyten auf p53 zu steigern und somit verstärkt eine Tumorzelllyse zu induzieren. Wolf et al. untersuchten 2007 die Natur des inflammatorischen Infiltrats während einer lokalen Therapie unterschiedlicher oberflächlicher Hautmalignome mit Imiquimod und kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass – unabhängig von der Art des Hauttumors – das Infiltrat in allen Fällen hauptsächlich aus T-Lymphozyten (CD3+, CD4+ und CD8+) und zytotoxischen Zellen

(GranzymB+ und TIA-1+) bestand. (Wolf et al., 2007) Imiquimod ist ein Immunstimulator, der an den Toll-like-receptor 7 (TLR7) bindet, zu einer vermehrten Produktion von IFN α , IL12 und TNF α führt und dadurch die oben beschriebene, T-zellulär-gestützte Entzündungsreaktion verursacht. (Novak et al., 2008) Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen endogenen zytotoxischen Infiltrate im Plattenepithelkarzinom der Haut ähnelten folglich einer Entzündung, die durch eine erhöhte Interferonproduktion im Rahmen einer konservativen Therapie bei malignen Hauttumoren ausgelöst werden kann.

Als Immunmodulator stimuliert Imiquimod das Immunsystem, indem es an den Toll-like-receptor 7 (TLR7) bindet und zu einer vermehrten Produktion von IFN α , IL12, TNF α und zu einer Th1-gestützten Entzündungsreaktion führt. (Novak et al., 2008) Zugelassen ist Imiquimod (Aldara®), neben der Behandlung von aktinischen Keratosen, ebenso für äußerliche Feigwarzen und superfizielle Basaliome. (Rote Liste 2008) Als Initiatorzellen für die Imiquimod-induzierte körpereigene Abwehrreaktion bei der Therapie von Basaliomen konnten plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) und myeloide dendritische Zellen (mDC), welche in hohem Ausmaß TLR7 exprimieren, nachgewiesen werden. Klinisch zeigte sich bei der Behandlung der Basaliome bereits nach zwei bis drei Tagen ein Erythem, welches nach etwa zwei Wochen Erosionen entwickelte, die sich nach drei bis vier Wochen Behandlungsdauer verkrusteten, später narbige Plaques darstellten, die nach Beendigung der lokalen Therapie vollständig verschwanden. (Stary et al., 2007) Die Behandlung von aktinischen Keratosen mit Imiquimod (Aldara®) erfolgt dreimal wöchentlich über einen Zeitraum von vier bzw. acht Wochen und zeigte in einer 2007 durchgeführten Studie eine Erfolgsrate von 55 %. (Alomar et al., 2007)

5.5. MxA als Hinweis auf eine Typ I Interferon-induzierte zytotoxische Immunantwort

Es war der Verfasserin der Arbeit also gelungen, eine – möglicherweise Interferon-assoziierte – zytotoxische Immunantwort im Plattenepithelkarzinom der Haut nachzuweisen; nun sollte die Art dieser Entzündung noch genauer charakterisiert werden. Bei MxA handelt es sich um ein antivirales Protein, welches spezifisch durch Typ I Interferone (IFN α und β) induziert wird. (Haller et al., 2007) Zum Nachweis einer solchen Typ I Interferon-assoziierten zytotoxischen Entzündung wurden die ausgewählten Plattenepithelkarzinome mit dem monoklonalen Antikörper MxA immunhistologisch gefärbt. Die Expression des antiviralen Proteins MxA auf epidermalen Zellen im Vergleich der nicht bis gering entzündeten Plattenepithelkarzinome (+) mit den mäßig bis stark entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+++) war hoch signifikant, auf Zellen des peritumoralen Infiltrats signifikant erhöht. Dieses Ergebnis stärkt die Hypothese, dass es sich bei der bereits nachgewiesenen T-zellulären, zytotoxischen Entzündung in den untersuchten initialen Plattenepithelkarzinomen um eine Typ I Interferon-induzierte zytotoxische Immunantwort handelt. Es konnte in der Vergangenheit bereits nachgewiesen werden, dass eine solche Typ I Interferon-assoziierte Rekrutierung zytotoxischer T-Lymphozyten zur Tumorregression bei Melanomen führen kann. (Wenzel et al., 2005) Auch Dunn et al. beschreiben die zentrale Rolle von Interferonen in der Interaktion zwischen Tumor und Immunsystem und im Speziellen die Bedeutung der Typ I Interferone (IFN α und β). Ursprünglich war über Interferone bekannt, dass sie in der Lage sind, naive Zellen gegen virale Infektionen zu schützen. Heutzutage weiß man, dass sie eine wichtige Rolle in der Verknüpfung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem darstellen und als Immunmodulator die Schlüsselrolle in der Eliminationsphase des Cancer Immunoeditings spielen. (s. Abb. 7) (Decker et al., 2005; Dunn et al., 2005; Dunn et al., 2006) Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen eindeutig auf eine Typ I Interferon-induzierte zytotoxische Immunantwort hin, die als Auslöser für die spontane Regression im Plattenepithelkarzinom der Haut angesehen werden kann.

5.6. Interferon-Induktion der Chemokine CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 und CXCL11/I-TAC

CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 und CXCL11/I-TAC sind Interferon-induzierte Liganden des proinflammatorischen Chemokin-Rezeptors CXCR3 und stellen eine Verbindung zwischen einer Typ I Interferon-Produktion und Rekrutierung von CXCR3+ Lymphozyten dar. (Wenzel et al., 2005) Sie werden nicht konstitutiv exprimiert, vielmehr wird ihre Expression in einem proinflammatorischen, zytokinreichen Milieu hochreguliert, so dass sie ihre Rolle bei der Rekrutierung von Immunzellen erfüllen können. CXCL-10/IP10 im Speziellen ist darüber hinaus in der Lage, die T-Zell-Proliferation zu modulieren und eine Th1-gewichtete und daraus entsprechend resultierende Zytokinproduktion zu unterstützen. Außerdem konnte in Studien zu Tumorwachstum und Wundheilung gezeigt werden, dass die drei Chemokine zu einer Inhibition der Angiogenese führen können. (Lacotte et al., 2009) Die in der vorliegenden Studie verwendeten monoklonalen Antikörper wiesen CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 und CXCL11/I-TAC in den entzündeten Plattenepithelkarzinomen nach und bestätigten so ebenfalls die vermutete Interferon-Signatur der Zellen, die die peritumorale Infiltration ausmachten. Die oben genannten Wirkmechanismen dieser speziellen Chemokine könnten folglich ein weiterer Ansatzpunkt in der Therapie von Plattenepithelkarzinomen sein.

Die Tatsache, dass CXCL9/MIG bei den nicht bis gering entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+) den immunhistologischen Färbungen zufolge stärker exprimiert wurde als bei den mäßig bis stark entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+++), könnte unter anderem darin begründet liegen, dass die Etablierung dieses Antikörpers bei Paraffinschnitten noch nicht vollständig ausgereift ist.

5.7. Interferon-Rekrutierung von CXCR3+ Lymphozyten

Der Chemokinrezeptor CXCR3, welcher auf aktivierten T-Zellen, natürlichen Killerzellen und einigen B-Zellen exprimiert wird (Loetscher et al., 1996) und auf eine Interferon-induzierte Rekrutierung von Lymphozyten hinweist, sollte immunhistologisch nachgewiesen werden, um den Hinweis auf eine spontane Typ I Interferon-assoziierte Entzündung im Plattenepithelkarzinom der Haut und die Existenz endogener Anti-Tumor-Immunabwehr-Mechanismen noch weiter zu bestärken. Für CXCR3 konnte in der Vergangenheit bereits nachgewiesen werden, dass er in der Entstehung und Unterhaltung von Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle spielt. So konnte am Beispiel des systemischen Lupus erythematodes – bei dem es sich ebenfalls um epitheliale Hautläsionen handelt – gezeigt werden, dass die betroffenen Hautareale von CXCR3+ T-Lymphozyten infiltriert werden und diese die Entzündungsreaktion mit bedingen. Ursächlich für das Einwandern der Immunzellen in die Haut sind dabei lokal hohe Konzentrationen seiner bereits erwähnten Liganden CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 und CXCL11/I-TAC (sog. „skin homing“). (Lacotte et al., 2009) CXCR3 ist daher aufgrund seiner Eigenschaften und Wirkmechanismen ein Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Medikamente geworden (spezifische Antikörper, Antagonisten), die zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen in Frage kommen. Im Gegensatz dazu wäre eine erhöhte Expression und Aktivität des Rezeptors und seiner Liganden wünschenswert, wenn es darum geht, eine antitumorale Immunantwort zu unterstützen. Von Liu et al. wurde gezeigt, dass in vitro-Stimulation von T-Lymphozyten mittels Interleukin-2 zu einer signifikanten Steigerung der CXCR3-Expression führt. (Liu et al., 2005) Ob sich aus dieser Erkenntnis zukünftig neue Therapiemöglichkeiten für die Behandlung des Plattenepithelkarzinoms der Haut ergeben, müssen weitere Versuche und Studien zeigen.

Wie experimentell festgestellt wurde, ist die Expression des Chemokinrezeptors CXCR3 auf den Zellen des peritumoralen Infiltrats im Vergleich der nicht bis gering entzündeten Plattenepithelkarzinome (+) mit den mäßig bis stark entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+++) signifikant erhöht. Hierdurch konnte die Hypothese, dass es sich um eine Interferon-Rekrutierung von CXCR3+ Lymphozyten handelt, welche durch die bereits nachgewiesenen Interferon-induzierten Liganden CXCL9/MIG und

CXCL10/IP-10 entlang eines Chemogradients in das peritumorale Gewebe gewandert sind, bestätigt werden. Zur weiteren Untermauerung der Arbeitshypothese, dass es sich hierbei am ehesten um eine Typ I Interferon-assoziierte Entzündung handelt, wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der Expression von MxA und der Anzahl von CD3+ T-Lymphozyten, GrB+ zytotoxischen Zellen und CXCR3+ Lymphozyten, sowie der Expression von IDO auf den Tumorzellen anhand von Korrelationen überprüft. Diese ergaben alle hoch signifikante Werte und bestätigten die Existenz einer spontanen Typ I Interferon-assoziierten Entzündung im initialen Plattenepithelkarzinom der Haut – eine Erkenntnis, die als ein weiterer Hinweis auf die hypothetisierten endogenen Anti-Tumor-Immunabwehr-Mechanismen verstanden werden kann.

5.8. Rolle von Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)

Die Expression des immunregulatorischen Enzyms IDO, welches eine wichtige Rolle in der Kontrolle von Entzündungsreaktionen spielt (Puccetti, 2007) und lokal zu einem Proliferationsstillstand von T-Lymphozyten führen kann (Uyttenhove et al., 2003), wurde in den ausgewählten Plattenepithelkarzinomen immunhistologisch bestimmt, um eine mögliche Reaktion des Tumors auf den Immunangriff durch zytotoxische T-Lymphozyten nachzuweisen. In der immunhistologischen Färbung der Kontrollgruppe konnte keine Expression von IDO nachgewiesen werden, wohingegen auf den Tumorzellen im Vergleich der Kontrollgruppe mit den nicht bis wenig entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+) die Expression signifikant erhöht, im Vergleich der Kontrollgruppe mit den mäßig bis stark entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+++) hoch signifikant erhöht war. Der Druck, der durch die Reaktion des Immunsystems auf entartete Zellen ausgelöst werden kann, führte bei den untersuchten initialen Plattenepithelkarzinomen – und hier speziell in der Gruppe der mäßig bis stark entzündeten Plattenepithelkarzinome (+++) – nachgewiesenermaßen zu einem Versuch des Tumors, die Immunantwort durch Depression von T-Lymphozyten abzuschwächen und – im Sinne des Immunoescape (Dunn et al., 2006) – dem Angriff des Immunsystems zu entkommen. (s. Abb. 7) Erste Ansätze, sich IDO im Rahmen therapieresistenter Tumoren zu Nutze zu machen und mit Hilfe von Enzym-Inhibitoren eine Regression zu induzieren, existieren bereits. (Katz et al., 2008; Rutella et al., 2009)

6. Zusammenfassung

Das Plattenepithelkarzinom ist der zweithäufigste maligne Tumor der Haut und ätiologisch in der überwiegenden Zahl der Fälle durch UV-induzierte Mutationen des Tumorsuppressorgens p53, welche zu einer Proliferation entarteter Keratinozyten führen, bedingt. Obligate Präkanzerose des Plattenepithelkarzinoms ist die aktinische Keratose, die, ebenso wie das initiale Plattenepithelkarzinom, spontan in Regression gehen kann. Die Auseinandersetzung des Immunsystems mit den Tumorzellen scheint dabei eine entscheidende Rolle zu spielen, da bei immunsupprimierten Patienten häufig ein deutlich aggressiverer Krankheitsverlauf beobachtet werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der Methoden der Immunhistologie Serienschritte von Stanzbiopsien 60 per Zufallsstichprobe ausgewählter Plattenepithelkarzinome in Bezug auf Ausmaß und zelluläre Zusammensetzung ihrer peritumoralen Infiltrate untersucht. So sollte einerseits die Art der Immunantwort näher charakterisiert werden, andererseits sollte nachgewiesen werden, ob es infolge des Immunangriffs zu einer Reaktion im Sinne einer Immunregulation durch die Tumorzellen kommt.

Die experimentell ermittelten Daten bestätigten eindeutig die Existenz einer Typ I Interferon-assoziierten Entzündung im Plattenepithelkarzinom der Haut. Die Expression von MxA war bei den entzündeten Tumoren hoch signifikant erhöht, die infiltrierenden Zellen waren CXCR3+ mit einem hohen Anteil zytotoxischer Zellen. CXCL9/MIG und CXCL10/IP-10 wurden ebenfalls exprimiert.IDO wurde bei den mäßig bis stark entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+++) stärker exprimiert als bei den nicht bis gering entzündeten Plattenepithelkarzinomen (+) und wies so den Versuch der Tumorzellen nach, den Immunangriff abzuschwächen.

Ein tieferes Verständnis dieser spontanen Typ I Interferon-assoziierten zytotoxischen Entzündung im Sinne einer endogenen Anti-Tumor-Immunabwehr einerseits und des Mechanismus des Tumor-Escape andererseits könnte zur Optimierung bereits vorhandener Therapien und zur Entwicklung neuer Strategien beim therapeutischen Vorgehen gegen das Plattenepithelkarzinom der Haut führen.

7. **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1:	Inzidenzen der drei häufigsten Hautkrebsarten.....	5
Abb. 2:	Klinik des Plattenepithelkarzinoms.....	7
Abb. 3:	Histologie des Plattenepithelkarzinoms.....	8
Abb. 4:	Prädilektionsstellen für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen	10
Abb. 5:	Multistrittkarzinogenese des Plattenepithelkarzinoms	11
Abb. 6:	Histologie der aktinischen Keratose	12
Abb. 7:	Konzept der „Cancer Immunosurveillance“ und des „Immunoeditings“	16
Abb. 8:	Schema der LSAB-Methode mit Darstellung von Primärantikörper, biotinyliertem Brückenantikörper und Streptavidin-Enzym-Komplex.....	20
Abb. 9:	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	25
Abb. 10:	Charakterisierung der Zellen des peritumoralen Infiltrats.....	26
Abb. 11:	Immunhistologische Färbungen mit Hilfe der Antikörper CD3, CD4, CD8, CD20 und CD68.....	28
Abb. 12:	Charakterisierung zytotoxischer Zellen des peritumoralen Infiltrats	29
Abb. 13:	Immunhistologische Färbungen mit Hilfe der Antikörper CD56, CD57, TIA-1 und GrB.....	31
Abb. 14:	Immunhistologische Färbungen mit Hilfe der Antikörper GrB und Caspase3	32
Abb. 15:	Expression von IDO auf den Tumorzellen.....	33
Abb. 16:	Immunhistologische Färbungen mit Hilfe des Antikörpers IDO	34
Abb. 17:	Expression des antiviralen Proteins MxA auf epidermalen Zellen und Zellen des peritumoralen Infiltrats	35
Abb. 18:	Immunhistologische Färbungen mit Hilfe des Antikörpers MxA	36
Abb. 19:	Expression der Interferon-induzierten Chemokine CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 und CXCL11/I-TAC auf Zellen des peritumoralen Infiltrats.....	37
Abb. 20:	Immunhistologische Färbungen mit Hilfe der Antikörper CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 und CXCL11/I-TAC	39
Abb. 21:	Immunhistochemische Färbung mit Hilfe des Antikörpers CXCL10/IP-10..	40
Abb. 22:	Expression des Chemokinrezeptors CXCR3 auf Zellen des peritumoralen Infiltrats.....	41
Abb. 23:	Immunhistologische Färbungen mit Hilfe des Antikörpers CXCR3	42

Abb. 24:	Korrelation zwischen der Expression von MxA und der Anzahl CD3+ T-Lymphozyten.....	43
Abb. 25:	Korrelation zwischen der Expression von MxA und der Anzahl GrB+ zytotoxischer Zellen.....	44
Abb. 26:	Korrelation zwischen der Expression von MxA und der Anzahl CXCR3+ Lymphozyten.....	45
Abb. 27:	Korrelation zwischen der Expression von MxA und der Expression vonIDO auf den Tumorzellen.....	46

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Prädisponierende Faktoren für die Entstehung von Plattenepithel-karzinomen	6
Tab. 2:	Grading der Plattenepithelkarzinome nach Broders.....	9
Tab. 3:	Prognostisch ungünstige histologische Kriterien bei Plattenepithelkarzinomen.....	9
Tab. 4:	Klassifikation der Plattenepithelkarzinome bezüglich ihrer Eindringtiefe (Clark-Level).....	9
Tab. 5:	Prognostisch ungünstige klinische Kriterien bei Plattenepithelkarzinomen ..	11
Tab. 6:	Immunhistologische Charakterisierung mit Daten zu den verwendeten monoklonalen Antikörpern.....	22
Tab. 7:	Erläuterung der verwendeten immunhistochemischen Marker.....	23
Tab. 8:	Übersicht über die Signifikanzen im Vergleich der einzelnen Gruppen	47

9. Quellen- und Literaturverzeichnis

Abbildungen

- [Abb. 2] <http://www.dermis.net/dermisroot/de/19390/image.htm>
- [Abb. 2] <http://www.dermis.net/dermisroot/de/1257438/image.htm>
- [Abb. 4] McKee PH, Calonje E, Granter SR. Pathology of the Skin - With Clinical Correlations, Volume 2. Edinburgh: Elsevier Mosby, 2005, S. 1199
- [Abb. 5] Mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. med. Jörg Wenzel
- [Abb. 7] Modifiziert nach Dunn GP, Koebel M, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. Nat Rev Immunol, 2006; 6: S. 838
- [Abb. 8] Noll S, Schaub-Kuhnen S. Praxis der Immunhistochemie. München, Jena, 2000

Literatur

Rote Liste 2008. 3939192201, 2008

SPSS 13.0 User's Guide. New York: McGraw-Hill, 2004

World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. J Int Bioethique, 2004; 15: 124-129

Alam M, Ratner D. Cutaneous squamous-cell carcinoma. N Engl J Med, 2001; 344: 975-983

Alomar A, Bichel J, McRae S. Vehicle-controlled, randomized, double-blind study to assess safety and efficacy of imiquimod 5% cream applied once daily 3 days per week in one or two courses of treatment of actinic keratoses on the head. Br J Dermatol, 2007; 157: 133-141

Barnetson RS, Halliday GM. Regression in skin tumours: a common phenomenon. Australas J Dermatol, 1997; 38 Suppl 1: S63-65

Black AP, Ogg GS. The role of p53 in the immunobiology of cutaneous squamous cell carcinoma. Clin Exp Immunol, 2003; 132: 379-384

Bortz J. Statistik für Sozialwissenschaftler. Berlin: Springer-Verlag, 1999

Braun-Falco O. Dermatologie und Venerologie. Berlin [u.a.]: Springer, 1997

Bui JD, Schreiber R. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? Curr Opin Immunol, 2007; 19: 203-208

- Burnet M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J*, 1957; 1: 779-786
- Decker T, Muller M, Stockinger S. The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat Rev Immunol*, 2005; 5: 675-687
- Dunn GP, Bruce AT, Sheehan KC, Shankaran V, Uppaluri R, Bui JD, Diamond MS, Koebel CM, Arthur C, White JM, Schreiber RD. A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat Immunol*, 2005; 6: 722-729
- Dunn GP, Koebel M, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol*, 2006; 6: 836-848
- Gasser S, Raulet D. The DNA damage response, immunity and cancer. *Semin Cancer Biol*, 2006; 16: 344-347
- Gogas H, Ioannovich J, Dafni U, Stavropoulou-Giokas C, Frangia K, Tsoutsos D, Panagiotou P, Polyzos A, Papadopoulos O, Stratigos A, Markopoulos C, Bafaloukos D, Pectasides D, Fountzilias G, Kirkwood JM. Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon. *N Engl J Med*, 2006; 354: 709-718
- Haller O, Staeheli P, Kochs G. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie*, 2007; 89: 812-818
- Hoffmann TK, Donnerberg AD, Finkelstein SD, Donnerberg VS, Friebe-Hoffmann U, Myers EN, Appella E, DeLeo AB, Whiteside TL. Frequencies of tetramer+ T cells specific for the wild-type sequence p53(264-272) peptide in the circulation of patients with head and neck cancer. *Cancer Res*, 2002; 62: 3521-3529
- Hussein MR, Ahmed RA. Analysis of the mononuclear inflammatory cell infiltrate in the non-tumorigenic, pre-tumorigenic and tumorigenic keratinocytic hyperproliferative lesions of the skin. *Cancer Biol Ther*, 2005; 4: 819-821
- Katz JB, Muller AJ, Prendergast GC. Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. *Immunol Rev*, 2008; 222: 206-221
- Kerl H. *Histopathologie der Haut*. Berlin: Springer, 2003
- Kunte C, Konz B. Aktuelle Therapieempfehlungen für das Basalzellkarzinom und Plattenepithelkarzinom der Haut. *Der Hautarzt*, 2007; 58: 419-426
- Lacotte S, Brun S, Muller S, Dumortier H. CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci*, 2009; 1173: 310-317
- Lautenschlager S, Itin PH. *Dermatologie: Antworten auf die steigende Inzidenz von Hauttumoren*. *Schweiz Med Forum*, 2005; 5: 1275-1276

- Liu L, Callahan MK, Huang D, Ransohoff RM. Chemokine receptor CXCR3: an unexpected enigma. *Curr Top Dev Biol*, 2005; 68: 149-181
- Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, Jones SA, Piali L, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med*, 1996; 184: 963-969
- Marks R, Foley P, Goodman G, Hage BH, Selwood TS. Spontaneous remission of solar keratoses: the case for conservative management. *Br J Dermatol*, 1986; 115: 649-655
- McKee PH, Calonje E, Granter SR. *Pathology of the Skin - With Clinical Correlations*, Volume 2. Edinburgh: Elsevier Mosby, 2005
- Nelson D, Ganss R. Tumor growth or regression: powered by inflammation. *J Leukoc Biol*, 2006; 80: 685-690
- Noll S, Schaub-Kuhnen S. *Praxis der Immunhistochemie*. München, Jena, 2000
- Nomura T, Nakajima H, Hongyo T, Taniguchi E, Fukuda K, Li LY, Kurooka M, Sutoh K, Hande PM, Kawaguchi T, Ueda M, Takatera H. Induction of cancer, actinic keratosis, and specific p53 mutations by UVB light in human skin maintained in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res*, 1997; 57: 2081-2084
- Novak N, Yu CF, Bieber T, Allam JP. Toll-like receptor 7 agonists and skin. *Drug News Perspect*, 2008; 21: 158-165
- Pacifico A, Leone G. Role of p53 and CDKN2A Inactivation in Human Squamous Cell Carcinomas. *J Biomed Biotechnol*, 2007; 2007: 43418
- Philip M, Rowley DA, Schreiber H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin Cancer Biol*, 2004; 14: 433-439
- Pinkus H, Jallad M, Mehregan AH. The Inflammatory Infiltrate of Precancerous Skin Lesions. *J Invest Dermatol*, 1963; 41: 247-248
- Puccetti P. On watching the watchers:IDO and type I/II IFN. *Eur J Immunol*, 2007; 37: 876-879
- Rutella S, Bonanno G, De Cristofaro R. Targeting indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) to counteract tumour-induced immune dysfunction: from biochemistry to clinical development. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2009; 9: 151-177
- Saleh FH, Crotty KA, Hersey P, Menzies SW, Rahman W. Autonomous histopathological regression of primary tumours associated with specific immune responses to cancer antigens. *J Pathol*, 2003; 200: 383-395

- Sanderson KV, MacKie R. Tumours of the skin, in Textbook of Dermatology. 1979, Hrsg. Rooks, A., Wilkinson, D. S., Ebling, F. J. G.: Blackwell, Oxford. p. 2181.
- Sary G, Bangert C, Tauber M, Strohal R, Kopp T, Stingl G. Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J Exp Med*, 2007; 204: 1441-1451
- Steitz J, Bruck J, Lenz J, Buchs S, Tuting T. Peripheral CD8+ T cell tolerance against melanocytic self-antigens in the skin is regulated in two steps by CD4+ T cells and local inflammation: implications for the pathophysiology of vitiligo. *J Invest Dermatol*, 2005; 124: 144-150
- Ulrich C, Schmook T, Nindl I, Meyer T, Sterry W, Stockfleth E. Cutaneous precancers in organ transplant recipients: an old enemy in a new surrounding. *Br J Dermatol*, 2003; 149 Suppl 66: 40-42
- Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde BJ. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*, 2003; 9: 1269-1274
- Wenzel J, Bekisch B, Uerlich M, Haller O, Bieber T, Tuting T. Type I interferon-associated recruitment of cytotoxic lymphocytes: a common mechanism in regressive melanocytic lesions. *Am J Clin Pathol*, 2005; 124: 37-48
- Wenzel J, Worenkamper E, Freutel S, Henze S, Haller O, Bieber T, Tuting T. Enhanced type I interferon signalling promotes Th1-biased inflammation in cutaneous lupus erythematosus. *J Pathol*, 2005; 205: 435-442
- Wolf IH, Kodama K, Cerroni L, Kerl H. Nature of inflammatory infiltrate in superficial cutaneous malignancies during topical imiquimod treatment. *Am J Dermatopathol*, 2007; 29: 237-241
- Xi S, Dyer KF, Kimak M, Zhang Q, Gooding WE, Chaillet JR, Chai RL, Ferrell RE, Zamboni B, Hunt J, Grandis JR. Decreased STAT1 expression by promoter methylation in squamous cell carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*, 2006; 98: 181-189
- Xu Y. DNA damage: a trigger of innate immunity but a requirement for adaptive immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 2006; 6: 261-270

10. Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. med. Jörg Wenzel für die Überlassung des Dissertationsthemas und für die Hilfe bei der Publikation der Arbeitsergebnisse.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Sandra Mikus für die tolle Einarbeitung in histologische und immunhistologische Techniken und die schöne Zeit im Labor.

Vielen Dank für das kritische Korrekturlesen der Dissertation an Nicole und Barbara Vahsen.

Ein großer Dank gilt Martin Wiechers für seine Geduld und Hilfe in Computerfragen.

Mein abschließender Dank gilt meiner Familie für ihre beständige Unterstützung während des Studiums und bei der Erstellung dieser Arbeit.