

**Konsequenzen  
der Interleukin-6 Signaltransduktion in  
Zervixkarzinomzellen  
und dendritischen Zellen**

**Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln**

vorgelegt von  
**Jennifer Pahne**  
aus Lemgo

Köln, 2006

Berichtersteller:

Prof. Dr. Dr. h.c. H.J. Pfister  
Prof. Dr. K. Schnetz

Tag der mündlichen Prüfung:

31. Mai 2006

## **Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	VI
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Humane Papillomviren</b>	<b>1</b>
1.1.1. Klassifizierung und Struktur	1
1.1.2. Infektionszyklus und Funktionen früher HPV Proteine	2
1.1.2.1. Das E6 Protein	2
1.1.2.2. Das E7 Protein	4
1.1.2.3. Späte virale Proteine und Virusfreisetzung	4
1.1.3. HPV-Infektion in Assoziation mit der Zervixkarzinogenese	4
<b>1.2. Interleukin-6</b>	<b>6</b>
1.2.1. Funktionen von Interleukin-6	6
1.2.2. Signaltransduktionswege von Interleukin-6	7
<b>1.3. Dendritische Zellen</b>	<b>11</b>
1.3.1. Ursprung, Charakterisierung und Entwicklung von dendritischen Zellen	11
1.3.2. Lebenszyklus von dendritischen Zellen	12
1.3.3. Interaktion der dendritischen Zellen und T-Lymphozyten	14
<b>1.4. Interleukin-12</b>	<b>16</b>
1.4.1. Funktionen von Interleukin-12	16
1.4.2. Molekulare Regulation von Interleukin-12	18

<b>1.5. Regulation der T-Helferzell-Proliferation</b>	<b>19</b>
<b>1.6. Ziele dieser Arbeit</b>	<b>22</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
<b>2.1. Material</b>	<b>23</b>
2.1.1. Eukaryontische Zellen und Zelllinien	23
2.1.2. Medien und Reagenzien für die Zellkultur	24
2.1.3. Materialien zur Zell-Isolierung	26
2.1.4. Zytokine	26
2.1.5. Antikörper	27
2.1.5.1. Antikörper für <i>Western Blots</i>	27
2.1.5.2. Antikörper für Neutralisations-Experimente	27
2.1.5.3. Antikörper für <i>Supershift</i> -Analysen	28
2.1.5.4. Antikörper für Immunhistochemische Färbungen	28
2.1.5.5. Antikörper für FACS-Analysen	28
2.1.5.6. Antikörper für ELISA	29
2.1.6. Plastikmaterialien	29
2.1.7. Chemikalien	29
2.1.8. Radioisotope	29
2.1.9. Lösungen und Puffer	30
2.1.10. Oligonukleotide für EMSA	31
2.1.11. <i>Northern Blot</i> Sonden	31
2.1.12. ELISA-Reagenziensysteme	32
2.1.13. Reagenziensysteme ( <i>Kits</i> )	32
2.1.14. Sonstige Reagenzien	33
2.1.15. Geräte	33

<b>2.2. Methoden</b>	<b>34</b>
2.2.1. Zellkulturtechniken	34
2.2.1.1. Kultivierung eukaryontischer Zelllinien	34
2.2.1.2. Paraformaldehyd-Fixierung von BHK Zellen	34
2.2.1.3. Separation von peripheren, mononukleären Zellen mittels Ficoll-Gradienten	34
2.2.1.4. Magnetische Isolierung von Monozyten aus peripheren mononukleären Zellen des Blutes	35
2.2.1.5. Herstellung dendritischer Zellen	35
2.2.1.5.1. Differenzierung	35
2.2.1.5.2. Reifung	36
2.2.1.6. Isolierung von naïven T-Helferzellen aus peripherem Blut	36
2.2.2. Zytotoxizitäts-Assay	37
2.2.3. IL-12 Induktions-Experiment	38
2.2.4. IL-6 Neutralisations-Experiment	38
2.2.5. IP-10 und TNF $\alpha$ Induktion	39
2.2.6. Allogene, gemischte Lymphozyten-Kultur	39
2.2.7. Proliferations-Assay für Zervixkarzinomzellen	40
2.2.8. Präparation von Kernextrakten	40
2.2.8.1. Dignam-Methode	40
2.2.8.2. Andrews-Methode	40
2.2.9. Präparation von Ganzzellextrakten mittels LSDB-Puffer	40
2.2.10. Präparation von Ganzzellextrakten mittels SDS-Probenpuffer	41
2.2.10.1. Zervixkarzinom-Zelllinien	41
2.2.10.2. Dendritische Zellen	41
2.2.11. RNA Isolierung	41
2.2.12. Molekularbiologische Methoden	42
2.2.12.1. Standardmethoden	42
2.2.12.2. <i>Western Blot</i> Analysen	42
2.2.12.2.1. Zervixkarzinom-Zelllinien	42
2.2.12.2.2. Dendritische Zellen	43
2.2.12.3. Herstellung radioaktiv markierter Oligonukleotide	43
2.2.12.4. <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA)	43

2.2.12.5. <i>Supershift</i> -Analysen	43
2.2.12.6. <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	44
2.2.12.6.1. IL-6 ELISA	44
2.2.13. Immunhistochemische Untersuchungen	44
2.2.14. <i>Northern Blot</i> Analysen	45
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>46</b>
<b>3.1. Autokrine Wirkung von IL-6 in Zervixkarzinomzellen</b>	<b>46</b>
3.1.1. Einfluss von IL-6 auf die Onkogen Expression und Proliferation von Zervixkarzinomzellen	46
3.1.2. Induktion der c-myc Synthese durch IL-6 und OSM	47
3.1.3. IL-6 und OSM Signaltransduktion sensibilisieren HPV-positive Zelllinien für TNF $\alpha$ -vermittelte Zytotoxizität	48
3.1.4. IL-6 und OSM-vermittelte Sensitivität für TNF $\alpha$ -Zytotoxizität ist induzierbar	50
3.1.5. IL-6 und OSM Signalwege in Zervixkarzinomzellen	51
3.1.5.1. OSM führt zu STAT3 Aktivierung	51
3.1.5.2. <i>Western Blot</i> Analyse der IL-6 und OSM induzierten STAT3 Aktivierung	53
3.1.5.3. IL-6 und OSM aktivieren die ERK MAPK	54
3.1.6. Inhibition der ERK MAP Kinase sensibilisiert für TNF $\alpha$ -vermittelten Zelltod	55
3.1.7. Einfluss von IL-6 und OSM auf den Zytostatika-vermittelten Zelltod in Zervixkarzinomzellen	55
3.1.8. Phospho-STAT3(Tyr705) Aktivierung in CIN Läsionen und Zervixkarzinom	im 57

<b>3.2. Parakrine Wirkung von Zervixkarzinomzellen auf dendritische Zellen</b>	<b>59</b>
3.2.1. Tumorzell-Überstände reprimieren die IL-12 Produktion von DC	59
3.2.2. Zytokinprofil von Zervixkarzinomzellen	61
3.2.3. IL-6 und TGF $\beta$ reprimieren die IL-12 Produktion von DC	62
3.2.4. Neutralisation von IL-6 hebt die Tumorzell-Überstand-vermittelte IL-12 Repression in LPS-behandelten DC teilweise wieder auf	64
3.2.5. Mechanismen der IL-12 Repression durch IL-6 und TGF $\beta$	65
3.2.5.1. Induktion der IL-10 Expression von DC durch Tumorzell-Überstände	66
3.2.5.2. Induktion der IL-10 Expression von DC durch IL-6	66
3.2.5.3. IL-10 Produktion nach Neutralisation von IL-6	67
3.2.5.4. Tumorzell-Überstände reprimieren die NF- $\kappa$ B Bindeaktivität	68
3.2.5.5. IL-6 und TGF $\beta$ reprimieren die NF- $\kappa$ B Bindeaktivität	70
3.2.5.6. IL-6 aktiviert konzentrationsabhängig STAT3 in DC	71
3.2.5.7. Einfluss von IL-6 auf die SOCS Transkription	73
3.2.5.8. Einfluss von IL-6 auf die IRF-1 Expression	74
3.2.5.9. Einfluss von IL-6 auf pro-inflammatorische Moleküle	74
3.2.6. Wirkung von IL-6 auf die Interaktion von DC mit T-Helferzellen	76
3.2.6.1. Eingeschränkte, allogene T-Helferzell-Stimulation durch IL-6	76
3.2.6.2. IL-6 unterdrückt die IFN $\gamma$ Produktion von aktivierten T-Zellen	77
3.2.6.3. IDO Expression und IL-6	78
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>79</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>91</b>
<b>6. ABSTRACT</b>	<b>93</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>95</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AP-1	<i>activator protein 1</i>
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHK	Baby-Hamster Nierenzellen
bp	Basenpaar
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
CHX	Cycloheximid
CIN	<i>cervical intraepithelial neoplasia</i>
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Antigen 4
DC	dendritische Zelle
DD	<i>death domain</i>
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fötales Kälberserum
GAP12	<i>GA12 binding protein</i>
GM-CSF	<i>granulocyte monocyte colony stimulating factor</i>
gp80	IL-6 Rezeptor
HPV	humanes Papillomvirus
ICSBP	<i>interferon consensus sequence binding protein</i>
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

JAK	Janus Kinase
JNK	Jun Kinase
kDa	Kilodalton
LAK Zellen	Lymphokin-aktivierte Killer Zellen
LCR	<i>long control region</i>
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
M-CSF	<i>macrophage colony stimulating factor</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NF- $\kappa$ B	nukleärer Faktor $\kappa$ B
NK Zellen	Natürliche Killerzellen
NP-40	Nonidet-P40
ORF	<i>open reading frame</i>
ori	<i>origin of replication</i>
OSM	Oncostatin M
p.a.	<i>pro analysis</i>
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBL	periphere Blut-Lymphozyten
PBMC	periphere, mononukleäre Zellen des Blutes
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (Wasserstoffexponent)
PI3	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRb	Retinoblastoma Protein
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat

SOCS	<i>suppressor of cytokine signalling</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TAF	<i>TBP associated factors</i>
TBP	<i>TATA-binding protein</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TLR	<i>Toll like Rezeptoren</i>
TNF	Tumor Nekrose Faktor
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
wt	Wildtyp

# 1. Einleitung

## 1.1. Humane Papillomviren

### 1.1.1. Klassifizierung und Struktur

Papillomviren bilden seit 1999 die eigenständige Familie der *Papillomaviridae* (van Regenmortel *et al.*, 2000). Sie weisen eine strenge Gewebe- und Wirtsspezifität auf (zur Hausen und de Villiers, 1994). Allein beim Menschen gibt es über 100 vollständig charakterisierte Papillomvirus-Genotypen (HPV), die aufgrund ihres Tropismus in Haut- und Schleimhaut-assoziierte Typen unterteilt werden (zur Hausen, 2000). Sie führen beim Menschen zur Entstehung von gutartigen oder malignen Tumoren des Epithels wie Hautwarzen, Papillome oder Zervixkarzinomen (Shah und Howley, 1996). Die meisten HPV-Typen sind mit benignen, warzenähnlichen Läsionen assoziiert, die häufig spontan regredieren, und werden als Niedrig-Risiko (*low-risk*) Typen bezeichnet (z.B. HPV 6, 11, 40, 42). Diesen werden die Hoch-Risiko (*high-risk*) Typen (z.B. HPV 16, 18, 31, 45) gegenübergestellt, die in schwergradigen zervikalen intraepithelialen Neoplasien, sowie dem Zervixkarzinom nachweisbar sind (Bosch *et al.*, 1995). Papillomviren besitzen eine doppelsträngige, zirkuläre DNA von etwa 8000bp, die mit zellulären Histonen eine Chromatin-ähnliche Struktur bildet (Pfister, 1984) und von einem ikosaedrischen Kapsid ohne Lipidhülle umgeben wird. Die kodierende Region umfasst 7-10 offene Leserahmen (ORF) für frühe (*early*) regulatorische Proteine und späte (*late*) Strukturproteine (Shah und Howley, 1996). Die Bezeichnung früh oder spät erfolgt abhängig vom Zeitpunkt ihrer Synthese in der produktiven Phase der Infektion. Die Genprodukte der frühen Gene üben Funktionen bei der Transformation der Wirtszelle (E6, E7), der viralen Replikation (E1, E2), der Transkriptionskontrolle (E2) und der Virusfreisetzung (E4) aus. Transformierende Eigenschaften konnten auch für das E5 Protein von HPV16 aufgezeigt werden (Stöppler *et al.*, 1996). Die späten Gene kodieren für die beiden Kapsidproteine L1 und L2 (Pfister und Fuchs, 1987). Zwischen L1 und E6 befindet sich in jedem Genom eine 400-1000bp große Region, in der keine

ORF liegen, dafür aber cis-aktive Elemente für die Regulation der viralen Transkription und der *origin of replication* (ori) für die Genomreplikation. Daher wird dieser Genomabschnitt als *long control region* (LCR) bezeichnet.

### 1.1.2. Infektionszyklus und Funktionen früher HPV Proteine

Papillomviren sind hoch speziesspezifisch und infizieren teilungsaktive Basalzellen (*Stratum basale*) des Epithels. Die HPV-Infektion erfolgt wahrscheinlich durch Verletzungen (Mikroläsionen) der Epithelschicht oder durch direkten Kontakt mit exponierten Basalzellen (Transformationszone der Zervix). Die Adsorption der Viruspartikel kann durch Heparan Sulfat Proteoglykane erfolgen (Shafti-Keramat *et al.*, 2003). Als Rezeptor, der den Eintritt der Papillomviren in die Zelle vermittelt, wurde das  $\alpha_6$  Integrin beschrieben (Evander *et al.*, 1997). Nach Freisetzung der viralen DNA in die Zelle, gelangt diese in den Zellkern. Dort kann sie in geringer Kopienzahl als Episom vorliegen und in Vorläuferläsionen des Gebärmutterhalskrebses mehrere Jahrzehnte persistieren (Dürst *et al.*, 1985). Im Rahmen des Erneuerungsprozesses der Haut teilen sich die Zellen des *Stratum basale* vertikal zur Hautoberfläche, wonach es zur kontinuierlichen Differenzierung der Keratinozyten kommt, an die der Lebenszyklus von Papillomviren gebunden ist. Da Papillomviren für die DNA-Synthese auf zelluläre Proteine angewiesen sind (z.B. den DNA-Polymerase Komplex) aber die suprabasalen, differenzierenden Keratinozyten in der G<sub>1</sub>-Phase arretiert sind, werden die viralen Onkoproteine E6, E7 und eventuell auch E5 benötigt, um den Zellzyklusblock aufzuheben, und die Zellen in die S-Phase zu treiben (Übersicht Smola-Hess und Pfister, 2002).

#### 1.1.2.1. Das E6 Protein

Das E6 Protein mukosaler Hoch-Risiko Viren bindet und inaktiviert das Tumorsuppressorprotein p53 und fördert dessen Abbau. Es führt so zum Wegfall von Zellzyklus-Kontrollpunkten und verhindert die p53-induzierte Apoptose, was zu einer Deregulation des Zellzyklus und schließlich zur genomischen Instabilität führt (Livingstone *et al.*, 1992; Yin *et al.*, 1992). Dies

gilt nicht für jede Form der Apoptose. Eine hohe Expression von HPV16 E6 kann beispielsweise für den Tumor Nekrose Faktor (TNF)-vermittelten Zelltod sensibilisieren (Filippova *et al.*, 2005). Die TNF Signaltransduktion beinhaltet zwei Hauptgruppen von Effektormolekülen, die *death-domain* (DD)-Proteine interagieren mit der so genannten Todesdomäne der Rezeptoren, was zur Rekrutierung und Aktivierung von Caspase-Kaskaden und schließlich zur Apoptose der Zelle führt (Übersicht Debatin und Kramer, 2004). Die *TNF receptor associated factor* (TRAF)-Proteine vermitteln über das Adaptermolekül TRADD (*TNF receptor associated death domain protein*) und die Kinase RIP (*receptor interacting protein*) die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*), JNK (*Jun kinase*) oder MAPK (*mitogen activated protein kinase*) Kaskaden (Übersicht Liu, 2005). E6 reduziert die transkriptionelle Aktivität der NF- $\kappa$ B Untereinheit p65 im Zellkern und kann somit die NF- $\kappa$ B-vermittelte Expression von Apoptose-Schutz Molekülen verhindern (Spitkovsky *et al.*, 2002). Aber für das HPV16 E6 Protein wurde auch eine Bindung an den p55 TNF Rezeptor beschrieben, wodurch eine Interaktion zwischen Rezeptor und TRADD verhindert wird. E6 kann auch direkt an das Signalmolekül FADD (*Fas-associated death domain*) binden, dieses degradieren (Filippova *et al.*, 2002; Filippova *et al.*, 2004) und so die Zelle vor TNF-vermitteltem Zelltod schützen. HPV16 E6 kann also einerseits für TNF-vermittelten Zelltod sensibilisieren, gleichzeitig aber auch davor schützen. Das Schicksal der Zelle hängt dabei von der exprimierten E6 Menge ab (Filippova *et al.*, 2005).

Das E6 Protein spielt auch eine Rolle bei Sensibilisierung für Zytostatika-vermittelten Zelltod. Es wurde bereits beschrieben, dass eine hohe Expression von E6 in HPV18-positiven Zellen zu einer Sensibilisierung für chemotherapeutische Medikamente wie Cisplatin oder Etoposid führt, während diese Zellen resistenter für die Behandlung mit Doxorubicin und Gemcitabin wurden (Koivusalo *et al.*, 2005). Die Behandlung des Zervixkarzinoms beinhaltet, abhängig vom Schweregrad der Krankheit, chirurgische Eingriffe, Strahlentherapie und die Behandlung mit chemotherapeutischen Medikamenten, wie Cisplatin oder Carboplatin (Green *et al.*, 2001; Hänsgen *et al.*, 2002; Keys *et al.*, 1999; Morris *et al.*, 1999; Pearcey *et al.*, 2002; Peters *et al.*, 2000).

### 1.1.2.2. Das E7 Protein

Das E7 Protein mukosaler Hoch-Risiko Typen bindet im Gegensatz zu E6 an das Retinoblastoma Tumorsuppressorprotein (pRb), was zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F führt. E2F induziert die Expression von Genen, die die Zellproliferation regulieren. Weiterhin wurde eine Interaktion von E7 mit Mitgliedern der AP-1 (*activator protein 1*) Familie von Transkriptionsfaktoren beschrieben (Übersicht McCance, 2006). E7 ist in Basalzellen eines infizierten Epithels nur gering exprimiert, während in den differenzierten Zellen der oberen Schichten des Epithels eine erhöhte E7 Transkription beobachtet wird (Stoler *et al.*, 1989, 1992; Dürst *et al.*, 1992).

### 1.1.2.3. Späte virale Proteine und Virusfreisetzung

In den differenzierten Epithelzellen kommt es zur vegetativen Phase. Es wird eine große Anzahl von Virusgenomen produziert, die in Viruskapside verpackt werden. Die Kapsidproteine L1 und L2 werden in den oberen Zellschichten (*Stratum spinosum*) exprimiert, und im darüber liegenden *Stratum granulosum* erfolgt die Bildung der infektiösen Viruspartikel. Mit dem Absterben und der Abschuppung der Zellen des *Stratum corneum* kommt es schließlich zur Freisetzung der reifen Viruspartikel (Howley, 1996). Alle Papillomviren bleiben sehr lange außerhalb der Wirtszelle stabil und infektiös.

### 1.1.3. HPV-Infektion in Assoziation mit der Zervixkarzinogenese

Das Zervixkarzinom ist die weltweit zweithäufigste Krebserkrankung der Frau mit jährlich 500.000 Neuerkrankungen weltweit und verantwortlich für bis zu 200.000 Todesfälle pro Jahr (Smola-Hess und Pfister, 2006). Es entsteht aus prämaligen Läsionen, so genannten zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN), die ihrerseits ein Kontinuum verschiedener Schweregrade umfassen und eingeteilt werden in CIN I bis CIN III Läsionen. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass in über 99% aller CIN und Zervixkarzinome HPV DNA nachweisbar ist (Walboomers *et al.*, 1999; Munoz *et al.*, 2003). In leichtgradigen Läsionen liegt das Virusgenom episomal vor, und die Expression der viralen

Onkogene E6 und E7 wird durch zelluläre Faktoren, aber auch den viralen Transkriptionsfaktor E2 reguliert. Ein wichtiger Schritt in der HPV-assoziierten Karzinogenese ist die Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom (Cullen *et al.*, 1991). Sie erfolgt in der Regel innerhalb der E1/E2-Region des viralen Genoms. Als Folge der Integration und Zerstörung dieses viralen Genombereiches, kommt es zur Deregulation der E6 und E7 Expression (Baker *et al.*, 1987; Schwarz *et al.*, 1985). Durch die Ausschaltung der Tumorsuppressorproteine p53 und pRb interferieren E6 und E7 mit der DNA-Reparatur, die p53-vermittelte Apoptose wird gehemmt und Proliferation induziert (Hashida und Yasumoto, 1991). Es werden zudem Mechanismen aktiviert, die es erlauben, dem Immunsystem zu entkommen. Angiogenese wird induziert, schließlich kommt es zur Gewebeinvasion und Metastasierung (Hanahan und Weinberg, 2000). Auf diesem Weg entsteht ein verändertes Expressionsmuster von zellulären Proteinen wie Zytokinen, ihren Rezeptoren oder anderen Signalfaktoren. Der vaskuläre, endotheliale Wachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*) ist ein wichtiger Mediator der Angiogenese und Karzinogenese. Er wird im Verlauf der Erkrankung am stärksten in hochgradigen Vorläuferläsionen und im invasiven Zervixkarzinom exprimiert (Dobbs *et al.*, 1997; Guidi *et al.*, 1995). Ebenso wird der CD40 Rezeptor, ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie, im Verlauf der malignen Progression stärker exprimiert. Die Aktivierung des CD40 Rezeptors führt in nicht-malignen HPV-positiven Zellen zur Induktion des *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), einem Chemokin, das unter anderem Monozyten und Vorläuferzellen von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) in Epithelien anlocken kann. Trotz einer gesteigerten CD40 Expression in Karzinomzellen ist die MCP-1 Induktion jedoch im Vergleich zu nicht-tumorigenen Zellen signifikant niedriger (Altenburg *et al.*, 1999). In späten Stadien der malignen Progression kommt es auch zur gesteigerten Expression des Zytokins Interleukin-6 (IL-6) in invasiven Karzinomzellen *in situ* (Hess *et al.*, 2000; Srivani und Nagarajan, 2003). Eine erhöhte IL-6 Expression korreliert dabei mit einer schlechteren Prognose für den Krankheitsverlauf (Srivani und Nagarajan, 2003). Eine Vielzahl von (neu-) etablierten Zervixkarzinom-Zelllinien produzieren ebenfalls konstitutiv IL-6 *in vitro* (Eustace *et al.*, 1993; Hess *et al.*, 2000). Ähnlich wie die MCP-1 Expression wird der *transforming growth factor*  $\beta$

(TGF $\beta$ ) während der Progression von prämaligen zu malignen Stadien verstärkt exprimiert. TGF $\beta$  übermittelt anti-proliferative Signale in Keratinozyten, während HPV-positive Zervixkarzinomzellen resistent gegen diese Wachstumsinhibition sind und folglich die erhöhten TGF $\beta$  Mengen tolerieren können (Borger *et al.*, 2000; Braun *et al.*, 1990; Hasskarl *et al.*, 2000). Aus diesem Grund wird angenommen, dass Veränderungen der TGF $\beta$  Signaltransduktion während der Progression und in Zervixkarzinomzellen stattfinden müssen.

### 1.2. Interleukin-6

#### 1.2.1. Funktionen von Interleukin-6

IL-6 ist ein 23-28 kDa großes, pleiotropes Zytokin das auto-, para- oder endokrin auf seine Zielzellen wirken kann. Zu diesen Zielzellen gehören unter anderem Keratinozyten, Monozyten, dendritische Zellen, Makrophagen, endotheliale Zellen, T-Zellen, B-Zellen und Fibroblasten. IL-6 und andere Mitglieder der IL-6 Zytokinfamilie wie Oncostatin M (OSM) oder *leukemia inhibitory factor* (LIF) sind an der Regulation vieler zellulärer Prozesse wie der Differenzierung, Zellproliferation, Apoptose und generell an der Genexpression beteiligt (Übersicht Hirano, 1998; Kishimoto, 2005). IL-6 ist ein zentraler Aktivator der Akute-Phase-Reaktion und kann B-Zellantworten, wie Proliferation, Antikörper-Produktion und terminale Differenzierung fördern (Muraguchi *et al.*, 1988). Ebenso spielt IL-6 eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunantwort auf Infektionen und bei akuten Entzündungsprozessen. So wird im Laufe von bakteriellen und viralen Infektionen verstärkt IL-6 produziert (Sehgal *et al.*, 1988; Van Damme *et al.*, 1989). Die Expression des Zytokins IL-6 wird streng kontrolliert. In einigen Karzinomen, Lymphomen und anderen Tumoren, wie z.B. Zervix-, Blasen- und Nierenzellkarzinom, Kaposi Sarkom und Multiplem Myelom (Kawano *et al.*, 1988; Frassanito *et al.*, 2001; Miles *et al.*, 1990; Miki *et al.*, 1989; Okamoto *et al.*, 1997; Malejczyk *et al.*, 1991; Eustace *et al.*, 1993; Hess *et al.*, 2000) kommt es zur Deregulation und konstitutiven IL-6 Expression. IL-6 wurde lange Zeit als „pro-inflammatorisches“ Zytokin eingeordnet, es besitzt jedoch auch anti-inflammatorische und immunsuppressive Effekte auf Monozyten und Antigen-

präsentierende Zellen. So unterdrückt IL-6 beispielsweise in Monozyten die TNF $\alpha$  und IL-1 Produktion nach einem pro-inflammatorischen Stimulus wie Lipopolysaccharid (LPS) (Aderka *et al.*, 1989; Schindler *et al.*, 1990; Wadee *et al.*, 1993). Zusätzlich wurde in IL-6 *knock out* Mäusen eine stark erhöhte TNF $\alpha$  Produktion nach LPS Stimulierung beobachtet (Fattori *et al.*, 1994).

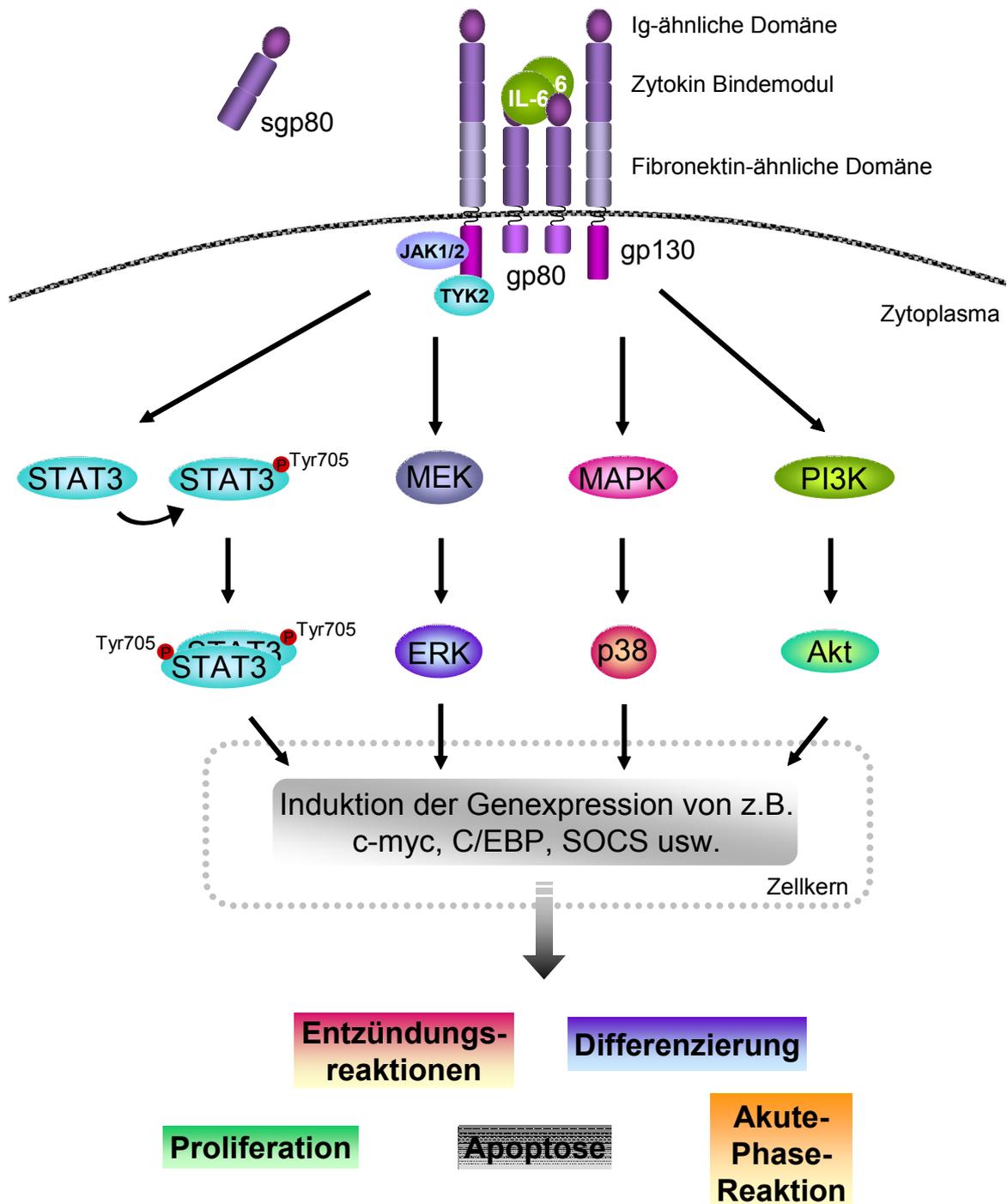
### 1.2.2. Signaltransduktionswege von Interleukin-6

IL-6 bindet an die  $\alpha$ -Kette des IL-6 Rezeptors (IL-6R $\alpha$ , gp80), der entweder als Transmembran-Molekül oder natürlicherweise auch als löslicher, bioaktiver Rezeptor (sgp80) vorkommt (Tamura *et al.*, 1993). Dieser binäre Komplex bindet an die Signal-transduzierende Kette gp130, die von allen IL-6 Familienmitgliedern genutzt wird, und induziert damit ihre Dimerisierung (Übersicht Kishimoto, 2005; Kamimura *et al.*, 2003; Heinrich *et al.*, 2003; Hirano, 1998) (Übersicht Abbildung 1). Während gp130 ubiquitär exprimiert wird, ist der limitierende Faktor der IL-6 Signaltransduktion die Expression des IL-6 Rezeptors gp80 bzw. sgp80. Die Dimerisierung von gp130 führt zu einer schnellen Aktivierung der Tyrosinkinase der Janus Kinase Familie (JAK) und in Folge dessen zur Phosphorylierung und Aktivierung der Transkriptionsfaktoren der STAT Familie (*signal transducers and activators of transcription*), im besonderen Maße STAT3 und weniger stark STAT1 (Taga *et al.*, 1989; Heinrich *et al.*, 1998). STAT3 bildet Homodimere oder zusammen mit STAT1 Heterodimere, die in den Zellkern gelangen und dort die Expression von spezifischen Genen induzieren (Darnell, 1997; Darnell *et al.*, 1994; Ihle, 1996; Ihle und Kerr, 1995; Hirano *et al.*, 1997). Die Aktivierung von STAT3 erfolgt insbesondere durch die Phosphorylierung des Tyrosinrestes 705 (Tyr705) wodurch die Translokation, DNA-Bindung und Aktivierung der Transkription eingeleitet wird (Bromberg *et al.*, 1999; Darnell *et al.*, 1994). Eine mögliche weitere Phosphorylierung an dem Serinrest 727 (Ser727) kann die transkriptionelle Aktivität von STAT3 verändern (Wen *et al.*, 1995; Sadowski *et al.*, 1993). In vielen Tumoren, wie beispielsweise dem multiplen Myelom, Lymphomen, Leukämien, Melanomen und Lungenkarzinomen, ist STAT3 konstitutiv aktiv und essentiell wichtig für das Überleben dieser Zellen (Übersicht Yu und Jove, 2004; Catlett-Falcone *et al.*, 1999), während

verschiedene HPV-positive Zervixkarzinom-Zelllinien nur eine sehr geringe, konstitutive STAT3 Aktivierung aufweisen (Hess *et al.*, 2000). In einigen Zelltypen führt IL-6 zur Aktivierung der MAPK Kaskaden wie z.B. p38 MAPK und ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*) oder zur Aktivierung des Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3 Kinase) und Akt Signalweges (Akira *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1999).

Es wurde angenommen, dass IL-6, ähnlich wie bei dem multiplen Myelom, als autokriner Wachstumsfaktor für Zervixkarzinom- und HPV-immortalisierte-Zellen fungiert (Eustace *et al.*, 1993). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Zellen des Zervixkarzinoms gp80 kaum oder gar nicht exprimieren und damit kaum auf IL-6 reagieren können (Bauknecht *et al.*, 1999; Hess *et al.*, 2000). Weiterführende Analysen zeigten, dass andere Komponenten der Signalkaskade intakt sind, da die Zellen nach der Zugabe von rekombinantem, löslichem sgp80 wieder auf IL-6 reagieren können (Hess *et al.*, 2000). Zervixkarzinom-Zelllinien, die einige Nanogramm IL-6 produzieren, reagieren dann sogar auf autokrin produziertes IL-6 mit einer starken STAT3 Aktivierung und gesteigerter MCP-1 Expression. Darüber hinaus führt IL-6 STAT3-vermittelt zur Aktivierung des, für die Expression von E6 und E7 verantwortlichen, frühen Promotors in der HPV18 Kontrollregion (Smola-Hess *et al.*, 2001). Da MCP-1 die Immunantwort durch das Anlocken von mononukleären Zellen verstärken kann, wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Verlust der gp80 Expression den Zervixkarzinomzellen helfen könnte, dem Immunsystem zu entkommen (Hess *et al.*, 2000).

STAT3 reguliert das Zell-Wachstum, die Differenzierung, das Überleben von Zellen und kann in verschiedenen Zelltypen zum Schutz vor Apoptose beitragen (Übersicht Calo *et al.*, 2003). Ein direktes Ziel für gp130-aktiviertes STAT3 ist das Proto-Onkogen c-myc (Kiuchi *et al.*, 1999). Das c-myc Genprodukt reguliert den Übergang von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase des Zellzyklus und wird als Antwort auf proliferative Signale, wie beispielsweise IL-6, induziert (Henriksson und Luscher, 1996). C-myc spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Eine gestörte Expression von c-myc ist an der Progression von verschiedenen Neoplasien ursächlich beteiligt (Eilers, 1999; Facchini und Penn, 1998; Nesbit *et al.*, 1999; Schmidt, 1999; Spencer und Groudine, 1991).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der intrazellulären gp130-vermittelten Signaltransduktion.** Die Formation des hexameren IL-6/gp80/gp130 Komplexes initiiert die Signaltransduktion durch die Aktivierung von JAK Kinasen. Es kommt zur Aktivierung der JAK/STAT, ERK MAPK, p38 MAPK und PI3 Kinase/Akt Kaskaden. Diese intrazellulären Signalwege sind eng miteinander verwoben und können sich gegenseitig beeinflussen. Sie führen schließlich zur Aktivierung oder Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren, die so Einfluss auf die Differenzierung, Proliferation oder Apoptose nehmen.

Eine Überexpression von c-myc kann Zellen für den TNF $\alpha$ -vermittelten Zelltod sensibilisieren (Janicke *et al.*, 1994; Klefstrom *et al.*, 1994). C-myc kann dabei die TNF $\alpha$ -induzierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B und Überlebens-Signale in der Zelle unterdrücken (Klefstrom *et al.*, 1997). In Maus-Fibroblasten, die Wildtyp p53 exprimieren, wird die TNF $\alpha$ -induzierte, c-myc-vermittelte Apoptose p53-abhängig induziert. Im Gegensatz dazu führen TNF $\alpha$  und c-myc in p53-defizienten Maus-Fibroblasten nur zu einer leichten Induktion von Apoptose (Hermeking und Eick, 1994; Klefstrom *et al.*, 1997). STAT3 Aktivierung kann damit auch zu pro-apoptotischen Signalen, wie dem Proto-Onkogen c-myc, führen.

Ein weiteres, direktes Ziel von STAT3 sind *suppressor of cytokine signalling* (SOCS) Gene (Auernhammer *et al.*, 1999). Einerseits werden Signalmoleküle durch Bindung an SOCS Proteine poly-ubiquitiniert und durch Proteasomen degradiert (Alexander, 2002), andererseits inhibieren SOCS Proteine die Signale von Zytokin-Rezeptoren wie beispielsweise LIF und IL-6 Rezeptor durch direkte Interaktionen mit JAK und stören deren katalytische Aktivität (Endo *et al.*, 1997; Naka *et al.*, 1997; Alexander *et al.*, 1999; Nicholson *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass IL-6 direkt zur Induktion der Expression von SOCS3, sowie SOCS1 und 2 führen kann (Starr *et al.*, 1997), während Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) die Expression von SOCS1 induziert (Sakamoto *et al.*, 1998). SOCS3 inhibiert spezifisch die IL-6-vermittelte STAT3 Aktivierung und führt damit zu einer klassischen „negativen Rückkopplung“. Untersuchungen an SOCS1-defizienten Mäusen zeigten nicht nur eine stark erhöhte Sensitivität für den LPS-induzierten Schock und eine gesteigerte Produktion von inflammatorischen Zytokinen sondern, nach Transfektion eines SOCS1 Konstruktes, auch eine deutliche Inhibition der LPS-induzierten NF- $\kappa$ B Aktivität in Makrophagen SOCS1-defizienter Mäuse (Nakagawa *et al.*, 2002; Kinjyo *et al.*, 2002). SOCS1 ist demnach ein essentieller negativer Regulator der Immunantwort auf LPS, der vor gefährlichen Überreaktionen auf den inflammatorischen Stimulus schützt.

### 1.3. Dendritische Zellen

#### 1.3.1. Ursprung, Charakterisierung und Entwicklung von dendritischen Zellen

Dendritische Zellen (DC) sind äußerst potente, Antigen-präsentierende Zellen des Immunsystems (Steinman, 1991) und nehmen eine Sonderstellung als Mittler zwischen angeborener und adaptiver Immunität ein. Sie entstammen den pluripotenten CD34<sup>+</sup> Stammzellen des Knochenmarks (Hart, 1997) und exprimieren in hohem Maß MHC I und MHC II Moleküle sowie kostimulatorische Signalmoleküle. Ihre Aufgabe ist es, unterschiedliche Antigene wie z.B. Viren, Bakterien, Antigen-Antikörperkomplexe, apoptotische und nekrotische Zellen aus ihrer Umgebung aufzunehmen und diese naiven T-Zellen zu präsentieren (Banchereau und Steinman, 1998).

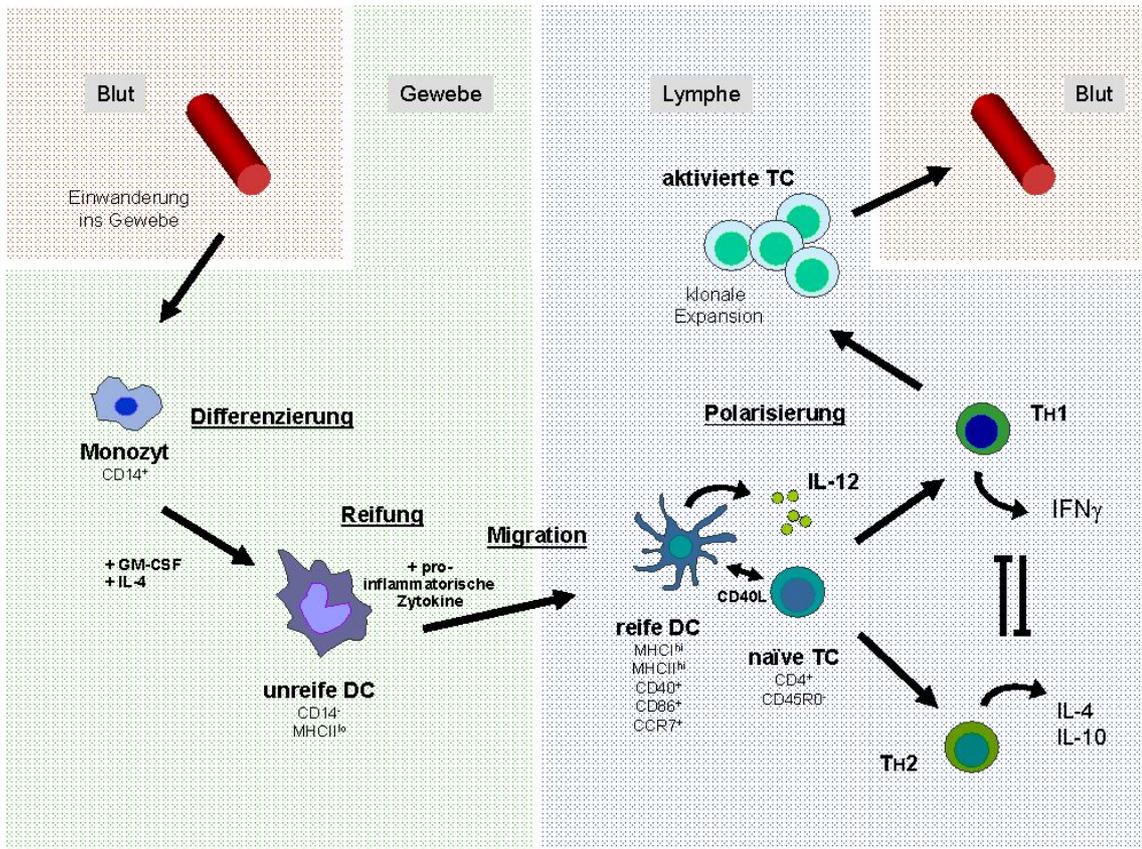
DC können aus myeloiden und lymphoiden Vorläuferzellen und aus humanen peripheren Blutmonozyten differenzieren. Im menschlichen Blut werden zwei Subpopulationen von DC unterschieden: die CD11c<sup>+</sup>CD123<sup>lo</sup> DC haben eine monozytäre Morphologie und werden als myeloide DC bezeichnet, während CD11c<sup>-</sup>CD123<sup>hi</sup> plasmazytäre DC eine morphologische Ähnlichkeit mit Plasmazellen besitzen (Übersicht Adams *et al.*, 2005). Die myeloiden DC stammen von einer kleinen Fraktion CD34<sup>+</sup> hämatopoetischer Vorläuferzellen des Knochenmarks und des Blutes ab. *In vitro* stimulieren *granulocyte macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) und TNF $\alpha$  das Wachstum und die Differenzierung dieser Vorläuferzellen in potente DC (Caux *et al.*, 1992, 1994, 1995). Die myeloiden DC umfassen zwei Subpopulationen: zum einen inflammatorische DC, die große Mengen an TNF $\alpha$  produzieren, und zum anderen die im Gewebe lokalisierten myeloiden DC, die wiederum in zwei Untergruppen eingeteilt werden: 1. Langerhans Zellen, die sich in der Epidermis, vor allem im *Stratum spinosum* der Haut und Schleimhaut befinden und 2. interstitielle DC. Diese exprimieren CD14 und sind bipotent, d.h. sie können sich unter Einfluss von GM-CSF und TNF $\alpha$  in CD1a<sup>+</sup> DC oder unter dem Einfluss von M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) in CD14<sup>+</sup> Makrophagen entwickeln. DC können *in vitro* auch aus CD14<sup>+</sup> humanen peripheren Blutmonozyten entstehen. Die Entwicklung unreifer DC wird durch

GM-CSF und IL-4 gefördert (Romani *et al.*, 1994; Sallusto und Lanzavecchia, 1994). Dabei steigert GM-CSF die CD1a Expression, wohingegen IL-4 die CD14 Expression runterreguliert. Hierdurch wird wahrscheinlich das Makrophagen-Differenzierungspotential der DC-Vorläuferzellen supprimiert (Jansen *et al.*, 1989). Diese unreifen DC können durch inflammatorische Stimuli, wie bakterielles LPS, TNF $\alpha$  oder IL-1, zur terminalen Differenzierung induziert werden (Sallusto und Lanzavecchia, 1994; Romani *et al.*, 1996). Die Blutmonozyten repräsentieren wahrscheinlich eine Quelle an Vorläuferzellen, die sich in Abhängigkeit vom externen Zytokinmilieu in DC oder Makrophagen entwickeln können.

### **1.3.2. Lebenszyklus von dendritischen Zellen**

Der Lebenszyklus von dendritischen Zellen kann grob in fünf Abschnitte gegliedert werden (Übersicht Abbildung 2): 1.) Entwicklung und Einwanderung ins Gewebe, 2.) Antigen Aufnahme und Prozessierung, 3.) Aktivierung und Reifung, 4.) gerichtete Migration ins lymphatische Gewebe und 5.) Antigen Präsentation und schließlich T-Zell-Aktivierung (Übersicht Cella *et al.*, 1997; Bell *et al.*, 1999; Adams *et al.*, 2005).

In unreifem Zustand verlassen DC über den Blutstrom das Knochenmark und siedeln sich in peripheren Geweben an, wo sie effizient Antigene aus ihrer Umgebung aufnehmen können. Dazu nutzen sie verschiedene Mechanismen: Mikro- oder Makropinozytose sowie rezeptorvermittelte Endozytose oder Phagozytose (Übersicht Guermonprez *et al.*, 2002). DC spalten Antigene in kurze Peptide und präsentieren diese über MHC I und MHC II Moleküle auf der Zelloberfläche. Reifungssignale für DC entstehen einerseits durch inflammatorische Moleküle, wie CD40 Ligand, TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 und IFN $\alpha$  sowie durch mikrobielle Bestandteile (z.B. LPS) oder Moleküle aus zerstörtem Gewebe, die wie LPS *Toll like* Rezeptoren (TLR) aktivieren können. TLR induzieren sowohl die Reifung, als auch die Migration unreifer DC, die daraufhin über die afferente Lymphe in die T-Zell-Areale der lymphoiden Organe wandern (Übersicht Adams *et al.*, 2005).



**Abbildung 2: Lebenszyklus von dendritischen Zellen.** Zirkulierende Vorläufer-Monozyten dringen als unreife DC in das Gewebe ein, wo sie verschiedene Antigene aufnehmen können. Mit Antigen beladene unreife DC verlassen schließlich das Gewebe und migrieren in die lymphatischen Organe, wo sie nach der Reifung mit Hilfe von Peptid-beladenen MHC Molekülen T-Zellen aktivieren können. Diese reaktiven Zellen werden zur Proliferation angeregt, es kommt zur klonalen Expansion und die Antigen-spezifischen T-Zellen verlassen die lymphoiden Organe um über den Blutstrom in das infizierte Gewebe einzuwandern.

Die migratorische Kapazität wird zum einen durch chemotaktische Faktoren reguliert, die vom Zielgewebe freigesetzt werden, zum anderen durch die Modulation der Oberflächen-Adhäsionsmoleküle der DC (Sozzani *et al.*, 1998; Sallusto *et al.*, 1998). Unreife DC exprimieren unter anderem die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2, CCR5 und CCR6, die Rezeptoren für einige inflammatorische Chemokine, wie z.B. MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-3 $\alpha$  (*macrophage inflammatory protein*) und RANTES (*regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted*) darstellen. Diese Chemokinrezeptoren werden nach Induktion der Reifung herunterreguliert, so dass die DC das Entzündungsgewebe verlassen können. Gleichzeitig kommt es zur Expression des Chemokin-, oder Lymphknoten *homing* Rezeptors CCR7 (Yoshida *et al.*, 1997), der mit Hilfe von Gradienten der Chemokine ELC und SLC die Migration der DC in Richtung des lymphatischen Gewebes vermittelt (Chan *et al.*, 1999).

Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B und p38 MAPK reguliert (Hinz *et al.*, 2002, Hegde *et al.*, 2004; Ardeshtna *et al.*, 2002). Während der Migration erfolgt die Reifung der DC. Dies geht mit phänotypischen und funktionellen Veränderungen einher. Reife DC vergrößern ihre Oberfläche durch die Ausbildung von so genannten Dendriten oder Lamellipoden, wodurch sie eine größere Motilität erreichen (Bell *et al.*, 1999). Sie weisen eine erhöhte Expression von MHC I und MHC II Molekülen, kostimulatorischen Molekülen wie CD80, CD86 und Adhäsionsmolekülen wie CD58 und CD54 auf. Dadurch werden DC zu potenten Antigen-präsentierenden Zellen und sind als einzige Zellen in der Lage, naive T-Zellen zu aktivieren und auf diesem Weg die adaptive Immunantwort auszulösen. Die endozytotischen Aktivitäten dagegen nehmen deutlich ab (Sallusto *et al.*, 1995).

### **1.3.3. Interaktion der dendritischen Zellen und T-Lymphozyten**

Die Reifung der DC führt zur Einwanderung von DC in die T-Zell-Areale der sekundären lymphatischen Organe. Durch die Fähigkeit, endogene Proteine mittels MHC I Molekülen und exogene Proteine über MHC II Moleküle zu präsentieren, kommt es sowohl zur Aktivierung von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen als auch CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen. DC können außerdem exogene Antigene von endozytotischen Kompartimenten ins Zytosol exportieren. Dieser Transportweg ist auf DC beschränkt und spezifisch für internalisierte Proteine. Die Existenz dieses Membran-Transportweges zeigt die Möglichkeit der DC auf, internalisierte Antigene auch über MHC I Moleküle zu präsentieren (Rodriguez *et al.*, 1999), was auch als „crosspriming“ bezeichnet wird. In den Lymphknoten bilden die DC über verschiedene Adhäsionsmoleküle, im Besonderen über CD58 und CD54, die verstärkt von reifen DC exprimiert werden, Aggregate mit T-Zellen. Echtzeit-Beobachtungen konnten dabei eine Interaktion von murinen DC mit bis zu 500 T-Zellen pro Stunde zeigen, wobei bis zu zehn T-Zellen gleichzeitig in Kontakt mit einer einzigen DC waren (Fujimoto *et al.*, 2002; Stoll *et al.*, 2002; Bousso und Robey, 2003). Die Interaktion der DC mit den T-Zellen wird durch die spezifische Bindung des T-Zellrezeptors an den MHC-Peptid-Komplex stabilisiert, welche das erste Signal für die Aktivierung der T-Zellen darstellt. Ein zweites kostimulatorisches Signal ist unbedingt erforderlich, um die T-Zell-Proliferation zu ermöglichen. Dieses Signal wird

durch die Interaktion von CD80 und CD86, die beide von DC exprimiert werden, mit CD28 auf T-Zellen übermittelt (Übersicht Guermonprez *et al.*, 2002). Hierbei scheint die Stimulation der DC über CD40-CD40L Interaktionen für die Aufrechterhaltung der T-Zell-vermittelten Immunantwort von besonderer Bedeutung zu sein (Caux *et al.*, 1994; Cella *et al.*, 1996; Sallusto und Lanzavecchia, 1994). CD4<sup>+</sup> T-Zellen können nach Aktivierung in zwei Typen von Effektorzellen differenzieren: T-Helferzellen des Typs 1 (T<sub>H1</sub>) oder des Typs 2 (T<sub>H2</sub>). Durch die Freisetzung der Zytokine IFN $\gamma$ , IL-2 und TNF $\beta$  unterstützen T<sub>H1</sub>-Zellen die zelluläre Immunabwehr, wohingegen T<sub>H2</sub>-Zellen IL-4, IL-5 und IL-10 sezernieren und damit die humorale Immunantwort verstärken. Die Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen hängt unter anderem von der Zytokinumgebung der Zellen ab, wobei IL-12 und IFN $\gamma$  die Entwicklung hin zu T<sub>H1</sub>-Zellen und IL-4 die Entwicklung hin zu T<sub>H2</sub>-Zellen fördern. Durch die Interaktion von CD40-CD40L kommt es zu einer gesteigerten Produktion und Freisetzung von IL-12 durch die DC, welches entscheidend zur Entwicklung einer T<sub>H1</sub>-Immunantwort beiträgt (Murphy und Reiner, 2002). Weitere Zytokine können die Sekretion von IL-12 ebenfalls verändern: das Zytokin IFN $\gamma$  induziert die IL-12 Produktion (Hayes *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 1996), während IL-10 diese reprimieren kann (Aste-Amezaga *et al.*, 1998; D'Andrea *et al.*, 1993). Das Chemokin MCP-1 supprimiert ebenfalls die IL-12 Produktion von monozytären DC und dieser Effekt ist unabhängig von IL-10 (Braun *et al.*, 2000; Omata *et al.*, 2002). Die Expression von SOCS Proteinen entscheidet auch in immunkompetenten Zellen über Funktion und Differenzierung. So führt IL-6 in CD4<sup>+</sup>, LPS-aktivierten T-Zellen zur gesteigerten Expression von SOCS1 und damit zu einer gestörten Phosphorylierung von IFN $\gamma$ -induziertem STAT1. Hierdurch wird die Differenzierung der Zellen in Richtung T<sub>H1</sub> inhibiert. Daneben unterstützt IL-6 direkt die T<sub>H2</sub>-Differenzierung von T-Helferzellen (Lotz *et al.*, 1988; Uyttenhove *et al.*, 1988; Diehl *et al.*, 2000). In SOCS3-defizienten Makrophagen verändert IL-6 seine Wirkung. Es gewinnt immunsuppressive Qualitäten die sonst nur bei IL-10 zu beobachten sind. So unterdrücken beide Zytokine, IL-6 und IL-10, in SOCS3-defizienten Makrophagen die LPS-induzierte TNF $\alpha$  und IL-12 Produktion (Yasukawa *et al.*, 2003).

## 1.4. Interleukin-12

### 1.4.1. Funktionen von Interleukin-12

IL-12 wurde zuerst als ein Protein identifiziert, das in der Lage ist, natürliche Killer Zellen (NK Zellen) zu aktivieren, Lymphokin-aktivierte Killer Zellen (LAK Zellen) zu generieren und die  $\text{IFN}\gamma$  Produktion und T-Zell-Proliferation zu induzieren (Kobayashi *et al.*, 1989; Stern *et al.*, 1990). Es ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, das eine wichtige Verbindung zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunität gegen Pathogene und das maligne Wachstum darstellt. IL-12 verstärkt, teilweise durch die Induktion von  $\text{IFN}\gamma$ , das phagozytische und anti-bakterielle Potential von Phagozyten und ihre Fähigkeit zur Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie GM-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  und IL-12 (Nagayama *et al.*, 2000). Es begünstigt zudem die Differenzierung und Funktion von T<sub>H</sub>1-Zellen, die wiederum die Zell-vermittelte Immunität, die Bildung von zytotoxischen T-Zellen, die Induktion von opsonierenden Antikörpern und die Aktivierung von phagozytotischen Zellen unterstützen (Hsieh *et al.*, 1993; Manetti *et al.*, 1993). Das bioaktive, heterodimere IL-12 Molekül (p70) besteht aus der leichten Kette p35 (35kDa) oder IL-12 $\alpha$  und der schweren Kette p40 (40kDa) oder IL-12 $\beta$  (Kobayashi *et al.*, 1989). Die Gene der p35 und p40 Untereinheiten sind nicht miteinander verwandt und auf zwei unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert. Die Expression der Untereinheiten muss jedoch zeitgleich stattfinden, um ein bioaktives IL-12 p70 Molekül zu bilden (Gately *et al.*, 1998; Trinchieri, 1998). Während IL-12 p40 in Abwesenheit von p35 als Monomer oder Homodimer sezerniert wird, kann p35 nur in Verbindung mit p40 als heterodimeres p70 Molekül sezerniert werden (Wolf *et al.*, 1991). In vielen Zelltypen konnte p35 mRNA nachgewiesen werden, darunter auch in Lymphozyten, die jedoch kein IL-12 produzieren. p40 mRNA findet sich hingegen nur in Zellen, die auch biologisch aktives IL-12 p70 produzieren (D'Andrea *et al.*, 1992). Ähnlich wie bei anderen pro-inflammatorischen Zytokinen ist die Produktion von IL-12 durch positive und negative Mechanismen streng reguliert. Produkte verschiedener Mikroorganismen, wie Bakterien, intrazelluläre Parasiten, Pilze, doppelsträngige RNA, bakterielle DNA und CpG-Motive in Oligonukleotiden, sind starke

Induktoren der IL-12 Produktion in Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen und DC (Ma und Trinchieri, 2001). Bestandteile der Bakterienzellwand sind strukturell stark konserviert. Diese unveränderlichen, mikrobiellen Komponenten gehören zu den gut charakterisierten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP). Die Bindung von PAMP an so genannte *pattern recognition receptors* (PRR), wie beispielsweise TLR auf Antigen-präsentierenden Zellen, führt zur Aktivierung der APC. Am besten untersucht ist in diesem Zusammenhang der LPS-induzierte TLR Signalweg. Die Interaktion von LPS mit TLR4 löst eine Signalkaskade aus, die über das Adaptermolekül MyD88 und unter anderem das Signalübertragungs-Molekül TRAF6 zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B und p38 MAPK führt (Medzhitov, 2001). Verschiedene Zytokine, wie IFN $\gamma$  und IL-4, können die Produktion von IL-12 steigern (Hayes *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 1996). Dabei verstärkt IFN $\gamma$  die Transkription der p35 und p40 Untereinheiten und hat einen besonderen Einfluss auf die Produktion des Heterodimers. Es bleibt zu klären, ob dies über ein optimales p40/p35 Verhältnis oder über post-transkriptionelle Mechanismen erfolgt (Ma *et al.*, 1996). Die Fähigkeit von IFN $\gamma$ , die IL-12 Produktion zu steigern, bildet damit einen positiven *feedback* Mechanismus bei entzündlichen und T<sub>H</sub>1-vermittelten Immunantworten. T-Zellen verstärken die IL-12 Produktion nicht nur durch die Produktion von Zytokinen wie IFN $\gamma$  oder IL-4, sondern auch durch direkte Zell-Zell-Kontakte, größtenteils vermittelt durch die Liganden der TNF Familie. Am besten beschrieben wurde die Interaktion von CD40L auf aktivierten T-Zellen mit CD40 auf DC oder Makrophagen (Macatonia *et al.*, 1995; Kennedy *et al.*, 1996). Durch einen bakteriellen Stimulus (z.B. LPS) kommt es zur Hochregulation der CD40 Expression in DC, eine Voraussetzung für die optimale IL-12 Produktion (Schulz *et al.*, 2000). Die T-Zell-abhängige IL-12 Produktion durch DC resultiert aus zwei Signalen: CD40L und IFN $\gamma$ . Es wird angenommen, dass zu Beginn der Immunantwort, DC, die ein Antigen aufgenommen haben und in die T-Zell-Areale von regionalen Lymphknoten migriert sind, eine große Menge an IL-12 produzieren. Ausgelöst durch die CD40-CD40L Interaktionen mit naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen führt dies wahrscheinlich zu einer T<sub>H</sub>1-Polarisierung der T-Zellen. Abgesehen von einigen wenigen Ausnahmen wurde bei Patientinnen mit einer schweren HPV Infektion und der Entwicklung eines Zervixkarzinoms ein Wechsel von T<sub>H</sub>1 nach T<sub>H</sub>2 Zytokinen

nicht nur im Gewebe sondern auch im Blutplasma beschrieben (Clerici *et al.*, 1997; Clerici *et al.*, 1998). Bais *et al.* konnten zeigen, dass die Plasmakonzentrationen von IFN $\gamma$  bereits bei Patientinnen mit CIN III Läsionen signifikant niedriger waren als bei Patientinnen mit CIN II Läsionen oder Kontrollpersonen. Im Gegensatz dazu wurden gesteigerte IL-10 Mengen im Plasma von Patientinnen mit CIN III Läsionen oder Karzinomen gefunden (Bais *et al.*, 2005). Dies passt zu den Beobachtungen von Jacobs *et al.*, die den Wechsel zur T<sub>H</sub>2-typischen Aktivität anhand des Verhältnisses von IL-12:IL-10 charakterisiert haben. Patientinnen mit CIN III Läsionen zeigten eine Abnahme im IL-12:IL-10 Verhältnis gegenüber Kontrollpersonen (Jacobs *et al.*, 1998). In Biopsien von invasiven Karzinomen wurden weniger IL-12 und IFN $\gamma$  mRNA Transkripte gefunden als in prämaligen Läsionen, was zu der beschriebenen gestörten T<sub>H</sub>1 Antwort beitragen könnte (de Gruijl *et al.*, 1999).

### 1.4.2. Molekulare Regulation von Interleukin-12

Die hochgradig koordinierte zeitliche und örtliche Expression von IL-12 p40 und p35 in ein und derselben Zelle ist essentiell für die Initiierung einer effektiven Immunantwort. Der p40 Promotor ist bereits gut charakterisiert. Durch die Bindung von LPS an TLR4 auf DC kommt es zu einer Umgestaltung von Nukleosom 1, wodurch der Transkriptionsfaktor C/EBP (*CAAT enhancer-binding protein*) die Möglichkeit erhält, an diese Region zu binden. Die Umgestaltung allein führt noch nicht zur Transkription des p40 Gens (Weinmann *et al.*, 2001). Es gibt zwei entscheidende cis-Elemente, die an der Regulation von p40 beteiligt sind: eine ETS-2 und eine NF- $\kappa$ B Bindestelle. Ein Komplex bestehend aus den ETS Transkriptionsfaktoren ETS-2 und PU.1, c-Rel, den Interferon regulierenden Faktoren IRF-1 und IRF-2 und *interferon consensus sequence binding protein* (ICSBP) bindet an die ETS-2 Bindestelle des p40 Promotors (Gri *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 1997; Salkowski *et al.*, 1999). An die NF- $\kappa$ B Bindestelle bindet, durch LPS induziert, ein Heterodimer aus p50 und c-Rel (Murphy *et al.*, 1995; Plevy *et al.*, 1997). NF- $\kappa$ B ist ein ubiquitärer Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle bei der Regulation entzündlicher Prozesse spielt. Unter den Mitgliedern der NF- $\kappa$ B Familie von Transkriptionsfaktoren scheint c-Rel besonders wichtig für die positive

Regulation des p40 Gens zu sein. Die IL-12 Produktion ist auch abhängig von der Aktivierung des Transkriptionsfaktors p38 MAPK, da MKK3 (ein p38 Aktivator) *knock-out* Mäuse kein IL-12 produzieren können (Lu *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu diesen positiven regulatorischen Elementen wurden auch einige negative Regulatoren beschrieben: die Repressor-Bindestelle GA12 (*GATA sequence in the IL-12 promoter*) wurde zwischen den oben beschriebenen ETS-2 und NF- $\kappa$ B Bindestellen gefunden. In nicht-stimulierten Zellen wird diese Bindestelle von GAP12 (*GA12 binding protein*) besetzt. Obwohl IL-10 den wahrscheinlich potentesten IL-12 Inhibitor darstellt, konnten Transfektions-Analysen des p40 Promotors diese IL-10 Aktivität nicht reproduzieren (Aste-Amezaga *et al.*, 1998). Untersuchungen des p35 Gens waren aufgrund der ubiquitären und zugleich niedrigen Expression schwierig, bis der Einfluss von IFN $\gamma$  auf die Genexpression bekannt wurde (Hayes *et al.*, 1995). Die Promotor Region des p35 Gens wurde bereits kloniert (Hayes *et al.*, 1998). Diese enthält mögliche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren wie SP1, IFN $\gamma$ -response element ( $\gamma$ -IRE), PU.1 und C/EBP. Für das humane p35 Gen sind mindestens zwei Startstellen für die Transkription beschrieben, eine ist in B-Lymphozyten aktiv, die andere in Monozyten (Hayes *et al.*, 1998). Letztere enthält eine TATA-Box-ähnliche Sequenz und liefert eine verkürzte mRNA. Nur die mRNA Isoformen, die sich in Folge einer Stimulation bilden, führen zur Translation der p35 Untereinheit. Die Expression von p35 wird also sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationaler Ebene reguliert (Babik *et al.*, 1999). Die Tatsache, dass es multiple Initiationsstellen für die Transkription gibt, deutet zudem auf eine unterschiedliche, Zelltyp-abhängige Aktivität des p35 Promotors hin.

### **1.5. Regulation der T-Helferzell-Proliferation**

Ein effektives *priming* von naiven T-Zellen führt zur klonalen Expansion und Differenzierung in Zytokin-sezernierende Effektor- und Gedächtniszellen. Die Stimulierung von T-Zellen durch reife DC wird für das längerfristige Überleben der T-Zellen benötigt. Wie bereits erwähnt beeinflusst das Zytokin-Expressionsmuster der DC die Richtung der T<sub>H</sub> Polarisierung in T<sub>H</sub>1 oder T<sub>H</sub>2. Das Zytokinprofil hängt von dem Subtyp der DC, dem lokalen Milieu, der anatomischen Lokalisierung und dem Reifungsstimulus ab (Dzionek *et al.*,

2001). Diese Faktoren kontrollieren auch andere Aspekte der T-Zell Antwort wie z.B. die Induktion von Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen und T-Zell *homing* (Hoebe *et al.*, 2003; Mora *et al.*, 2003). Die Antigen-Präsentation von unreifen DC *in vivo* wird als ein wichtiger Weg für die Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen beschrieben. Dies geschieht durch die Induktion einer unvollkommenen Proliferation und Anergie von Antigen-reaktiven T-Zellen und durch die Induktion von immunsuppressiven, regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) (Fujii *et al.*, 2003).  $T_{reg}$ -Zellen exprimieren konstitutiv CD25, CTLA-4 und den Transkriptionsfaktor Foxp3. CTLA-4 (zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Antigen 4) gehört zur CD28-Familie der T-Zell-Oberflächenmoleküle und wird erst nach Aktivierung der T-Lymphozyten exprimiert. Es hat eine essentielle inhibitorische Funktion in der Homöostase des Immunsystems.  $CD25^+CD4^+$   $T_{reg}$ -Zellen supprimieren Immunantworten durch die Sekretion von Zytokinen, wie IL-10 und TGF $\beta$ . Die Entfernung dieser Zell-Population in Mäusen führte zu exzessiven, inflammatorischen Antworten und Autoimmunität (Jonuleit und Schmitt, 2003; Sakaguchi, 2003). In *in vitro* Versuchen zeigte sich, dass aktivierte T-Zellen in einem humanen Tumormilieu vorwiegend die  $T_H2$  Zytokine IL-10 und TGF $\beta$  exprimieren (Sheu *et al.*, 2001). Zusätzlich dazu befinden sich im Tumorstroma von CIN II und CIN III Läsionen TGF $\beta$ -produzierende  $CD25^+CD4^+$   $T_{reg}$ -Zellen (Kobayashi *et al.*, 2004). Spezifische DC-Subtypen zeigen *in situ* tolerogene Wirkung. Eine Subpopulation der von Monozyten abstammenden DC exprimiert Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO). Dieses Enzym katalysiert den ersten, limitierenden Schritt des Tryptophan Katabolismus, die oxidative Degradation von Tryptophan durch den Kynurenin Weg (Grohmann *et al.*, 2003; Stone und Darlington, 2002). IDO steht unter der genetischen Kontrolle von bin-1, das in vielen malignen Tumoren herunterreguliert ist (Sakamuro *et al.*, 1996; Ge *et al.*, 1999; Ge *et al.*, 2000a; Ge *et al.*, 2000b; Tajiri *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 2004). Maus *knock-out*-Studien zeigten, dass der Verlust von bin-1 die STAT-1 und NF- $\kappa$ B-abhängige IDO Expression erhöht (Muller *et al.*, 2005). Die Untersuchung von IDO-exprimierenden Zellen in CIN II und III Läsionen und Zervixkarzinomen zeigte eine gesteigerte IDO Expression im Stroma von Zervixkarzinomen gegenüber den CIN Läsionen. Diese IDO-exprimierenden,  $CD1a^+$ , unreifen DC stellen also eine Fraktion von immunsuppressiven DC inmitten des Tumors dar (Kobayashi, 2005). IDO

Expression in DC wird z.B. durch die Bindung des kostimulatorischen Moleküls B7 auf DC mit CTLA-4 induziert (Fallarino *et al.*, 2003; Mellor *et al.*, 2004). Die Aktivität vonIDO ist assoziiert mit der Inhibition der T-Zell Proliferation und der Induktion von Apoptose von T-Zellen *in vitro* (Hwu *et al.*, 2000; Munn *et al.*, 2002) sowie der Reduktion der T-Zell Antworten *in vivo* (Munn *et al.*, 1998; Mellor *et al.*, 2002; Grohmann *et al.*, 2001a; Grohmann *et al.*, 2001b; Alexander *et al.*, 2002). Die Anwesenheit von IDO-produzierenden DC in tumornahen Lymphknoten könnte zur immunologischen Unempfindlichkeit bei Krebspatienten beitragen (Munn *et al.*, 2002; Munn *et al.*, 2004). Zervixkarzinomzellen (HeLa) in Kokultur mit peripheren Blut-Lymphozyten (PBL) können zudem die Proliferation der PBL inhibieren. Die Karzinomzellen zeigen eine gesteigerte IDO Expression als Antwort auf die IFN $\gamma$  Sekretion der PBL und vermitteln so eine anti-proliferative Wirkung auf diese Zellen (Logan *et al.*, 2002). IDO Aktivität kann also auf zwei Wegen, durch den Tumor oder das Immunsystem selbst, die Antitumor Immunantworten verändern und so zum *immune escape* beitragen.

### 1.6. Ziele dieser Arbeit

Tumorzellen haben unterschiedliche Strategien entwickelt, um dem Immunsystem zu entkommen. Kürzlich konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Zervixkarzinomzellen sehr große Mengen IL-6 exprimieren aber nur minimal auf dieses Zytokin reagieren, da der zugehörige Rezeptor gp80 von diesen Zellen nicht mehr exprimiert wird. Die Wiederherstellung des IL-6 Signalweges führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 und zur Produktion des Chemokins MCP1, was offenbar einen Nachteil für den Tumor darstellt (Hess *et al.*, 2000).

Gegenstand dieser Arbeit sollte die Untersuchung des wiederhergestellten IL-6 Signalwegs und der damit verbundenen Einflüsse auf die virale und zelluläre Genexpression sowie den TNF- bzw. den Zytostatika-vermittelten Zelltod sein. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob vom Tumor produzierte, lösliche Faktoren, wie IL-6, einen direkten Einfluss auf das Immunsystem und im Besonderen auf Antigen-präsentierende Zellen haben. In unserer Arbeitsgruppe konnten bereits erste Hinweise gesammelt werden, dass IL-6 zu einer starken Unterdrückung der Produktion des T<sub>H</sub>1 Zytokins IL-12 in dendritischen Zellen führte (Hegde, 2003). Die Mechanismen, wie IL-6 zur IL-12 Suppression führt und ob noch weitere wichtige Funktionen dendritischer Zellen durch IL-6 gestört werden, sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Eukaryontische Zellen und Zelllinien

BHK <sub>wt</sub>	Subklon einer parentalen BHK Zelllinie, etabliert aus Baby Hamster Nieren. ATCC-Nummer: CCL-10
BHK <sub>CD40L</sub>	BHK Zelllinie, die mit dem humanen CD40 Liganden (pEF BOS-CD40L cDNA) stabil transfiziert wurde (Hess <i>et al.</i> , 1995).
C-4 I	entstammt einem humanen Zervixkarzinom und enthält HPV18 DNA. ATCC-Nummer: CRL-1594
CaSki	humane, HPV16-positive Zervixkarzinom-Zelllinie. ATCC-Nummer: CRL-1550
Dendritische Zellen	mittels Ficoll-Gradienten, aus dem Blut gesunder Spender isolierte, humane Monozyten wurden für die angegebenen Zeiträume kultiviert und als DC bezeichnet ( <i>Buffy Coats</i> wurden freundlicherweise vom Institut für Transfusionsmedizin, Universität zu Köln, zur Verfügung gestellt).
HeLa	aus einem Adenokarzinom der Zervix isolierte, humane Zelllinie (Dubbs und Scherer, 1969) mit integriertem HPV18-Genom (Yee <i>et al.</i> , 1985). ATCC-Nummer: CCL-2
HPK1A	<i>in vitro</i> durch HPV16 immortalisierte, humane Vorhautkeratinozyten Zelllinie mit 2-3 integrierten HPV16 Genomen.
K51	<i>in vitro</i> HPV18-transformierte, humane immortalisierte Vorhautkeratinozyten Zelllinie (freundlicherweise von L. Laimins, Chicago, zur Verfügung gestellt).

T-Zellen	naïve T-Helferzellen aus peripherem Blut
SiHa	humane HPV16-positive Zervixkarzinom-Zelllinie. ATCC-Nummer: HTB-35
SW756	HPV18-positive Zellen eines undifferenzierten Plattenepithel-Karzinoms der humanen Zervix (Freedman <i>et al.</i> , 1982). ATCC-Nummer: CRL-10302

### 2.1.2. Medien und Reagenzien für die Zellkultur

Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) mit GlutaMAX™	Gibco Invitrogen Corporation, Karlsruhe
DMEM/F12 Nut Mix mit GlutaMAX™	Gibco Invitrogen Corporation, Karlsruhe
RPMI 1640 mit GlutaMAX™	Gibco Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FCS) für 30min bei 56°C hitzeinaktiviert	Cambrex, Verviers
1x Trypsin-EDTA Lösung	Gibco Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Natrium-Pyruvat-Lösung 100mM	Gibco Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin-Lösung 10.000 U/ml Penicillin 10.000 µg/ml Streptomycin	Gibco Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Dulbecco`s Phosphat-gepufferte Salzlösung	Gibco Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Geneticin (G418)	PAA, Cölbe
MEM 100x nicht-essentielle Aminosäuren 10mM Lösung	Gibco Invitrogen Corporation, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### Vollmedium für Monozyten und dendritische Zellen

RPMI Medium mit Zusatz von 10% (v/v) FCS, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 1mM Natrium-Pyruvat

### **Standardmedium**

DMEM mit Zusatz von 10% (v/v) FCS, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 1mM Natrium-Pyruvat

### **Standardmedium/Genitacin für BHK<sub>CD40L</sub> Zellen**

DMEM mit Zusatz von 10% (v/v) FCS, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 1mM Natrium-Pyruvat, 100µg/ml G418

### **Keratinozytenmedium für K51 Zellen**

DMEM und DMEM/F12 Nut Mix wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und folgende Zusätze hinzugefügt: 10% (v/v) FCS, 50µg/ml Gentamycin, 0,4µg/ml Hydrocortison, 10ng/ml Cholera toxin, 5µg/ml humanes Transferrin, 10ng/ml rekombinanter epidermaler Wachstumsfaktor,  $2 \times 10^{-11}$  M Triiodthyronin,  $1,8 \times 10^{-4}$  M Adenin, 5µg/ml Insulin

### **T-Zell-Medium**

RPMI Medium mit Zusatz von 10% (v/v) FCS, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 1mM Natrium-Pyruvat, 100µM nicht-essentielle Aminosäuren, 50µM β-Mercaptoethanol

### **Einfriermedium für eukaryontische Zellen**

10% (v/v) DMSO in FCS

### **Ablöse-Puffer**

5mM EDTA in PBS

### **Fixierungs-Lösung**

3% (v/v) Paraformaldehyd in PBS

### **Waschpuffer**

5% FCS und 2mM EDTA in PBS

## T-Zell-Waschpuffer

2% FCS in PBS

### 2.1.3. Materialien zur Zell-Isolierung

CD14 Mikroperlen	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
CD4 Mikroperlen	Dynal Invitrogen Corporation, Karlsruhe
CD45R0 Mikroperlen	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Ficoll Paque Plus	Amersham Biosciences, Freiburg
LS Säulen	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
MidiMACS	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
MPC <sup>®</sup> -E	Dynal Invitrogen Corporation, Karlsruhe

### 2.1.4. Zytokine

Zytokin	Quelle	Endkonzentration	Firma
humanes IFN $\gamma$	E.coli	10U/ml	PeptoTech, Rockyhill NJ
humanes IL-4	E.coli	5ng/ml	PeptoTech, Rockyhill NJ
humanes IL-6	E.coli	5, 25 oder 100ng/ml	PeptoTech, Rockyhill NJ
humanes OSM	E.coli	10ng/ml	PeptoTech, Rockyhill NJ
humanes TGF $\beta_1$	A293 Zellen	0,5 oder 5 ng/ml	PeptoTech, Rockyhill NJ
humanes TNF $\alpha$	E.coli	100 - 1000U/ml	Bender, Wien
Leukine <sup>®</sup> (rekombinates, humanes GM-CSF)	E.coli	100ng/ml	Berlex, Montville NJ

## 2.1.5. Antikörper

### 2.1.5.1. Antikörper für *Western Blots*

Antigen	mono-/polyklonal Klonbezeichnung	Spezies Isotyp	Firma
c-myc	monokl., 9E10	Maus IgG <sub>1</sub>	BD Biosciences, Heidelberg
Diphospho-ERK	monokl., MAPK-YT	Maus IgG <sub>1</sub>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ERK-2	monokl., D-2	Maus IgG <sub>2b</sub>	Santa Cruz, Santa Cruz CA
Esel anti-Ziege IgG-Peroxidase	polykl., 705-035-147	Ziege IgG	Dianova, Hamburg
HPV18E7	polykl., N-19	Ziege IgG	Santa Cruz, Santa Cruz CA
IDO	monokl., 10.1	Maus IgG <sub>3</sub>	Chemicon, Temecula CA
Phospho-STAT3 (Tyr705)	polykl., 9131	Kaninchen Ig	Cell Signaling, Beverly MA
STAT3	polykl., C-20	Kaninchen Ig	Santa Cruz, Santa Cruz CA
Ziege anti- Kaninchen IgG- Peroxidase	polykl., 111-035-047	Kaninchen Ig	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Maus IgG-Peroxidase	polykl., 115-035-072	Maus IgG	Dianova, Hamburg
β-Aktin	monokl., C4	Maus IgG <sub>1</sub>	Chemicon, Temecula CA
β-Tubulin	monokl., 5H1	Maus IgM	BD Biosciences, Heidelberg

### 2.1.5.2. Antikörper für Neutralisations-Experimente

Antigen	mono-/polyklonal Klonbezeichnung	Spezies Isotyp	Firma
IL-6	monokl., 6708	Maus IgG <sub>1</sub>	R&D Systems, South Beloit IL
Maus IgG <sub>1</sub>	polykl., 11711	Maus IgG <sub>1</sub>	R&D Systems, South Beloit IL

### 2.1.5.3. Antikörper für *Supershift*-Analysen

Antigen	mono-/polyklonal Klonbezeichnung	Spezies Isotyp	Firma
STAT1 p84/p91	polykl., E-23	Kaninchen IgG	Santa Cruz, Santa Cruz CA
STAT3	polykl., C-20	Kaninchen IgG	Santa Cruz, Santa Cruz CA
Kaninchen Ig	polykl. -	Kaninchen Ig	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### 2.1.5.4. Antikörper für Immunhistochemische Färbungen

Antigen	mono-/polyklonal Klonbezeichnung	Spezies Isotyp	Firma
Phospho-STAT3 (Tyr705)	polykl., 9131	Kaninchen Ig	Cell Signaling, Beverly MA

### 2.1.5.5. Antikörper für FACS-Analysen

Antigen	Klon	Spezies Isotyp	Konjugation	Firma
BrdU	559619	Maus IgG <sub>1</sub>	FITC	BD Biosciences, Heidelberg
CD3	OKT3 Hybridoma ATCC: CRL 8001	Maus IgG <sub>2a</sub>	unkonjugiert	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Maus IgG <sub>1κ</sub>	MOPC 21	Maus IgG <sub>1κ</sub>	unkonjugiert	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ziege anti- Maus Ig	550826	Maus Ig	APC	BD Biosciences, Heidelberg

### 2.1.5.6. Antikörper für ELISA

Antigen	mono-/polyklonal Klonbezeichnung	Spezies Isotyp	Firma
IL-6	monokl., MQ2-13A5	Ratte IgG <sub>1</sub>	BD Biosciences, Heidelberg
IL-6	polykl., 500-P26	Kaninchen IgG	Tebu-Bio, Offenbach
Ziege anti-Kaninchen IgG-Peroxidase	polykl., 111-035-047	Kaninchen IgG	Dianova, Hamburg

### 2.1.6. Plastikmaterialien

Plastikwaren wurden von den Firmen BD Biosciences (Heidelberg), Nunc (Wiesbaden), Greiner (Frickenhausen), Sarstedt (Nümbrecht), Eppendorf (Hamburg), Ritter (Schwabmünchen) und Renner GmbH (Dannstadt) bezogen.

### 2.1.7. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Laborchemikalien wurden von Amersham Biosciences (Freiburg), Applichem (Darmstadt), BioRad (München), ICN (Eschwege), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen und im Reinheitsgrad „reinst“ bzw. „p.a.“ eingesetzt.

### 2.1.8. Radioisotope

Die radioaktiv markierten Isotope [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP und [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP wurden von den Firmen Amersham Biosciences (Freiburg) und ICN (Eschwege) erworben.

### 2.1.9. Lösungen und Puffer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Puffer für molekularbiologische Experimente (z.B. TBE, TBS, PBS etc.) wurden soweit nicht anders angegeben nach Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1989) oder nach Ausubel *et al.* (Ausubel *et al.*, 1994) angesetzt.

#### **Zitratpuffer**

1,8mM Zitronensäure und 8,2mM Tri-Natriumzitrat-Dihydrat

#### **SDS-Probenpuffer**

62mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 0,1% Bromphenolblau, 50mM DTT und 2% Glycerin

#### **LSDB-Puffer für Ganzzellextrakte**

50mM Tris-HCl (pH 7.9), 500mM KCl, 1mM DTT, 0,1% NP-40 und 20% Glycerin.

#### **Puffer für Kernextrakte**

**Puffer A:** 10mM HEPES (pH7.9), 10mM KCl und 1,5mM MgCl<sub>2</sub>

**Puffer B:** 20mM HEPES (pH7.9), 420mM NaCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub> und 25% Glycerin

**Puffer C:** 20mM HEPES (pH7.9), 100mM KCl, 0,05mM EDTA (pH8.0) und 20% Glycerin

**Dignam-Protokoll:** Alle drei Puffer wurden vor Gebrauch mit folgenden Reagenzien versetzt: 2mM DTT, 1,26mg/L Aprotinin und 0,06mM PMSF. Nur Puffer B enthielt zusätzlich 0,2mM EDTA (pH8.0) und Puffer C 1% NP-40.

**Andrews-Protokoll:** Puffer A und Puffer B wurden vor Gebrauch mit 0,05mM DTT, 0,2mM PMSF und 1mM Ortho-Vanadat versetzt.

### **Puffer für Gelshift Analysen**

**TEN-Puffer:** 10mM Tris-HCl (pH7.5), 50mM NaCl und 1mM EDTA (pH8.0)

**NF-κB Bindepuffer:** 10mM Tris-HCl (pH7.5), 50mM NaCl, 11mM DTT, 1mM EDTA, 5% Glycerin, 1mg/ml BSA, 25µg/ml poly(dI-dC), 1,5mM PMSF, 0,5µg/ml ssDNA und 26µg/ml Aprotinin

**STAT Bindepuffer:** 10mM HEPES (pH7.8), 1mM EDTA (pH8.0), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10% Glycerin, 1mg/ml BSA, 50µg/ml poly(dI-dC), 2mM PMSF und 5mM DTT

#### **2.1.10. Oligonukleotide für EMSA**

NF-κB <i>sense</i>	5`-AGCTTCAGAGGGGACTTTCCGAGAGG-3`
NF-κB <i>antisense</i>	5`-TCGACCTCTCGGAAAGTCCCCTCTGA-3`
STAT3 <i>sense</i>	5`-GATCCGGGAGGGATTTACGGGAAAT-3`
STAT3 <i>antisense</i>	5`-TAGCATTTCCTCGTAAATCCCTCCCG-3`

#### **2.1.11. Northern Blot Sonden**

##### **IRF-1**

Das Plasmid HU\_p983C0697D2 (RZPD, Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung, Berlin) beinhaltet die kodierende Sequenz des humanen IRF-1 Gens im pT7T3D-Pacl Vektor, die über die Restriktionsstellen HindIII und XhoI ausgeschnitten und für *Northern Blot* Analysen verwendet wurde.

##### **SOCS1**

Das Plasmid IRAKp961J1182Q2 (RZPD, Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung, Berlin) beinhaltet die kodierende Sequenz des humanen SOCS1 Gens im pCMV-SPORT6 Vektor, die über die Restriktionsstellen EcoRI und HindIII ausgeschnitten und für *Northern Blot* Analysen verwendet wurde.

### **SOCS3**

Das Plasmid IMAGp998M238800Q3 (RZPD, Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung, Berlin) beinhaltet die kodierende Sequenz des humanen SOCS3 Gens im pT7T3D-Pacl Vektor, die über die Restriktionsstellen NcoI und HincII ausgeschnitten und für *Northern Blot* Analysen verwendet wurde.

#### **2.1.12. ELISA-Reagenziensysteme**

Alle kommerziellen Kits wurden laut Anweisungen der Hersteller durchgeführt. Das ELISA-Protokoll für IL-6 wurde im Labor etabliert und standardisiert.

Cell Proliferation ELISA, BrdU	Roche, Mannheim
DuoSet <sup>®</sup> : humanes IP-10	R&D Systems, South Beloit IL
OptEIA <sup>™</sup> Set: humanes Interleukin-10	BD Biosciences, Heidelberg
OptEIA <sup>™</sup> Set: humanes Interleukin-12 (p70)	BD Biosciences, Heidelberg
OptEIA <sup>™</sup> Set: humanes TGF $\beta_1$	BD Biosciences, Heidelberg
OptEIA <sup>™</sup> Set: humanes TNF $\alpha$	BD Biosciences, Heidelberg
Eli-pair IFN $\gamma$	Diaclone, Besancon

#### **2.1.13. Reagenziensysteme (Kits)**

AEC Substrate-Chromogen	DakoCytomation, Hamburg
BM Chemiluminescence Blotting Substrate	Roche, Mannheim
BrdU Flow Kit	BD Biosciences, Heidelberg
EnVision <sup>™</sup> /+HRP	DakoCytomation, Hamburg
Qiashredder Säulen	Qiagen, Hilden
Random Primers DNA Labeling System	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden

### 2.1.14. Sonstige Reagenzien

Aquatex®	Merck, Darmstadt
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cisplatin 50	Novartis, Nürnberg
Coomassie Blau R-250	BioRad, München
Eosin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Etoposid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ExpressHyb™ Hybridization Solution	BD Biosciences, Heidelberg
Lipopolysaccharid (LPS) aus <i>Salmonella typhimurium</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
löslicher IL-6 Rezeptor (sgp80)	R&D Systems, South Beloit IL
Mayers Hämatoxin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Neutralrot	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PD98059 Inhibitor	Merck, Darmstadt
Protein-Assay Reagenz	BioRad, München
TMB-Substrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### 2.1.15. Geräte

BioRad Geldokumentationsanlage inklusive QuantityONE Software	BioRad, München
Durchflußzytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Hera Cell CO <sub>2</sub> Inkubator	Heraeus Holding, Düsseldorf
LaminAIR HB 2448	Heraeus Holding, Düsseldorf
M35 X-OMAT Entwicklermaschine	Kodak, Stuttgart
Tecan Spectrophotometer	SLT Instruments, Crailsheim
Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg

*Hybond ECL* Nitrozellulosemembran der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) wurde für *Western Blots* und *S&S Nytran® SuPerCharge* Nylonmembran der Firma Schleicher und Schuell (Dassel) für *Northern Blots* verwendet.

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Zellkulturtechniken**

#### **2.2.1.1. Kultivierung eukaryontischer Zelllinien**

Zur Stammerhaltung eukaryonter Zellen wurde der konfluente Zellrasen einer Gewebekulturflasche zunächst zweimal mit PBS gewaschen und mit Trypsin bei 37°C abgelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe des entsprechenden Kultivierungs-Mediums abgestoppt und die Zellen je nach benötigter Dichte in neue Zellgefäße ausgesät. Kultiviert wurden die Zellen in einem Inkubator bei 37°C und 6%-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Für die Herstellung von Tumorzell-Überständen wurden die Zellen zu 1x10<sup>6</sup> Zellen/ml Standardmedium ausgesät, nach 24h das Medium durch Vollmedium ersetzt und weitere 24h später die Überstände gesammelt. Diese wurden für 10min bei 310xg und 4°C zentrifugiert, in frische Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C gelagert.

#### **2.2.1.2. Paraformaldehyd-Fixierung von BHK Zellen**

BHK<sub>wt</sub> Zellen wurden in Standardmedium kultiviert, BHK<sub>CD40L</sub> Zellen in Standardmedium/Geneticin. Sobald die Zellen zwischen 80% und 90% konfluent gewachsen waren, wurden sie mit Ablöse-Puffer abgelöst und für 6min bei Raumtemperatur (RT) in Fixierungs-Lösung aufgenommen. Im Anschluss wurden die Zellen einmal mit Standardmedium und sechsmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden gezählt und in Einfriermedium bei -80°C gelagert. Fixierte BHK<sub>CD40L</sub> Zellen wurden für IL-12 Versuche verwendet, PFA-fixierte BHK<sub>wt</sub> Zellen wurden als Negativ-Kontrolle eingesetzt.

#### **2.2.1.3. Separation von peripheren, mononukleären Zellen mittels Ficoll-Gradienten**

Je 10ml des *Buffy Coats* wurden mit PBS auf 40ml aufgefüllt. 13ml *Ficoll Paque* wurden mit dem Blut-PBS-Gemisch überschichtet, und für 20min bei 190xg zentrifugiert um einen Gradienten zu erzeugen. Die obersten 20ml des

verdünnten Plasmas wurden entfernt und für weitere 20min bei 350xg zentrifugiert. Der Ring aus peripheren, mononukleären Zellen des Blutes (PBMC) zwischen den zwei Phasen wurde vorsichtig abgenommen und gesammelt. Die PBMC wurden im Anschluss in 50ml PBS verdünnt, bei 250xg für 5min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift erfolgte insgesamt dreimal.

### **2.2.1.4. Magnetische Isolierung von Monozyten aus peripheren mononukleären Zellen des Blutes**

Die PBMC wurden in 1,6ml Waschpuffer aufgenommen und mit 200 $\mu$ l CD14 Mikroperlen vermischt. Die Zellsuspension wurde bei 4°C für 30min inkubiert und dabei einige Male durchmengt. Die Zellen wurden auf 50ml mit PBS aufgefüllt, wie oben beschrieben gewaschen, der Überstand verworfen und das Pellet in 4ml Waschpuffer aufgenommen. Die LS Säule wurde in einem MidiMACS fixiert und mit 5ml Waschpuffer gewaschen. Die Zellsuspension wurde dreimal auf die Säule gegeben, die haftenden Zellen mit 5ml Waschpuffer gewaschen, die Säule aus dem MidiMACS entfernt und schließlich CD14<sup>+</sup> Monozyten in 5ml Waschpuffer eluiert. Die Monozyten wurden zu 1x10<sup>6</sup> Zellen/ml Vollmedium aufgenommen und je nach Experiment mit verschiedenen Zytokinen oder Tumorzell-Überständen versetzt.

### **2.2.1.5. Herstellung dendritischer Zellen**

Alle generellen Methoden, die in den unterschiedlichen Experimenten angewendet wurden, werden nachfolgend beschrieben. Kleinere Abweichungen in Behandlung und Zeitpunkt der Zellernte sind in den Legenden der Abbildungen angegeben.

#### **2.2.1.5.1. Differenzierung**

Die gewonnenen Monozyten wurden für fünf bis acht Tage mit 100ng/ml GM-CSF und 5ng/ml IL-4 kultiviert. Parallel wurden einige Zellen mit 5, 25 bzw. 100ng/ml IL-6, 5 bzw. 0,5ng/ml TGF $\beta$  oder Vollmedium/Tumorzell-Überständen

im Verhältnis 1:1 bei  $1 \times 10^6$  Zellen/ml stimuliert. Alle zwei bis drei Tage wurden 500µl frisches Medium mit entsprechenden Zytokinen und Tumorzell-Überständen zugegeben.

#### **2.2.1.5.2. Reifung**

Nach sechs Tagen der Kultivierung wurden die Monozyten abhängig vom jeweiligen Experiment mit dem Reifungs-Stimulus LPS stimuliert. Vollmedium wurde als Negativ-Kontrolle verwendet. Nach den unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet oder für weitere Schritte in den Experimenten verwendet.

#### **2.2.1.6. Isolierung von naïven T-Helferzellen aus peripherem Blut**

Nach der Isolierung der  $CD14^+$  Monozyten, wurden die übrig gebliebenen PBMC zu  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in T-Zell-Waschpuffer aufgenommen und mit 25µl  $CD4$  Mikroperlen vermischt. Je 1ml der Zellsuspension wurde in Reaktionsgefäße überführt und bei  $4^\circ\text{C}$  für 20min unter Schütteln inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden in eine Magnetkammer MPC<sup>®</sup>-E eingesetzt, um für 2-3min die magnetische Bindung der mit Zellen besetzten Mikroperlen zu ermöglichen. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen in 1ml T-Zell-Waschpuffer resuspendiert und die Bindung wiederum für 2-3min ermöglicht. Dieser Waschschrift wurde insgesamt dreimal wiederholt. Schließlich wurden die Zellen zu  $1 \times 10^7$  Zellen/100µl in Vollmedium aufgenommen, mit 100µl/ml Ablöse-Perlen versetzt und für 45min bei RT geschüttelt. Die Reaktionsgefäße wurden erneut in die Magnetkammer eingesetzt und ein Anheften der nun freigesetzten Mikroperlen für 2-3min ermöglicht. Der Überstand mit den freigesetzten Zellen wurde gesammelt, die Ablöse-Perlen erneut mit 1ml Vollmedium gewaschen und der Überstand vereinigt, dies wurde insgesamt dreimal wiederholt. Der gesammelte Überstand samt Zellen wurde auf 10ml mit Vollmedium aufgefüllt, bei 250xg für 5min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die  $CD4^+$  T-Zellen wurden zu  $1 \times 10^6$  Zellen/ml T-Zell-Medium aufgenommen und für 5-7 Tage bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  kultiviert. Dabei wurde alle 2-3 Tage 250µl/ml frisches T-Zell-Medium

zugegeben. Zur Isolierung der naiven T-Zellen wurden die CD4<sup>+</sup> Zellen gesammelt, mit Waschpuffer auf 20ml aufgefüllt, wie oben beschrieben zentrifugiert und der Überstand verworfen.  $1 \times 10^7$  Zellen/80µl Waschpuffer wurden aufgenommen und 20µl CD45R0 Mikroperlen zugegeben, die Zellsuspension gut gemischt und für 15min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 10ml Waschpuffer wurden die Zellen zentrifugiert, das Pellet in 2ml Waschpuffer aufgenommen und auf eine vorbereitete LS Säule gegeben. Die Säule wurde zweimal mit jeweils 4ml Waschpuffer gewaschen und so die naiven, CD45R0<sup>-</sup> Zellen gesammelt.  $4,5 \times 10^5$  Zellen/ml Vollmedium wurden schließlich aufgenommen und zu jeweils 100µl in 96-Loch Rundbodenplatten für allogene, gemischte Lymphozyten-Kulturen ausgesät.

### 2.2.2. Zytotoxizitäts-Assay

Die verschiedenen Zelllinien wurden in 96-Loch Flachbodenplatten zu  $2,5 \times 10^4$  Zellen/Loch ausgesät und 24h später mit Medium, 10ng/ml OSM oder 100ng/ml IL-6 in An- und Abwesenheit von 500ng/ml sgp80 stimuliert. Nach 8h Inkubation bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub> wurden die Überstände verworfen und die Zellen mit einer 1:5 Verdünnungsreihe TNF $\alpha$  in Gegenwart von 50µg/ml Cycloheximid (CHX) stimuliert. Für die Kinetik-Analysen wurden HPK1A Zellen zu  $2 \times 10^4$  Zellen/Loch ausgesät, mit Medium, 10ng/ml OSM oder 100ng/ml IL-6 für die angegebenen Zeitintervalle vorstimuliert und mit TNF $\alpha$  und 50µg/ml CHX wie oben beschrieben versetzt. Das zelluläre Überleben wurde 16h später durch die Aufnahme von Neutralrot nach Finter *et al.* (Finter *et al.*, 1969) bestimmt. Um die Sensibilisierung für das chemotherapeutische Medikament Cisplatin zu überprüfen, wurden SW756 Zellen zu  $1 \times 10^4$  Zellen/Loch ausgesät und wie oben beschrieben mit Medium, OSM, IL-6 mit sgp80 und sgp80 alleine vorstimuliert. Nach einer zwölfstündigen Inkubationszeit wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit einer 1:2 Verdünnungsreihe Cisplatin stimuliert. Weitere 48h später wurde das Überleben der Zellen wie oben beschrieben bestimmt. Die Vorstimulation mit dem metabolischen Inhibitor PD98059 erfolgte 4h vor der Zugabe der Zytokine für weitere 8h. Nach der Inkubation bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub> wurden die Überstände verworfen und die Zellen mit einer 1:5 Verdünnungs-

reihe TNF $\alpha$  in Gegenwart von 50 $\mu$ g/ml CHX stimuliert. Das zelluläre Überleben wurde 16h später wie oben beschrieben bestimmt.

### **2.2.3. IL-12 Induktions-Experiment**

Die Monozyten wurden für sechs Tage mit GM-CSF (100ng/ml) und IL-4 (5ng/ml) kultiviert. Zusätzlich wurden die Zellen mit Medium, 5 oder 100ng/ml IL-6, 5 oder 0,5 ng/ml TGF $\beta$  oder Tumorzell-Überständen wie oben beschrieben stimuliert. Am Tag sechs wurden je 500 $\mu$ l des Überstands für IL-10 Analysen abgenommen und im Anschluss die Zellen für 8h mit 250ng/ml LPS stimuliert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, gezählt und in einer Dichte von  $6 \times 10^5$  Zellen/ml in Vollmedium aufgenommen. Je 250 $\mu$ l Zell-Suspension wurde in 24 Loch-Platten ausgesät und die Zellen mit Medium, PFA-fixierten BHK<sub>CD40L</sub> Zellen oder BHK<sub>wt</sub> Zellen ( $4,5 \times 10^5$ /well in 250 $\mu$ l Medium) für 24h stimuliert. Von jeder Bedingung wurden Doppelansätze hergestellt. Die Überstände wurden gesammelt, zentrifugiert und bei -80°C gelagert.

### **2.2.4. IL-6 Neutralisations-Experiment**

Die Monozyten wurden für vier Tage mit GM-CSF (100ng/ml) und IL-4 (5ng/ml) kultiviert. An Tag vier wurden die Zellen mit Medium, 25ng/ml IL-6 oder SW756 Tumorzell-Überstand, wie beschrieben, stimuliert. Um das endogene oder exogen zugesetzte IL-6 zu blockieren, wurde ein IL-6-neutralisierender Antikörper oder eine entsprechende Isotyp-Kontrolle zusammen mit IL-6 oder SW756 Tumorzell-Überstand verabreicht. An Tag sechs wurden je 500 $\mu$ l der Überstände für IL-10 Analysen abgenommen, im Anschluss die Zellen für 8h mit 250ng/ml LPS stimuliert und wie oben beschrieben mit PFA-fixierten BHK<sub>CD40L</sub> Zellen ( $4,5 \times 10^5$ /well in 250 $\mu$ l Medium) für 24h stimuliert. Von jeder Bedingung wurden Doppelansätze hergestellt. Die Überstände wurden gesammelt, zentrifugiert und bei -80°C gelagert.

### **2.2.5. IP-10 und TNF $\alpha$ Induktion**

Die Monozyten wurden für sechs Tage mit GM-CSF (100ng/ml) und IL-4 (5ng/ml) kultiviert. Zusätzlich wurden die Zellen mit Medium und 100ng/ml IL-6, wie beschrieben, vorinkubiert. Am Tag sechs wurden die Zellen für 24h mit 250ng/ml LPS stimuliert. Schließlich wurden die Überstände gesammelt, zentrifugiert und auf ihren IP-10 und TNF $\alpha$  Gehalt überprüft. Die Analyse jeder Bedingung erfolgte in Doppelansätzen.

### **2.2.6. Allogene, gemischte Lymphozyten-Kultur**

Die Monozyten wurden für sechs Tage mit GM-CSF (100ng/ml) und IL-4 (5ng/ml) kultiviert. Zusätzlich wurden die Zellen mit Medium, 100ng/ml IL-6 oder Tumorzell-Überständen wie beschrieben stimuliert. Am Tag sechs wurden die Zellen für 16h mit 250ng/ml LPS oder Medium als Kontrolle inkubiert. Dann wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, gezählt und in einer Dichte von  $2,25 \times 10^3$  Zellen/ml in Vollmedium aufgenommen. Allogene, naive T-Helferzellen wurden zu  $4,5 \times 10^5$  Zellen/ml in Vollmedium aufgenommen und zu jeweils 100 $\mu$ l in 96-Loch Rundbodenplatten ausgesät. Die vorbereiteten DC der diversen Bedingungen wurden in einem Verhältnis von 1:200 (DC:T-Helferzellen) dazugegeben und die Kokultur bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach vier Tagen erfolgte die Zugabe von 1mM Bromodesoxyuridin (BrdU) für 24h. Zunächst wurden die einzelnen Überstände gesammelt, wie beschrieben zentrifugiert und bei -80°C gelagert, um in unterschiedlichen ELISA Untersuchungen eingesetzt zu werden. Die Zellen wurden mit einem anti-BrdU-FITC konjugierten Antikörper mit Hilfe des *BrdU Flow Kits*, einem anti-CD3 Antikörper OKT3 oder einer Maus-IgG<sub>1</sub> Isotyp-Kontrolle und Allophycocyanin-konjugiertem sekundären Antikörper gefärbt. Der Prozentsatz der BrdU-positiven, CD3-gefärbten Zellen wurde mit Hilfe des FACSCalibur Durchflußzytometers bestimmt.

### **2.2.7. Proliferations-Assay für Zervixkarzinomzellen**

SW756 Zellen wurden in 96-Loch Flachbodenplatten zu  $1,5 \times 10^4$  Zellen/Loch ausgesät und 24h später mit Medium, 10ng/ml OSM oder 100ng/ml IL-6 und 500ng/ml sgp80 für 48h stimuliert. Bereits nach 46,5h erfolgte die Zugabe von 10 $\mu$ M BrdU. Die Proliferation der Zellen wurde mit Hilfe des *Cell Proliferation ELISA BrdU Kits* nach Anweisung des Herstellers ermittelt. Die Absorption wurde mit dem Tecan Spectrophotometer bei 450nm gemessen.

### **2.2.8. Präparation von Kernextrakten**

#### **2.2.8.1. Dignam-Methode**

Die Monozyten wurden für sechs Tage wie beschrieben mit Medium, 5 oder 100ng/ml IL-6, 5 oder 0,5ng/ml TGF $\beta$  oder Tumorzell-Überstand kultiviert. Am Tag sechs wurden die Zellen für 2h mit 250ng/ml LPS stimuliert und Kernextrakte nach Dignam *et al.* (Dignam *et al.*, 1983) präpariert.

#### **2.2.8.2. Andrews-Methode**

Die unterschiedlichen Zelllinien wurden in 6cm  $\varnothing$ -Schalen zu  $1,25 \times 10^6$  Zellen/Schale ausgesät, 24h später mit 10ng/ml OSM oder Standardmedium stimuliert und nach einer Inkubation von 15min bei 37°C geerntet. DC wurden vier Tage wie beschrieben kultiviert und für 15min mit den angegebenen Konzentrationen IL-6 für 15min stimuliert. Schließlich wurden Kernextrakte nach Andrews *et al.* (Andrews *et al.*, 1991) präpariert, der Proteingehalt der Proben mit Hilfe von Protein-Assay Reagenz bestimmt und die Extrakte bei -80°C gelagert.

### **2.2.9. Präparation von Ganzzellextrakten mittels LSDB-Puffer**

Verschiedene Karzinom-Zelllinien wurden zu  $2 \times 10^6$  Zellen/Schale in 6cm  $\varnothing$ -Schalen ausgesät und bei 37°C und 6% CO $_2$  inkubiert. 24h später wurden die Zellen mit 10ng/ml OSM oder 100ng/ml IL-6 in An- oder Abwesenheit von

500ng/ml sgp80 für die angegebenen Zeiträume stimuliert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgekratzt, bei 960xg bei 4°C für 5min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde 1x mit PBS gewaschen, in 100µl LSDB-Puffer aufgenommen und 30min auf Eis inkubiert. Durch vier Einfrier- und Auftauzyklen in flüssigem Stickstoff und bei 37°C wurden die Zellen aufgebrochen, im Anschluss dreimal 5s sonifiziert und anschließend die Zellwandtrümmer inklusive DNA abzentrifugiert (17.900xg, 10min, 4°C).

## **2.2.10. Präparation von Ganzzellextrakten mittels SDS-Probenpuffer**

### **2.2.10.1. Zervixkarzinom-Zelllinien**

SW756 und HPK1A Zellen wurden zu  $1,5 \times 10^6$  Zellen/Schale in 6cm ø-Schalen ausgesät und 24h später mit Medium oder 20µM PD98059 für 30min vorstimuliert und schließlich für 10min mit Medium, 10ng/ml OSM oder 100ng/ml IL-6 in An- oder Abwesenheit von 500ng/ml sgp80 für die angegebenen Zeiträume inkubiert. Zur Herstellung der Ganzzellextrakte wurden die pelletierten Zellen in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Der Abgleich der Proben erfolgte mittels Coomassie-gefärbten Gelen nach einem Standardprotokoll.

### **2.2.10.2. Dendritische Zellen**

Die Monozyten wurden für sechs Tage mit GM-CSF (100ng/ml) und IL-4 (5ng/ml) kultiviert. Zusätzlich dazu wurden die Zellen mit Medium oder 100ng/ml IL-6, wie beschrieben, stimuliert. Am Tag sechs wurden die Zellen mit Medium oder 50ng/ml LPS stimuliert, nach 48h die Zellen geerntet und in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

### **2.2.11. RNA Isolierung**

Die Monozyten wurden für vier Tage mit GM-CSF (100ng/ml) und IL-4 (5ng/ml) kultiviert. Am Tag vier wurden die Zellen mit 100ng/ml IL-6 versetzt und nach 20min und 40min geerntet oder am Tag sechs für 4h mit 250ng/ml LPS

stimuliert. Die RNA wurde mit Hilfe des *RNeasy Kits* isoliert. Die genomische DNA wurde dabei durch die Verwendung von Qiashredder-Säulen geschert.

## **2.2.12. Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.12.1. Standardmethoden**

Die hier aufgeführten Methoden wurden nach Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1989) und Ausubel *et al.* (Ausubel *et al.*, 1992) durchgeführt.

- Ethanol-Präzipitation von DNA
- Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen
- Gelelektrophorese von Nukleinsäuren
- Bestimmung der Proteinkonzentration
- Denaturierende diskontinuierliche Elektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen

### **2.2.12.2. Western Blot Analysen**

#### **2.2.12.2.1. Zervixkarzinom-Zelllinien**

Gleiche Mengen an Protein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. *Western Blots* wurden nach dem Protokoll von Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt. Die primären Antikörper gegen HPV18E7 (1:100), c-myc (1:250), STAT3 (1:500), Phospho-STAT3(Tyr705) (1:1000), Phospho-ERK (1:5000), ERK-2 (1:2000) und  $\beta$ -Aktin (1:2000) wurden bei 4°C über Nacht und sekundäre, Peroxidase-gekoppelte Antikörper bei RT für 2h inkubiert. Der Chemilumineszenz-Nachweis erfolgte mit dem *BM Chemiluminescence Blotting Substrate* nach den Angaben des Herstellers. Die Protein-Antikörper-Komplexe konnten danach als Banden auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

#### **2.2.12.2.2. Dendritische Zellen**

DC wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen, sonifiziert und für 5min bei 95°C erhitzt. Gleiche Mengen an Protein mittels SDS-PAGE getrennt und *Western Blots* nach dem Protokoll von Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt. Der primäre Antikörper gegen IDO (1:1000) wurde bei 4°C über Nacht und der sekundäre, Peroxidase-gekoppelte Antikörper bei RT für 2h inkubiert. Als Abgleich wurde ein  $\beta$ -Tubulin (1:333) Antikörper verwendet. Der Chemilumineszenz-Nachweis erfolgte wie bereits beschrieben mit dem *BM Chemiluminescence Blotting Substrate*.

#### **2.2.12.3. Herstellung radioaktiv markierter Oligonukleotide**

Komplementäre Oligonukleotide für NF- $\kappa$ B Bindestellen der murinen  $\kappa$  leichten Kette (Zabel *et al.*, 1991) oder STAT1-3 Bindestellen des *sis*-induzierbaren Elements des *c-fos* Promotors (Hess *et al.*, 2000) wurden in TEN-Puffer gemischt, für 5min auf 95°C erhitzt und mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP mittels Klenow-Polymerase radioaktiv markiert.

#### **2.2.12.4. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)**

Je 5 $\mu$ g der Kernextrakte nach Dignam oder Andrews wurden für 20min bei RT mit je 1 $\mu$ l radioaktiv markierten DNA-Fragmenten in je 9 $\mu$ l der entsprechenden Bindepuffer (für NF- $\kappa$ B oder STAT) inkubiert. Das DNA-Protein-Gemisch wurde auf 4,5%igen TBE-gepufferten Acrylamidgelen bei 160V aufgetrennt und durch Autoradiogramme sichtbar gemacht.

#### **2.2.12.5. Supershift-Analysen**

Um die, an STAT1-3 Bindestellen gebundenen Proteine näher zu charakterisieren, wurden *Supershift*-Analysen durchgeführt. Die Kernextrakte wurden mit 200ng anti-STAT1, anti-STAT3 Antikörpern oder einer entsprechenden Isotyp-Kontrolle für 40min bei 4°C vorinkubiert, gefolgt von der

oben beschrieben Inkubationszeit mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden und Auftrennung der Protein-DNA-Komplexe.

#### **2.2.12.6. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Die Überstände der verschiedenen Experimente wurden auf Eis aufgetaut und der IFN $\gamma$ , IL-10, IL-12, IP-10 bzw. TNF $\alpha$  Gehalt mit Hilfe der käuflich erworbenen *Kits* laut Anweisung der Hersteller ermittelt oder im Falle von IL-6 wie unten beschrieben durchgeführt. Tumorzell-Überstände wurden auf ihren IL-6, IL-10 und TGF $\beta$  Gehalt untersucht, dabei wurde für die Bestimmung des IL-10 und TGF $\beta$  Gehalts laut Anweisung des Herstellers verfahren.

##### **2.2.12.6.1. IL-6 ELISA**

Nunc-MaxiSorp Platten wurden mit 1 $\mu$ g/ml anti-IL-6 Antikörper über Nacht beschichtet. Nach einer 1h Blockierung der Platte mit 0,5% BSA in PBS wurden die Proben sowie eine Verdünnungsreihe des Standards aufgetragen und für 2-3h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde mit 0,1 $\mu$ g/ml polyklonalem anti-IL-6 Antikörper aus Kaninchen über Nacht inkubiert. Nach einer 2h Behandlung mit Peroxidase gekoppelten Ziege anti-Kaninchen Antikörper wurde das TMB-Substrat zugegeben und die Extinktion mit dem Tecan Spectrophotometer bei 450nm gemessen.

#### **2.2.13. Immunhistochemische Untersuchungen**

Formalin-fixierte (5%), in Paraffin eingebettete Gewebeproben von Patientinnen mit leichtgradigen oder schwergradigen zervikalen, intraepithelialen Neoplasien oder Zervixkarzinomen wurden freundlicherweise vom Institut für Pathologie, Universität zu Köln, zur Verfügung gestellt. Das Einverständnis der Patientinnen zur Verwendung der Proben für wissenschaftliche Untersuchungen lag in allen Fällen vor. 5 $\mu$ M starke Sektionen wurden geschnitten und in Xylol entparaffiniert. Die konventionelle H&E Färbung (Hämatoxilin und Eosin) erfolgte nach einem Standardprotokoll. Die Schnitte wurden zunächst für 5min

in Zitratpuffer unter Überdruck erhitzt, im Anschluss für 15min in kaltem H<sub>2</sub>O gewaschen und schließlich die endogenen Peroxidasen durch eine Inkubation von 30min bei RT mit 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol blockiert. Nach einem weiteren Waschschrift in TBS erfolgte die Inkubation mit den monoklonalen Antikörpern gegen Ki67 oder Phospho-STAT3(Tyr705) bei 4°C über Nacht. TBS diente dabei als Negativ-Kontrolle. Nach zwei Waschschriften in TBS wurden die Schnitte mit EnVision™/+HRP für 30min bei RT inkubiert. Die Schnitte wurden erneut gewaschen und für 30min mit AEC-Substrat bei RT inkubiert, um die Reaktion sichtbar zu machen. Die Präparate wurden abschließend mit Aquatex® eingedeckelt.

### **2.2.14. Northern Blot Analysen**

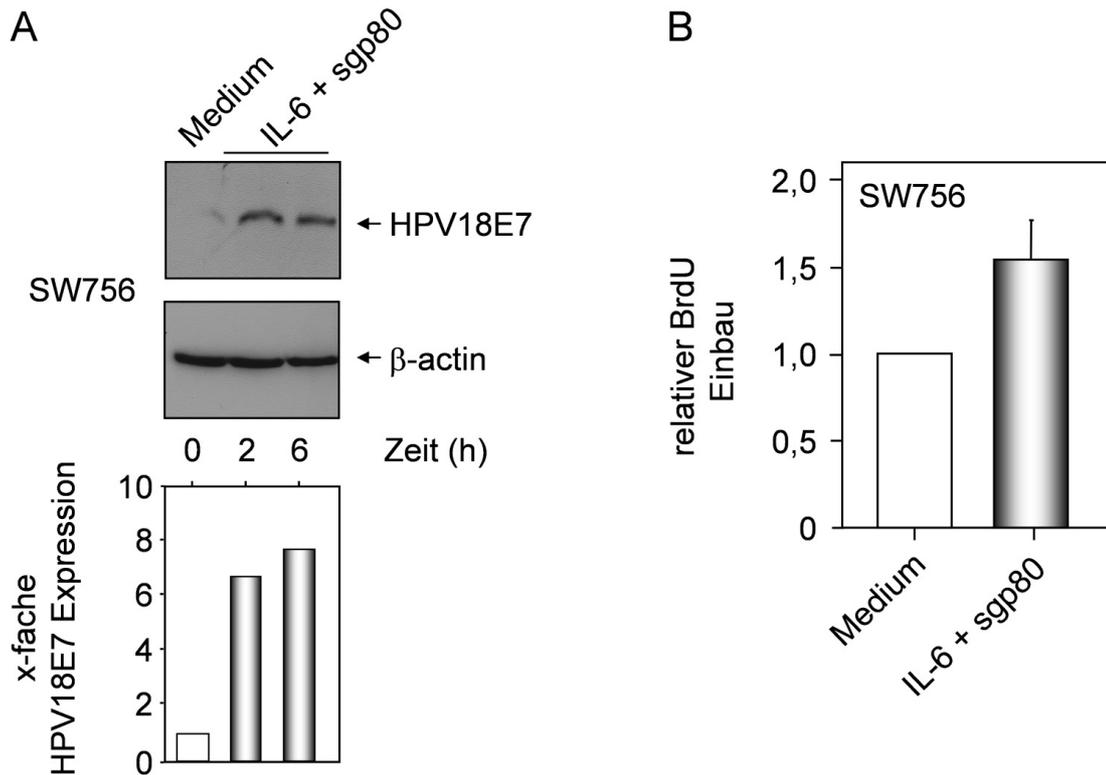
*Northern Blots* wurden nach dem Protokoll von Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt. Die radioaktive Markierung der IRF-1, SOCS1 und SOCS3 Sonden erfolgte mit dem *Random Primers DNA Labeling System* und dem radioaktiven [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP Nukleotid. Für die Prähybridisierung und Hybridisierung wurde *ExpressHyb*™ Hybridisierungs Lösung verwendet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Autokrine Wirkung von IL-6 in Zervixkarzinomzellen

##### 3.1.1. Einfluss von IL-6 auf die Onkogen Expression und Proliferation von Zervixkarzinomzellen

In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass eine Wiederherstellung des IL-6 Signalweges in Zervixkarzinomzellen zu einer STAT3-abhängigen Aktivierung der HPV18 Kontrollregion führt (Smola-Hess *et al.*, 2001). In diesen transienten Transfektions-Analysen wurden episomal vorliegende Reporterplasmide untersucht. Nach der in den meisten Zervixkarzinomzellen erfolgten Integration der viralen DNA kann sich die transkriptionelle Regulation von der episomalen, viralen DNA unterscheiden (Bechtold *et al.*, 2003). Aus diesem Grund untersuchten wir den Einfluss der IL-6 Signaltransduktion auf die Induktion der endogenen Onkogen Expression in Zervixkarzinomzellen mit integriertem HPV18 Genom. SW756 Zellen wurden mit IL-6 und löslichem IL-6 Rezeptor (sgp80) für unterschiedliche Zeiträume inkubiert, lysiert und für *Western Blot* Versuche verwendet. IL-6 zusammen mit sgp80 induzierte sehr schnell die Onkogen Expression in diesen Zellen (Abbildung 3A). Schon nach zwei Stunden kam es zu einer deutlichen Induktion der HPV18 E7 Expression. IL-6/sgp80 Stimulation steigerte zudem die Proliferation der autonom wachsenden Krebszelllinie (Abbildung 3B).



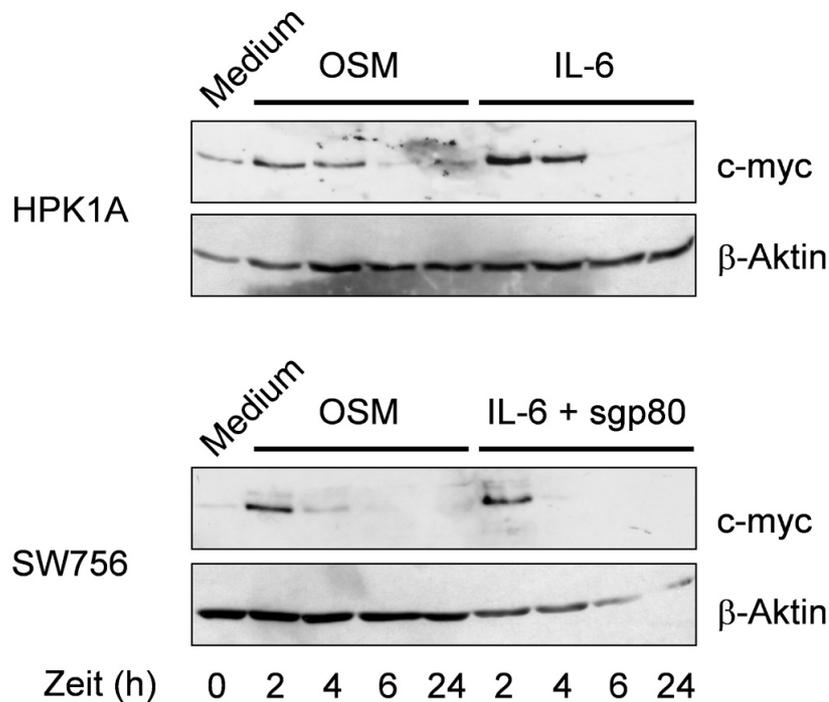
**Abbildung 3: (A) IL-6/R induziert Onkogen Expression in SW756 Zellen.** Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit Medium oder 100ng/ml IL-6 zusammen mit 500ng/ml sgp80 stimuliert. 75µg Ganzzelleextrakt wurden mittels *Western Blot* untersucht. Dazu wurden HPV18E7 (obere Reihe) oder β-Aktin (untere Reihe) spezifische Antikörper verwendet. Eine Quantifizierung der Banden des *Western Blot*, mit Hilfe der QuantityOne Software der Firma BioRad, ergab die im unteren Teil angegebene x-fache Expression von HPV18 E7.

**(B) Verstärkte Proliferation von SW756 Zellen nach IL-6/R Stimulation.** Die Zellen wurden für 48h mit Medium (inklusive 1% FCS) oder 100ng/ml IL-6 zusammen mit 500ng/ml sgp80 behandelt. Der BrdU Einbau wurde mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Der BrdU Einbau der unstimulierten Zellen wurde auf 1 gesetzt.

### 3.1.2. Induktion der c-myc Synthese durch IL-6 und OSM

Die Induktion des viralen Onkoproteins E7 wurde begleitet von einer schnellen Hochregulation des Proto-Onkogens c-myc. Innerhalb von zwei Stunden wurde die c-myc Expression nicht nur in den malignen HPV18-positiven SW756 Zellen, sondern auch in nicht-malignen HPK1A Zellen, die *in vitro* mit HPV16 transformiert wurden, durch IL-6 und OSM induziert (Abbildung 4). C-myc ist ein wichtiger Vermittler der Proliferation und kann Zellen für den Zelltod durch Apoptose sensibilisieren. Dies wurde z.B. für die Apoptose Induktion durch TNFα beschrieben (Janicke *et al.*, 1994; Klefstrom *et al.*, 1994). Aus diesem

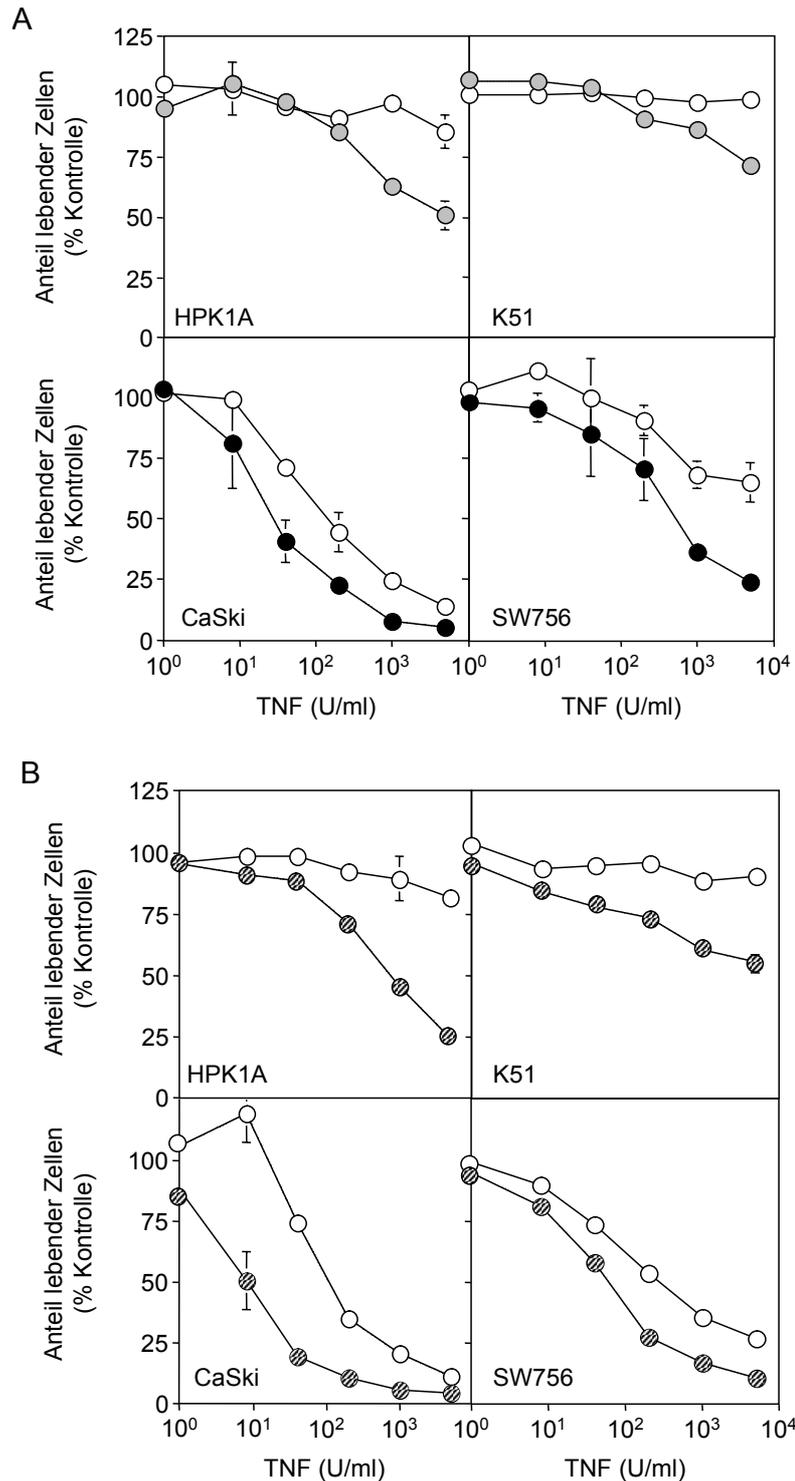
Grund wurde der Einfluss von IL-6 und OSM auf die TNF $\alpha$ -vermittelte Apoptose in HPV-positiven Keratinozyten untersucht.



**Abbildung 4: Induktion der c-myc Expression nach OSM und IL-6 Signaltransduktion in HPK1A und SW756 Zellen.** Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit Medium, 10ng/ml OSM oder 100ng/ml IL-6 in Abwesenheit (HPK1A) oder Anwesenheit (SW756) von 500ng/ml sgp80 stimuliert. 20 $\mu$ g (HPK1A) oder 40 $\mu$ g (SW756) Ganzzellextrakt wurden mittels *Western Blot* untersucht. Dazu wurden jeweils monoklonale Antikörper gegen c-myc (obere Reihe) oder  $\beta$ -Aktin als Kontrolle (untere Reihe) verwendet.

### 3.1.3. IL-6 und OSM Signaltransduktion sensibilisieren HPV-positive Zelllinien für TNF $\alpha$ -vermittelte Zytotoxizität

Verschiedene HPV-positive Zelllinien wurden auf ihre Sensitivität gegenüber der TNF $\alpha$ -vermittelten Induktion des Zelltods in Gegenwart von CHX untersucht. CHX hemmt die Proteinbiosynthese auf der Ebene der Translation und verhindert damit die Expression von anti-apoptotischen Proteinen (Nebert und Gelboin, 1970). Die nicht-malignen HPK1A und K51 Zellen reagierten nur schwach mit der Induktion von Apoptose nach TNF $\alpha$  Stimulation, während Karzinomzellen zu 32% (SW756) oder 80% (CaSki) durch hohe TNF $\alpha$  Dosen getötet wurden (Abbildung 5A).



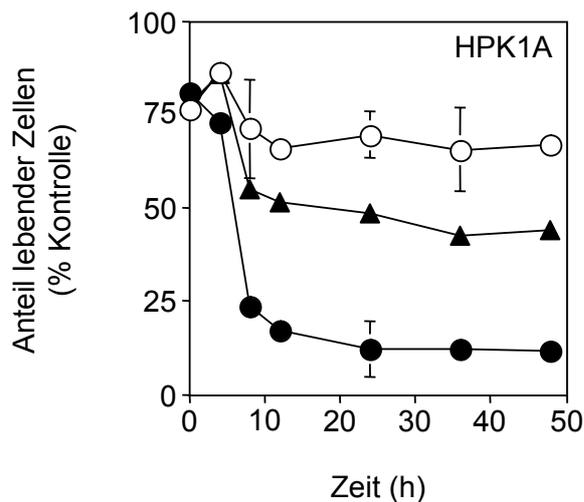
**Abbildung 5: IL-6 Signaltransduktion sensibilisiert für TNF $\alpha$ -vermittelte Apoptose. (A)** *In vitro* HPV-transformierte Zellen (HPK1A und K51) und HPV-positive Zervixkarzinomzellen (CaSki und SW756) wurden mit Medium (weiße Kreise) oder 100ng/ml IL-6 in der Abwesenheit (HPK1A und K51, graue Kreise) oder Anwesenheit (CaSki und SW756, schwarze Kreise) von 500ng/ml sgp80 stimuliert. Nach 8h wurden die Zellen mit einer Verdünnungsreihe TNF $\alpha$  in der Anwesenheit von 50 $\mu$ g/ml CHX behandelt. Der Anteil lebender Zellen wurde nach 16h durch die Aufnahme von Neutralrot ermittelt.

**(B)** Alternativ wurden die Zellen mit Medium (weiße Kreise) oder 10ng/ml OSM (schraffierte Kreise) stimuliert. Nach 8h wurden die Zellen mit einer Verdünnungsreihe TNF $\alpha$  in der Anwesenheit von 50 $\mu$ g/ml CHX behandelt. Der Anteil lebender Zellen wurde nach 16h durch die Aufnahme von Neutralrot ermittelt.

Um zu überprüfen, ob IL-6 diese Sensitivität für TNF $\alpha$ -vermittelte Apoptose verändern kann, wurden die Zellen für 8h mit IL-6 vorinkubiert und im Anschluss mit ansteigenden Dosen TNF $\alpha$  in der Anwesenheit von CHX stimuliert. Hierdurch wurden auch die nicht-malignen HPV-positiven Keratinozyten für den TNF $\alpha$ -vermittelten Zelltod sensibilisiert. Bis zu 25% der K51 und ca. 50% der HPK1A Zellen starben nach dieser Behandlung. Zervixkarzinomzellen (CaSki und SW756) wurden nicht durch IL-6 allein (Daten nicht gezeigt), sondern nur, wenn IL-6 zusammen mit sgp80 verabreicht wurde sensibilisiert. Unter diesen Bedingungen wurden CaSki Zellen bis zu zehnfach sensibler für TNF $\alpha$ -vermittelte Apoptose, während ca. 75% der SW756 Zellen starben (Abbildung 5A). Ebenso führte die OSM Signaltransduktion bereits in sehr geringer Dosierung (10ng/ml) zu einer gesteigerten Sensibilität für TNF $\alpha$ -vermittelte Zytotoxizität (Abbildung 5B). Dabei zeigte sich in HPK1A der stärkste Effekt. Bis zu 75% der Zellen starben durch TNF $\alpha$  nach OSM Stimulation.

### **3.1.4. IL-6 und OSM-vermittelte Sensitivität für TNF $\alpha$ -Zytotoxizität ist induzierbar**

TNF $\alpha$ -vermittelte Zytotoxizität beinhaltet eine Vielzahl von intrazellulären Faktoren, die das „Todessignal“ übertragen. Die Sensibilisierung für den TNF $\alpha$ -vermittelten Zelltod kann also auf verschiedenen Ebenen stattfinden. Um zu untersuchen, ob die Sensibilisierung induzierbar ist, wurden Zeit-Kinetiken der IL-6 und OSM Stimulation vor der Zugabe des zytotoxischen Stimulus in HPK1A Zellen durchgeführt. Bei gleichzeitiger Gabe von IL-6 oder OSM und TNF $\alpha$  wurde keine Steigerung der TNF $\alpha$ -Zytotoxizität beobachtet. Die Empfindlichkeit für TNF $\alpha$ -vermittelten Zelltod war für einen Zeitraum von 8h deutlich induzierbar und stieg weiter an bis nach etwa 24h eine Plateau-Phase erreicht wurde (Abbildung 6).

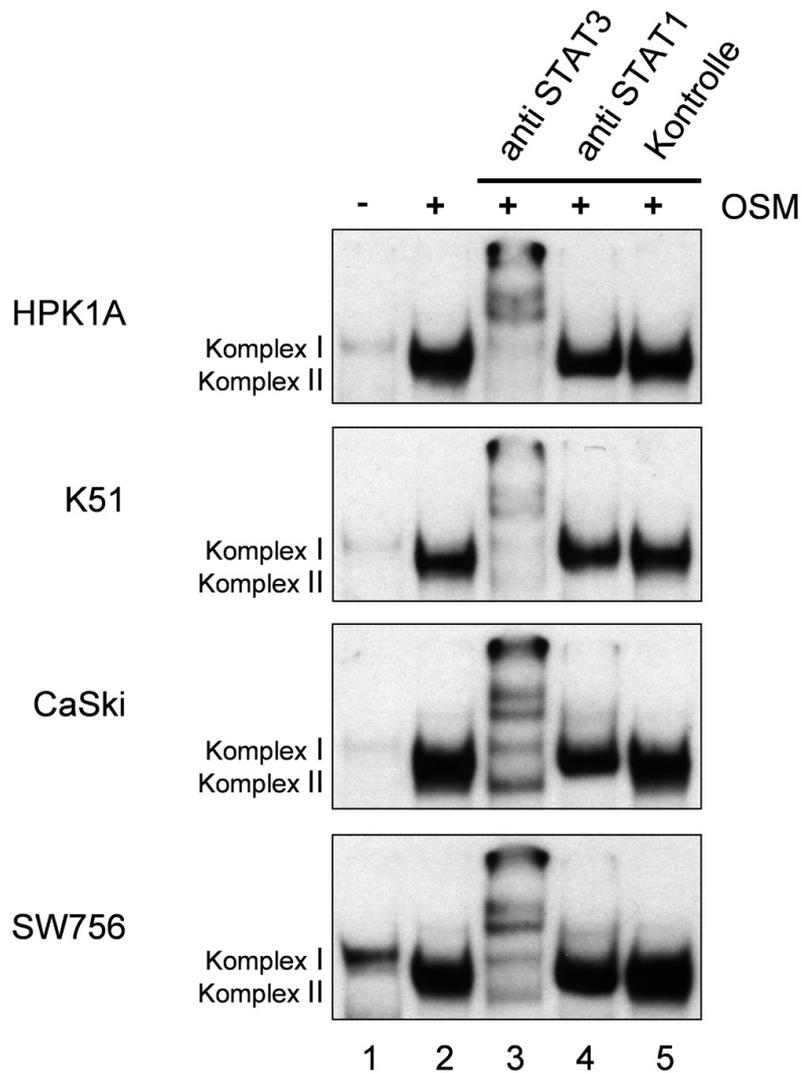


**Abbildung 6: Die Sensibilisierung für  $TNF\alpha$ -vermittelte Apoptose ist induzierbar.** HPK1A Zellen wurden mit Medium (weiße Kreise), 100ng/ml IL-6 (schwarze Dreiecke) oder 10ng/ml OSM (schwarze Kreise) stimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit 5000U/ml  $TNF\alpha$  in der Anwesenheit von 50 $\mu$ g/ml CHX behandelt. Der Anteil lebender Zellen wurde 16h nach der Behandlung durch die Aufnahme von Neutralrot ermittelt.

### 3.1.5. IL-6 und OSM Signalwege in Zervixkarzinomzellen

#### 3.1.5.1. OSM führt zu STAT3 Aktivierung

Bei der Suche nach intrazellulären Signaltransduktionswegen, die sehr schnell durch IL-6 und OSM aktiviert werden, wurde auch die Aktivierung von STAT Faktoren untersucht. Es wurde bereits gezeigt, dass die mit löslichem IL-6 Rezeptor rekonstituierte IL-6 Signaltransduktion in verschiedenen Zervixkarzinomzellen zu einer starken Aktivierung von STAT3 führt (Hess *et al.*, 2000). Eine ähnliche STAT Aktivierung zeigten HPV-positive Keratinozyten Zelllinien nach der Stimulation mit OSM, darunter die HPV16- bzw. HPV18-immortalisierten Keratinozyten HPK1A und K51 sowie die HPV16- bzw. HPV18-positiven Zervixkarzinom-Zelllinien CaSki und SW756 (Abbildung 7).

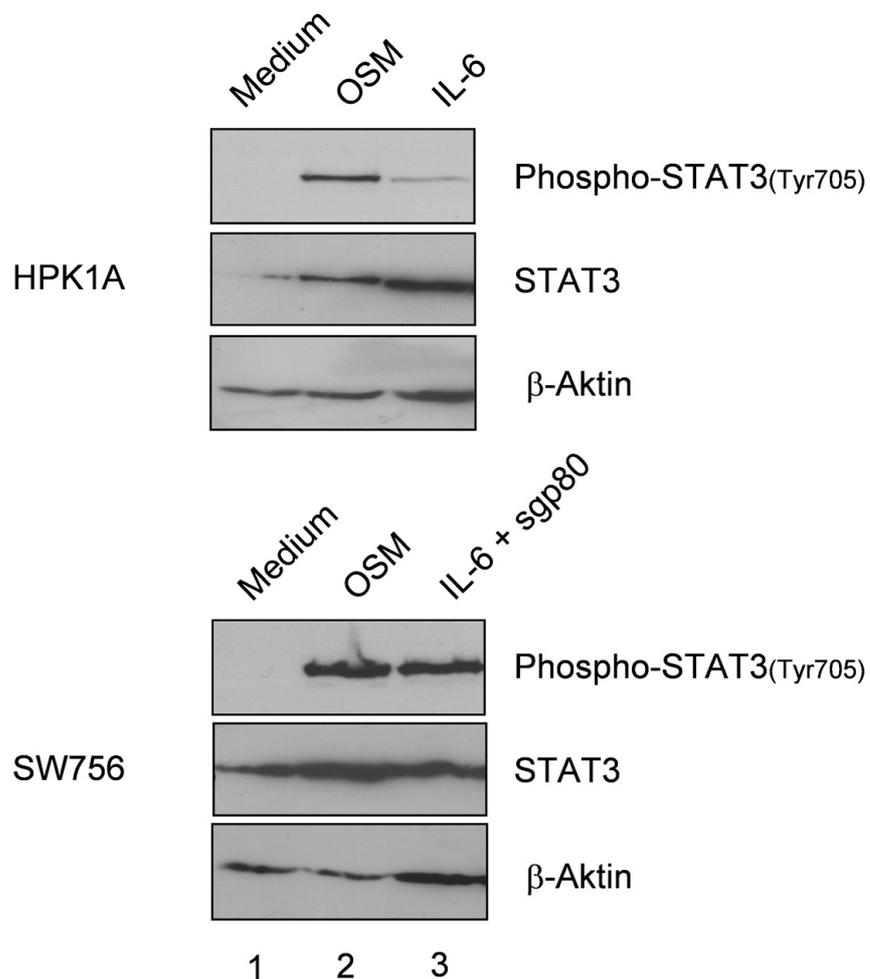


**Abbildung 7: OSM aktiviert in verschiedenen HPV-positiven Zelllinien vornehmlich STAT3.** Die Zellen wurden für 15min mit Medium (Spur 1) oder 10ng/ml OSM (Spuren 2-5) inkubiert. Die Kernextrakte wurden auf ihre STAT Bindeaktivität mittels EMSA untersucht. Dazu wurde als Oligo das *sis*-induzierbare Element aus dem *c-fos* Promotor verwendet. Um die Spezifität der Komplexe zu untersuchen, wurden die Kernextrakte mit anti STAT3 Antikörper (Spur 3), anti STAT1 Antikörper (Spur 4) oder einem unspezifischen Kaninchen Immunglobulin als Kontrolle (Spur 5) vorinkubiert.

Alle Zellen enthielten einen nicht-induzierbaren Komplex I. Nach der Stimulation mit IL-6 oder OSM zeigte sich ein stark induzierbarer, neuer Komplex (Komplex II). Dieser wurde durch anti STAT3 Antikörper fast komplett, durch anti STAT1 kaum und durch Kontroll-Antikörper gar nicht gebunden. OSM, wie auch IL-6 Signaltransduktionswege führen also in HPV positiven Keratinozyten und Zervixkarzinom-Zelllinien zur Aktivierung von STAT3.

### 3.1.5.2. *Western Blot* Analyse der IL-6 und OSM induzierten STAT3 Aktivierung

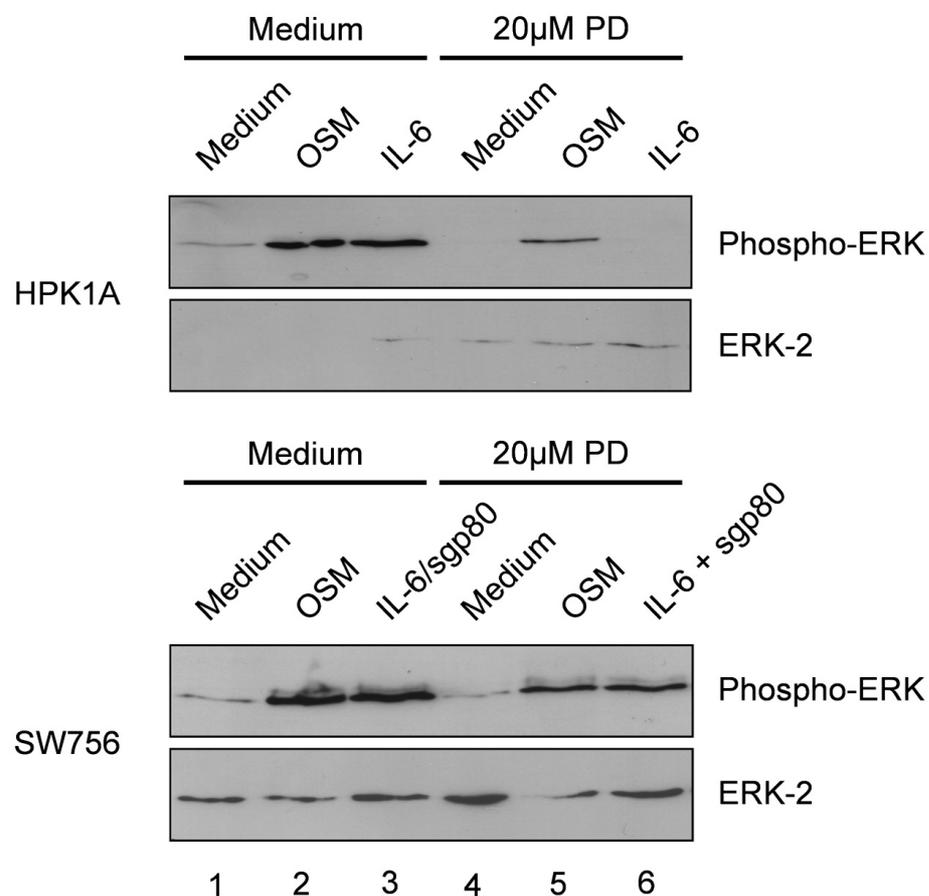
Die beschriebene Aktivierung von STAT3 wurde für beide Zytokine auch mit Hilfe von Phospho-STAT3(Tyr705)-spezifischen Antikörpern im *Western Blot* untersucht. Beide Zytokine führten zur Aktivierung von Phospho-STAT3(Tyr705) in den *in vitro* HPV16-transformierten Zellen HPK1A und den HPV18-positiven SW756 Zellen (Abbildung 8).



**Abbildung 8: IL-6 und OSM Signaltransduktion aktivieren in HPV-positiven Zelllinien STAT3.** Die Zellen wurden für 10min mit Medium (Spur 1), 10ng/ml OSM (Spur 2) oder 100ng/ml IL-6 in Abwesenheit (HPK1A) oder Anwesenheit (SW756) von 500ng/ml sgp80 (Spur 3) stimuliert. 25µl Ganzzellextrakt wurden mittels *Western Blot* untersucht. Dazu wurden jeweils Antikörper gegen Phospho-STAT3(Tyr705) (obere Reihe), STAT3 (mittlere Reihe) oder β-Aktin als Kontrolle (untere Reihe) verwendet.

### 3.1.5.3. IL-6 und OSM aktivieren die ERK MAPK

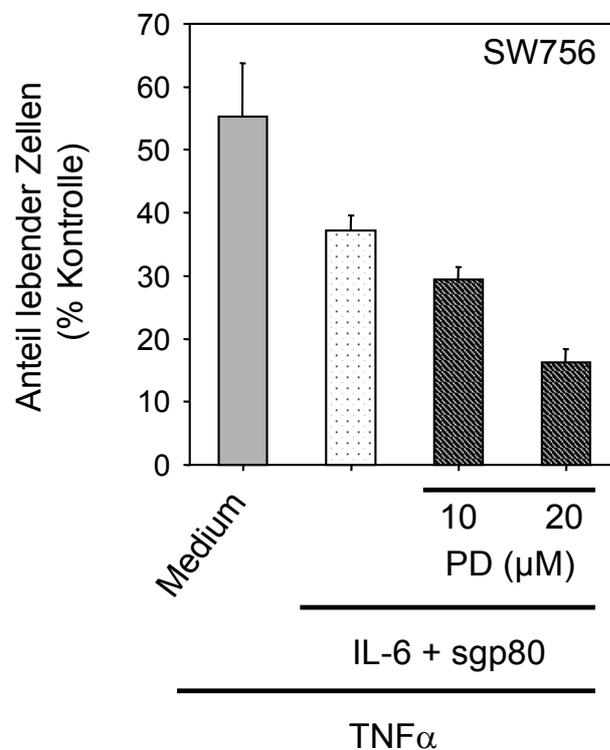
Um die Aktivierung der ERK MAPK zu untersuchen, wurden *Western Blots* mit Phospho-ERK-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Zusätzlich wurden die Zellen mit dem MAPK Inhibitor PD98059 behandelt, der spezifisch die MAPK MEK und damit die Aktivierung von ERK inhibiert. Beide Zytokine führten zu einer starken Aktivierung von Phospho-ERK in den HPV16-transformierten HPK1A und den malignen HPV18-positiven SW756 Zellen. Der Inhibitor PD98059 konnte diese Aktivierung teilweise wieder aufheben (Abbildung 9).



**Abbildung 9: IL-6 und OSM Signaltransduktion aktivieren in HPV-positiven Zelllinien die ERK MAPK.** Die Zellen wurden für 10min mit Medium (Spur 1 und 4), 10ng/ml OSM (Spuren 2 und 5) oder 100ng/ml IL-6 in Abwesenheit (HPK1A) oder Anwesenheit (SW756) von 500ng/ml sgp80 (Spuren 3 und 6) stimuliert zusätzlich dazu wurden die Zellen vor der Zugabe der Stimulantien mit Medium (Spur 4) oder 20µM PD98059 (Spuren 5 und 6) für 30min vorstimuliert. 25µl Ganzzelleextrakt wurden mittels *Western Blot* untersucht. Dazu wurden jeweils monoklonale Antikörper gegen Phospho-ERK (obere Reihe) und ERK-2 (untere Reihe) verwendet.

### 3.1.6. Inhibition der ERK MAP Kinase sensibilisiert für $\text{TNF}\alpha$ -vermittelten Zelltod

Um zu überprüfen, ob die Inhibition der ERK MAPK einen Einfluss auf die  $\text{TNF}\alpha$ -vermittelte Zytotoxizität in SW756 Zellen hat, wurde der Inhibitor PD98059 in den Zytotoxizitäts-Versuchen eingesetzt. Abbildung 10 zeigt, dass die Inhibition der ERK Aktivierung zu einer Verstärkung der  $\text{TNF}\alpha$ -vermittelten Apoptose in diesen Zellen führte. Die beobachtete Apoptose-Sensibilisierung durch IL-6 zusammen mit sgp80 wurde dadurch noch weiter verstärkt.

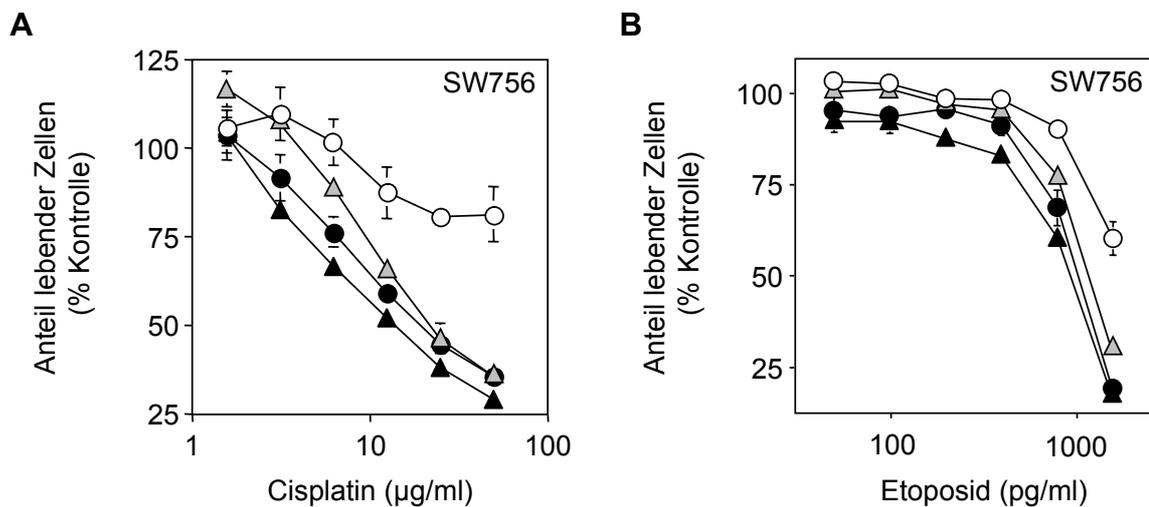


**Abbildung 10: Inhibition der MAPK verstärkt die  $\text{TNF}\alpha$ -vermittelte Apoptose in SW756 Zellen.** SW756 Zellen wurden für 4h mit dem Inhibitor PD98059 in den angegebenen Konzentrationen vorbehandelt und mit Medium, 100ng/ml IL-6 in der Anwesenheit von 100ng/ml sgp80, stimuliert. Nach 8h wurden die Zellen mit 5000U/ml  $\text{TNF}\alpha$  behandelt. Der Anteil lebender, unstimulierter Zellen wurde auf 100% gesetzt.

### 3.1.7. Einfluss von IL-6 und OSM auf den Zytostatika-vermittelten Zelltod in Zervixkarzinomzellen

Die induzierbare Sensibilisierung für Apoptose muss nicht auf den  $\text{TNF}$  Rezeptor-induzierten Zelltod beschränkt sein. Aus diesem Grund wurde

überprüft, ob die IL-6 Signaltransduktion in Zervixkarzinomzellen auch andere Apoptose Signalwege beeinflussen kann. Eine Verdünnungsreihe der chemotherapeutischen Medikamente Cisplatin (Abbildung 11A) und Etoposid (Abbildung 11B) wurde 12h nach der Stimulation mit IL-6 und sgp80, OSM oder Medium zugegeben.



**Abbildung 11: IL-6 Signaltransduktion sensibilisiert für Zytostatika-vermittelte Apoptose.**

**(A)** HPV-positive Zervixkarzinomzellen SW756 wurden mit Medium (weiße Kreise), 100ng/ml IL-6 in der Anwesenheit von 500ng/ml sgp80 (schwarze Dreiecke), 500ng/ml sgp80 allein (graue Dreiecke) oder 10ng/ml OSM (schwarze Kreise) vorstimuliert. Nach 12h wurden die Zellen mit einer Verdünnungsreihe Cisplatin behandelt. Der Anteil lebender Zellen wurde nach 48h durch die Aufnahme von Neutralrot ermittelt. Der Anteil lebender, unstimulierter Zellen wurde auf 100% gesetzt.

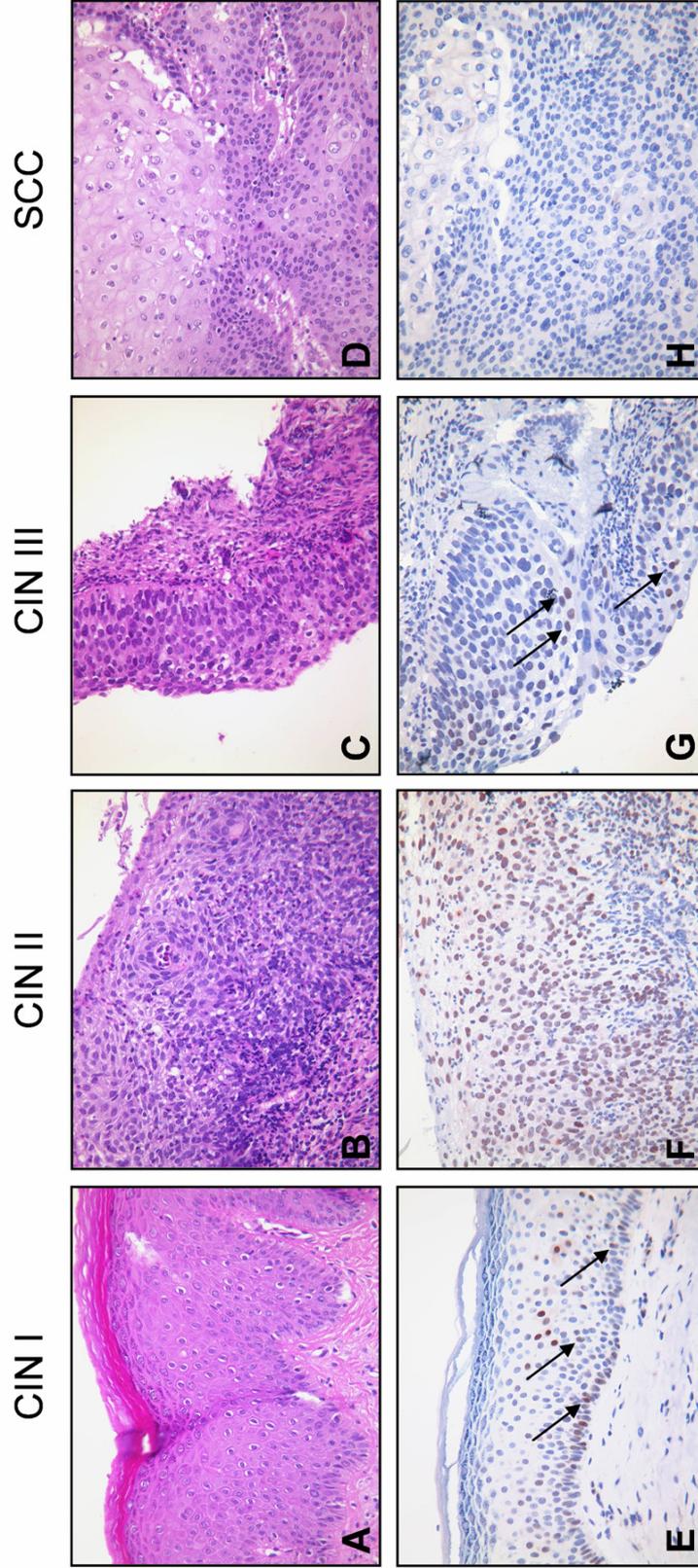
**(B)** HPV-positive Zervixkarzinomzellen SW756 wurden mit Medium (weiße Kreise), 100ng/ml IL-6 in der Anwesenheit von 500ng/ml sgp80 (schwarze Dreiecke), 500ng/ml sgp80 allein (graue Dreiecke) oder 10ng/ml OSM (schwarze Kreise) vorstimuliert. Nach 12h wurden die Zellen mit einer Verdünnungsreihe Etoposid behandelt. Der Anteil lebender Zellen wurde nach 48h durch die Aufnahme von Neutralrot ermittelt. Der Anteil lebender, unstimulierter Zellen wurde auf 100% gesetzt.

Sowohl IL-6 zusammen mit sgp80 als auch OSM sensibilisierten SW756 Zellen massiv für den Cisplatin- und Etoposid-vermittelten Zelltod. Während nicht-tumorigene, HPV-positive Keratinozyten kaum IL-6 produzieren, sezernieren Zervixkarzinomzellen große Mengen an IL-6. Es stellte sich deshalb die Frage, ob die Wiederherstellung des IL-6 Signalweges ausreichen würde, um diese Zellen für den Zytostatika-vermittelten Zelltod zu sensibilisieren. Um diese Frage zu beantworten, wurden SW756 Zellen nur mit sgp80 stimuliert und damit eine autokrine Wirkung von IL-6 vor der Cisplatin oder Etoposid Behandlung ermöglicht. In der Tat führte die Wiederherstellung des autokrinen IL-6

Signalweges zu einer drastischen Verstärkung der apoptotischen Effekte der chemotherapeutischen Medikamente Cisplatin und Etoposid (Abbildung 11).

### **3.1.8. Phospho-STAT3(Tyr705) Aktivierung in CIN Läsionen und im Zervixkarzinom**

STAT3 wurde bereits als ein Faktor, der das zelluläre Überleben fördert und vor Apoptose schützen kann, beschrieben (Fukada *et al.*, 1996). Um zu überprüfen, ob STAT3 in zervikalen intraepithelialen Neoplasien und dem Zervixkarzinom aktiviert wird, wurden immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Dafür wurden Paraffin-Schnitte von Biopsien verschiedener Patientinnen hergestellt, und mit einem polyklonalen Phospho-STAT3(Tyr705) Antikörper immunhistochemisch angefärbt. Es zeigte sich, dass in leichtgradigen Neoplasien (Abbildung 12A und E) Phospho-STAT3(Tyr705) fast ausschließlich in den basalen Zellschichten und dort überwiegend in den Zellkernen zu finden war (Abbildung 12E). Eine positive Färbung in den suprabasalen Schichten des Schleimhautepithels war dagegen die Ausnahme. In den CIN II Läsionen (Abbildung 12B und F) mit einem inflammatorischen Infiltrat wurden positiv gefärbte Zellen dagegen in allen Zellschichten und Zellkompartimenten gefunden (Abbildung 12F). Die Intensität der Färbung und die Quantität an positiv gefärbten Zellen waren in den einzelnen Fällen sehr variabel. CIN III Läsionen (Abbildung 12C und G) zeigten eine positive Phospho-STAT3(Tyr705) Färbung nur in den oberen Schichten des Epithels (Abbildung 12G). In keinem der zehn untersuchten Zervixkarzinome (Abbildung 12D und H) konnte eine nukleäre Phospho-STAT3(Tyr705) Färbung nachgewiesen werden (Abbildung 12H). Eine Färbung der endothelialen Zellen und der basalen Keratinozyten im morphologisch unauffälligen Epithel abseits des SCC dienten als Positiv-Kontrolle. Die in Abbildung 12A-D gezeigten Kontroll-Schnitte wurden mit Hämatoxilin und Eosin gefärbt. Alle immunhistochemischen Färbungen wurden freundlicherweise von Frau PD Dr. C. Wickenhauser, Institut für Pathologie, Universität zu Köln, durchgeführt.



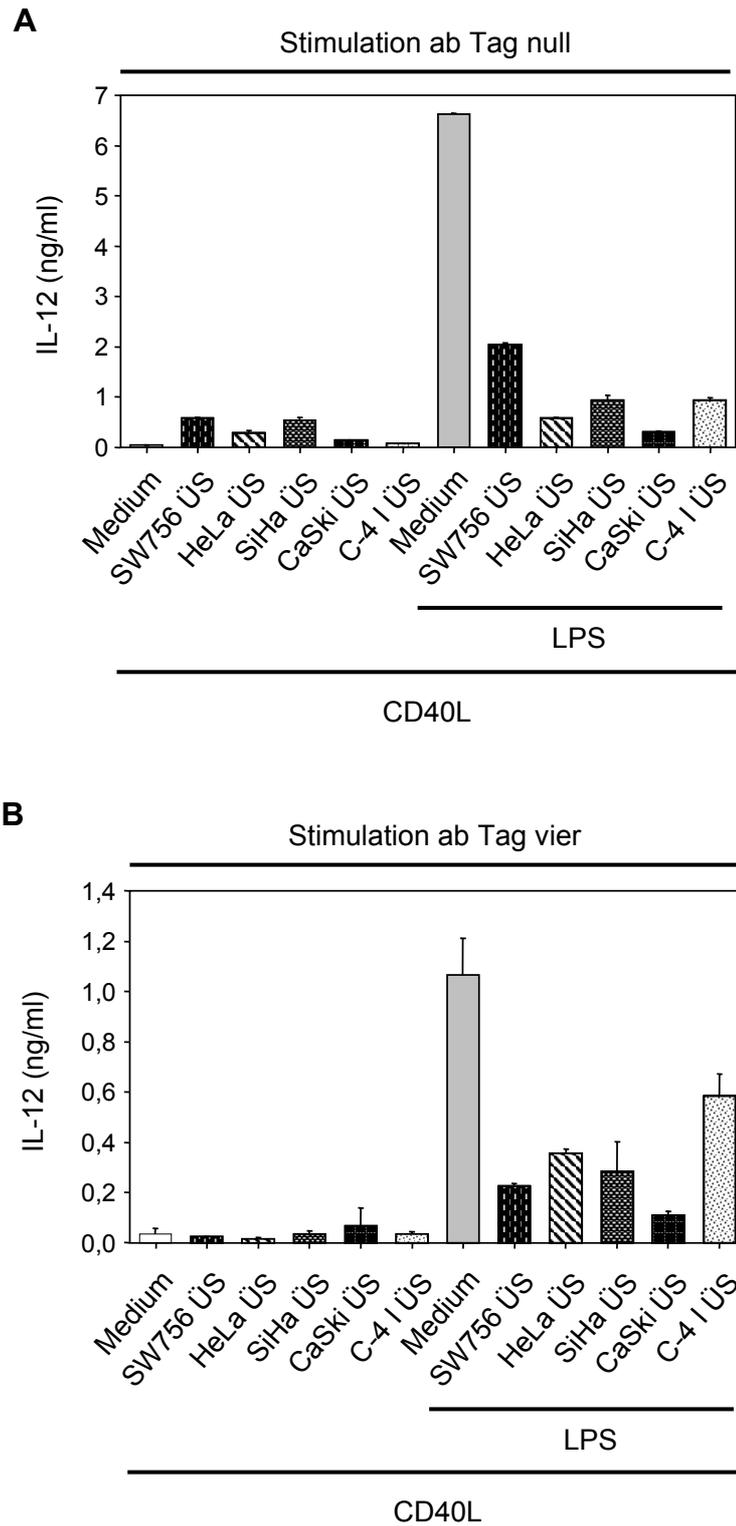
**Abbildung 12: STAT3 Expression in zervikalen intraepithelialen Neoplasien und dem Zervixkarzinom.** Phospho-STAT3<sup>(Ty705)</sup> wurde mit einem polyklonalen Antikörper immunhistochemisch in 5µM Paraffin-Schnitten nachgewiesen. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin (A-D) oder anti Phospho-STAT3<sup>(Ty705)</sup> Antikörpern (E-H) gefärbt. Die Darstellung zeigt eine CIN I (A und E), CIN II (B und F), CIN III Läsion (C und G) und ein Zervixkarzinom (SCC, D und H). Vergrößerung 250X.

### **3.2. Parakrine Wirkung von Zervixkarzinomzellen auf dendritische Zellen**

Im zweiten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob Zervixkarzinomzellen in der Lage sind, immunkompetente Zellen zu beeinflussen und ob IL-6 hierbei eine Rolle spielt.

#### **3.2.1. Tumorzell-Überstände reprimieren die IL-12 Produktion von DC**

DC wurden entweder von Tag null an oder ab Tag vier mit Tumorzell-Überständen kultiviert und am Tag sechs für 8h mit LPS behandelt, gefolgt von einer 24h Inkubation mit PFA-fixierten BHK<sub>CD40L</sub> Zellen. Dabei lieferte LPS das pro-inflammatorische Signal, während die BHK<sub>CD40L</sub> Zellen das T-Zell Signal imitierten, das zur IL-12 Produktion benötigt wird. Als Negativ-Kontrolle wurden zudem BHK<sub>wt</sub> Zellen verwendet, die im Vergleich zu BHK<sub>CD40L</sub> keinen CD40 Liganden exprimieren. Die zellfreien Überstände wurden schließlich auf ihren IL-12 Gehalt untersucht. Die Behandlung mit BHK<sub>wt</sub> Zellen führte nicht zu einem Anstieg der IL-12 Produktion (Daten nicht gezeigt). Wie in Abbildung 13A dargestellt, kam es durch SW756, HeLa und SiHa Tumorzell-Überstände zu einer leichten Induktion der IL-12 Expression gegenüber dem Mediumwert. Nach der Stimulation mit LPS/CD40L zeigte die Medium-Kontrolle eine drastische Induktion der IL-12 Produktion, die durch alle verwendeten Tumorzell-Überstände deutlich reprimiert wurde. In mehreren Versuchen reprimierte SW756 Überstand um durchschnittlich 85%, HeLa Überstand um 94%, SiHa Überstand um 88%, CaSki Überstand um 97% und C-4 I Überstand um 78% gegenüber der Kontrolle (Tabelle 1). Die LPS-induzierte IL-12 Produktion ohne Tumorzell-Überstände aus drei bis sieben unabhängigen Experimenten wurde dabei auf 100% Induktion gesetzt und so der Prozentsatz an Inhibition berechnet. Die Repression war auch zu beobachten, wenn die DC nicht von Anfang an, sondern erst ab Tag vier mit den Tumorzell-Überständen kultiviert wurden (Abbildung 13B).



**Abbildung 13: Tumorzell-Überstände reprimieren IL-12 Expression in DC.** (A) DC wurden für sechs Tage mit Medium oder den angegebenen Tumorzell-Überständen (ÜS) stimuliert. Dann wurde Medium oder 250ng/ml LPS für 8h zugegeben, gefolgt von einer 24h Inkubation mit BHK<sub>CD40L</sub> Zellen (Verhältnis DC:BHK<sub>CD40L</sub> 1:3). Der IL-12 Gehalt der zellfreien Überstände wurde mittels ELISA analysiert.

(B) DC wurden ab Tag vier mit Medium oder den angegebenen Tumorzell-Überständen kultiviert. An Tag sechs wurde mit Medium oder 250ng/ml LPS für 8h stimuliert, gefolgt von einer 24h Inkubation mit BHK<sub>CD40L</sub> Zellen (Verhältnis DC:BHK<sub>CD40L</sub> 1:3). Der IL-12 Gehalt der zellfreien Überstände wurde mittels ELISA analysiert.

**Tabelle 1: Überstände von Zervixkarzinomzellen reprimieren LPS-induzierte IL-12 Expression in DC (Stimulation ab Tag null)**

	<u><u>% Inhibition</u></u>
Medium <sup>n=7</sup>	0 ± 0
SW756 ÜS <sup>n=5</sup>	<b>85 ± 16</b>
HeLa ÜS <sup>n=6</sup>	<b>94 ± 7</b>
SiHa ÜS <sup>n=5</sup>	<b>88 ± 10</b>
Caski ÜS <sup>n=3</sup>	<b>97 ± 2</b>
C-4 I ÜS <sup>n=4</sup>	<b>78 ± 34</b>

<sup>n</sup> = Anzahl der einzelnen Experimente

### 3.2.2. Zytokinprofil von Zervixkarzinomzellen

Um festzustellen, welche löslichen Faktoren der Tumorzellen für die Repression der IL-12 Expression verantwortlich sind, wurden alle Überstände auf ihren Zytokingehalt untersucht. Dazu wurden die jeweiligen Zelllinien zu  $1 \times 10^6$  Zellen/ml ausgesät, das Medium nach 24h durch frisches Vollmedium ersetzt und nach weiteren 24h die Überstände gesammelt, zentrifugiert und mittels ELISA untersucht. Die Zelllinien HeLa, CaSki und C-4 I zeigten eine IL-6 Produktion von ca. 0,5 - 1,3ng/ml, während SiHa Zellen durchschnittlich 5,3ng/ml und SW756 Zellen im Mittel 14,3ng/ml IL-6 sezernierten. Alle Zelllinien zeigten zudem eine moderate TGF $\beta$  Expression von ca. 0,1 - 0,6ng/ml (Tabelle 2). Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichungen von zwei bis sechs unabhängig hergestellten Überständen. Im Gegensatz dazu lagen die TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\beta$ , TGF $\alpha$ , M-CSF und IL-10 Produktion der untersuchten Zelllinien unterhalb der jeweiligen Nachweisgrenze (Tabelle 2 und Daten nicht gezeigt).

**Tabelle 2: Zytokin-Expressionsmuster verschiedener Zervixkarzinom-Zelllinien (1x10<sup>6</sup> Zellen/ml)**

	<u>IL-6 (ng/ml)</u>	<u>TGFβ (ng/ml)</u>	<u>IL-10 (ng/ml)</u>
SW756 ÜS n=6	<b>14,3 ± 5,7</b>	<b>0,6 ± 0,0</b>	u.N.*
HeLa ÜS n=3	<b>1,3 ± 1,2</b>	<b>0,5 ± 0,0</b>	u.N.
SiHa ÜS n=2	<b>5,3 ± 2,2</b>	<b>0,3 ± 0,1</b>	u.N.
CaSki ÜS n=3	<b>0,5 ± 0,2</b>	<b>0,5 ± 0,0</b>	u.N.
C-4 I ÜS n=2	<b>0,6 ± 0,1</b>	<b>0,1 ± 0,0</b>	u.N.

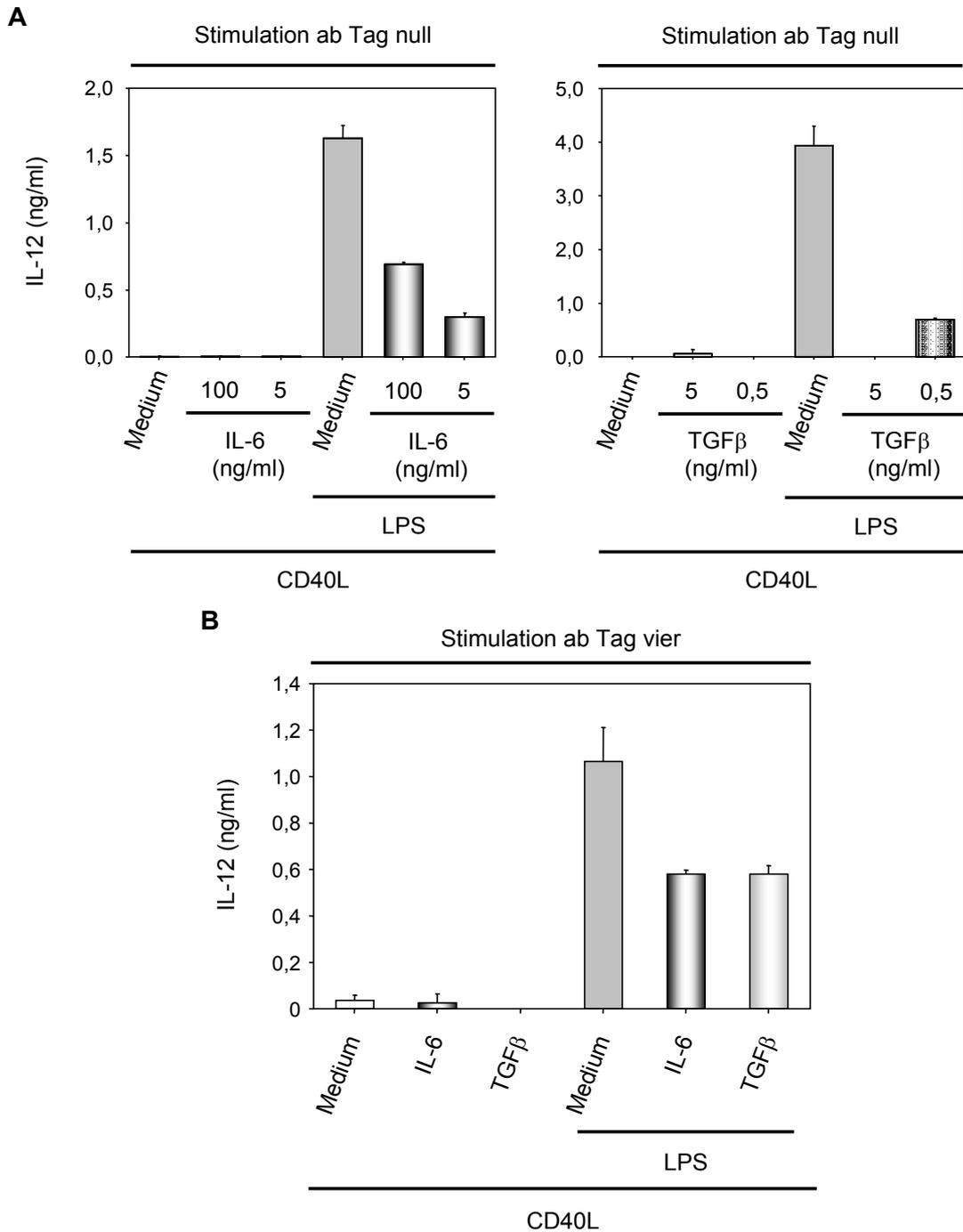
<sup>n</sup> = Anzahl der einzelnen Überstände

\* unterhalb der Nachweisgrenze

### 3.2.3. IL-6 und TGFβ reprimieren die IL-12 Produktion von DC

Da alle untersuchten Zervixkarzinom-Zelllinien IL-6 und TGFβ exprimieren, wurde untersucht, ob diese Faktoren einen Einfluss auf die LPS-induzierte IL-12 Produktion durch DC haben. Zu diesem Zweck wurden DC ab Tag null oder ab Tag vier mit den angegebenen Konzentrationen IL-6 oder TGFβ kultiviert. An Tag sechs wurden die Zellen wie oben beschrieben für 8h mit LPS und im Anschluss für 24h mit PFA-fixierten BHK<sub>CD40L</sub> Zellen stimuliert. Die Überstände wurden gesammelt, zentrifugiert und mittels ELISA untersucht. Beide IL-6 Konzentrationen führten zu einer deutlichen Repression der LPS/CD40L-induzierten IL-12 Produktion (Abbildung 14A). Dabei reduzierten 100ng/ml IL-6 die IL-12 Produktion um 54%, eine geringere IL-6 Konzentration (5ng/ml) war sogar mit einer Repression um 65% aktiver (Tabelle 3). Noch deutlichere Effekte waren durch die Behandlung mit TGFβ zu verzeichnen. 5ng/ml TGFβ reprimierte die LPS/CD40L-induzierte IL-12 Produktion vollständig und 0,5ng/ml TGFβ um 82% (Abbildung 14A und Tabelle 3). Die LPS/CD40L-induzierte IL-12 Produktion aus ein bis sechs unabhängigen Experimenten wurde dabei auf 100% Induktion gesetzt und so der Prozentsatz an Inhibition berechnet. Die Repression war auch zu beobachten, wenn die DC erst ab Tag vier mit den Zytokinen behandelt wurden (Abbildung 14B). Hier wurde eine IL-6 Dosis gewählt, die mit 25ng/ml etwas über der höchsten von der Zervixkarzinom-

Zelllinie SW756 produzierten IL-6 Konzentration lag. Beide Zytokine führten ohne die Zugabe eines Reifungs-Stimulus (LPS) nicht zur Induktion von IL-12.



**Abbildung 14: IL-6 und TGFβ reprimieren IL-12 Expression in DC. (A)** DC wurden für sechs Tage mit Medium oder den angegebenen Konzentrationen IL-6 und TGFβ kultiviert. Die Zellen wurden mit Medium oder 250ng/ml LPS für 8h stimuliert, gefolgt von einer 24h Inkubation mit BHK<sub>CD40L</sub> Zellen (Verhältnis DC:BHK<sub>CD40L</sub> 1:3). Der IL-12 Gehalt der zellfreien Überstände wurde mittels ELISA analysiert.

**(B)** DC wurden ab Tag vier mit Medium, 100ng/ml IL-6 oder 0,5ng/ml TGFβ kultiviert. Die Zellen wurden mit Medium oder 250ng/ml LPS für 8h stimuliert, gefolgt von einer 24h Inkubation mit BHK<sub>CD40L</sub> Zellen (Verhältnis DC:BHK<sub>CD40L</sub> 1:3). Der IL-12 Gehalt der zellfreien Überstände wurde mittels ELISA analysiert.

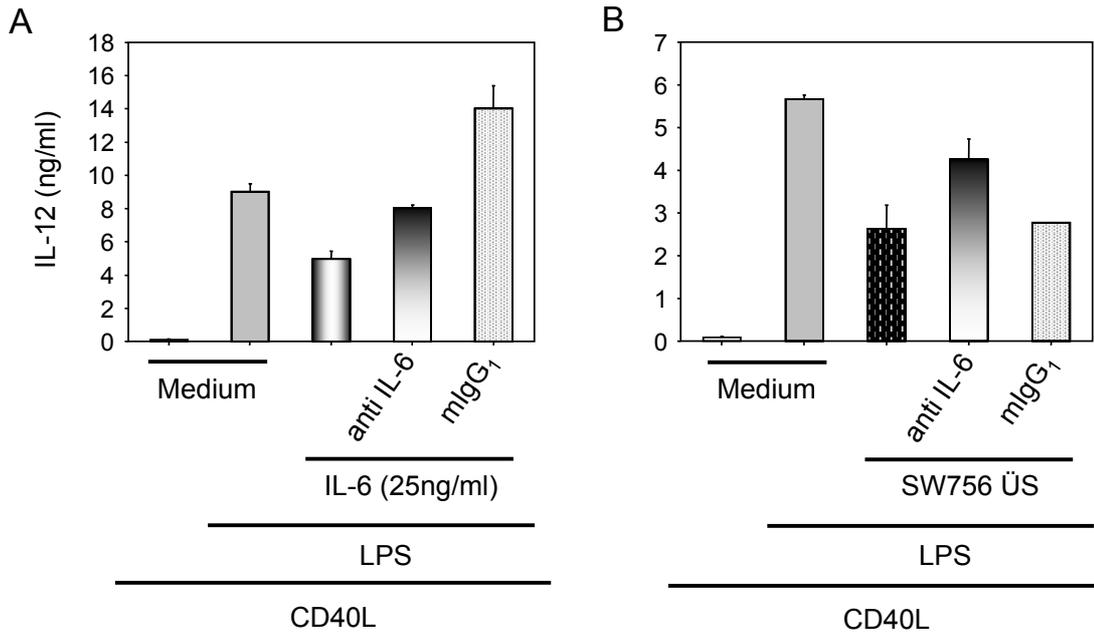
**Tabelle 3: IL-6 und TGFβ reprimieren IL-12 Expression in DC (Stimulation ab Tag null)**

	% Inhibition
Medium <sup>n=6</sup>	0 ±0
IL-6 100ng/ml <sup>n=6</sup>	<b>54 ±16</b>
IL-6 5ng/ml <sup>n=4</sup>	<b>65 ±7</b>
TGFβ 5ng/ml <sup>n=1</sup>	<b>100 ±0</b>
TGFβ 0,5ng/ml <sup>n=1</sup>	<b>82 ±0</b>

<sup>n</sup> = Anzahl der einzelnen Experimente

### **3.2.4. Neutralisation von IL-6 hebt die Tumorzell-Überstand-vermittelte IL-12 Repression in LPS-behandelten DC teilweise wieder auf**

Um zu untersuchen, ob das von SW756 Zellen sezernierte IL-6 für die Repression der IL-12 Produktion mitverantwortlich ist, wurden Neutralisations-Experimente durchgeführt. DC wurden für vier Tage kultiviert. Ab Tag vier wurden die Zellen mit Medium, IL-6 oder SW756 Tumorzell-Überstand und dem IL-6-neutralisierenden Antikörper oder einer Isotyp-Kontrolle inkubiert. An Tag sechs wurden die Zellen für 8h mit LPS und im Anschluss für 24h mit PFA-fixierten BHK<sub>CD40L</sub> Zellen stimuliert. Die Überstände wurden gesammelt, zentrifugiert und mittels ELISA untersucht. Die IL-6-vermittelte Repression der IL-12 Produktion wurde durch die Behandlung mit IL-6-neutralisierenden Antikörpern weitgehend aufgehoben. Allerdings führte ein unspezifischer Antikörper desselben Isotyps sogar zu einer Induktion der IL-12 Expression im Vergleich zur LPS-stimulierten Kontrolle ohne Antikörper Zugabe (Abbildung 15A). Die Stimulation mit SW756 Tumorzell-Überstand zeigte in diesem Versuch ebenfalls eine Repression der LPS-induzierten IL-12 Produktion.



**Abbildung 15: IL-6 Neutralisation hebt die SW756 Überstand-vermittelte IL-12 Repression teilweise wieder auf. (A)** DC wurden ab Tag vier mit Medium oder 25ng/ml IL-6 in An- oder Abwesenheit eines IL-6 neutralisierenden Antikörpers oder einer unspezifischen Isotyp-Kontrolle (mlgG<sub>1</sub>) kultiviert. Die Zellen wurden mit Medium oder 250ng/ml LPS für 8h stimuliert, gefolgt von einer 24h Inkubation mit BHK<sub>CD40L</sub> Zellen (Verhältnis DC:BHK<sub>CD40L</sub> 1:3). Der IL-12 Gehalt der zellfreien Überstände wurde mittels ELISA analysiert. **(B)** DC wurden ab Tag vier mit Medium oder SW756 Überständen in An- oder Abwesenheit eines IL-6 neutralisierenden Antikörpers oder einer unspezifischen Isotyp-Kontrolle (mlgG<sub>1</sub>) kultiviert. Die Zellen wurden mit Medium oder 250ng/ml LPS für 8h stimuliert, gefolgt von einer 24h Inkubation mit BHK<sub>CD40L</sub> Zellen (Verhältnis DC:BHK<sub>CD40L</sub> 1:3). Der IL-12 Gehalt der zellfreien Überstände wurde mittels ELISA analysiert.

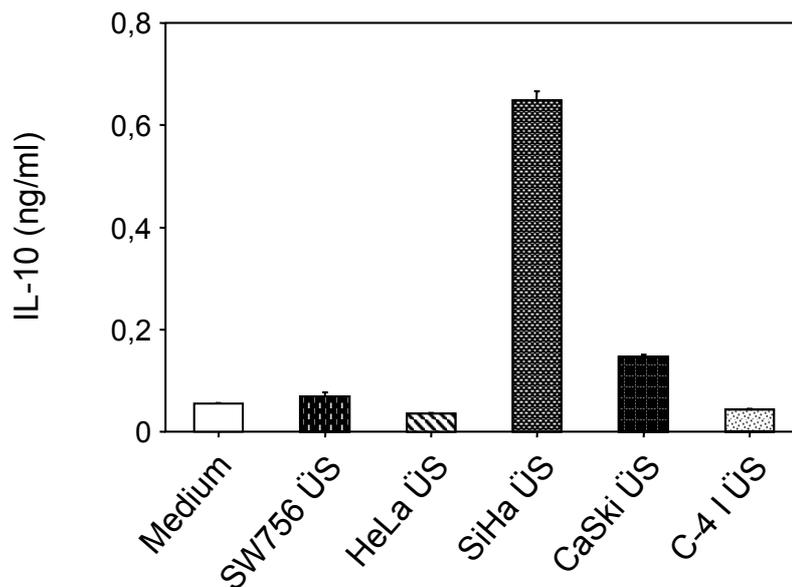
Durch die Zugabe des neutralisierenden Antikörpers wurde diese Repression wieder verringert (Abbildung 15B). Die unspezifische Reaktion der Isotyp-Kontrolle wurde hier nicht beobachtet. Dieses Experiment wurde jeweils einmal durchgeführt.

### 3.2.5. Mechanismen der IL-12 Repression durch IL-6 und TGFβ

In weiteren Experimenten sollte geklärt werden, wie es zur Tumorzell-Überstand- bzw. IL-6-vermittelten Repression der IL-12 Produktion kommt. Aus diesem Grund wurden verschiedene IL-12-regulierende, wie auch IL-6-induzierbare Faktoren untersucht.

### 3.2.5.1. Induktion der IL-10 Expression von DC durch Tumorzell-Überstände

Um zu überprüfen, ob die Tumorzell-Überstände eventuell die Produktion von IL-10, einem negativen Regulator der IL-12 Expression induzieren, wurden die Zellen wie bereits beschrieben für vier Tage kultiviert, an Tag vier mit den Tumorzell-Überständen stimuliert und an Tag sechs die Überstände abgenommen. Diese zellfreien Überstände wurden anschließend auf ihren IL-10 Gehalt mittels ELISA untersucht. Lediglich SiHa Überstände führten zu einer Induktion von IL-10 gegenüber der Medium-Kontrolle (Abbildung 16). Insgesamt wurden jedoch nur sehr geringe Mengen (0,02 bis 0,65ng/ml) IL-10 produziert. Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus ein bis drei unabhängigen Experimenten.

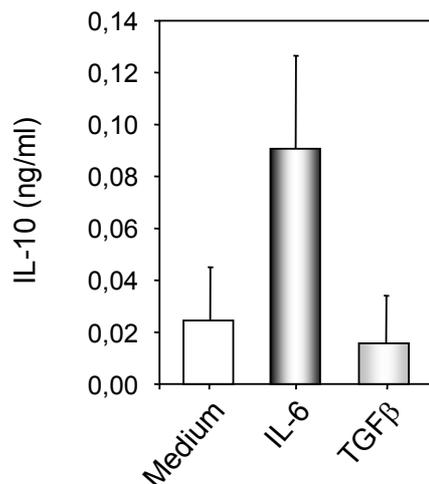


**Abbildung 16: Tumorzell-Überstände induzieren geringe Mengen IL-10 in DC.** DC wurden ab Tag vier mit Medium oder den angegebenen Tumorzell-Überständen kultiviert und an Tag sechs die Überstände gesammelt. Der IL-10 Gehalt der zellfreien Überstände wurde mittels ELISA analysiert.

### 3.2.5.2. Induktion der IL-10 Expression von DC durch IL-6

Um zu untersuchen, ob IL-6 und TGF $\beta$  die Produktion von IL-10 induzieren, wurden die Zellen wie bereits beschrieben für vier Tage kultiviert, an Tag vier mit Medium, IL-6 oder TGF $\beta$  stimuliert und an Tag sechs die Überstände

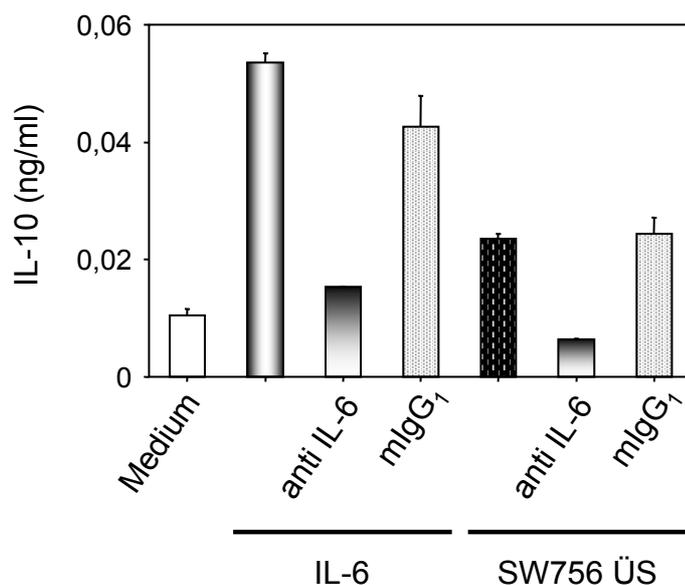
abgenommen. Diese zellfreien Überstände wurden anschließend auf ihren IL-10 Gehalt mittels ELISA untersucht. Die Behandlung mit IL-6 führte zu einer leichten Induktion der IL-10 Produktion, während die Zugabe von TGF $\beta$  keinen Einfluss auf die IL-10 Expression zeigte (Abbildung 17). Auch in diesem Fall kam es nur zu einer sehr geringen Expression um ca. 0,1ng/ml von IL-10. Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei bis vier unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 17: IL-6 induziert eine geringe IL-10 Produktion in DC.** DC wurden ab Tag vier mit Medium, 100ng/ml IL-6 oder 0,5ng/ml TGF $\beta$  kultiviert und an Tag sechs die Überstände gesammelt. Der IL-10 Gehalt der zellfreien Überstände wurde mittels ELISA analysiert.

### 3.2.5.3. IL-10 Produktion nach Neutralisation von IL-6

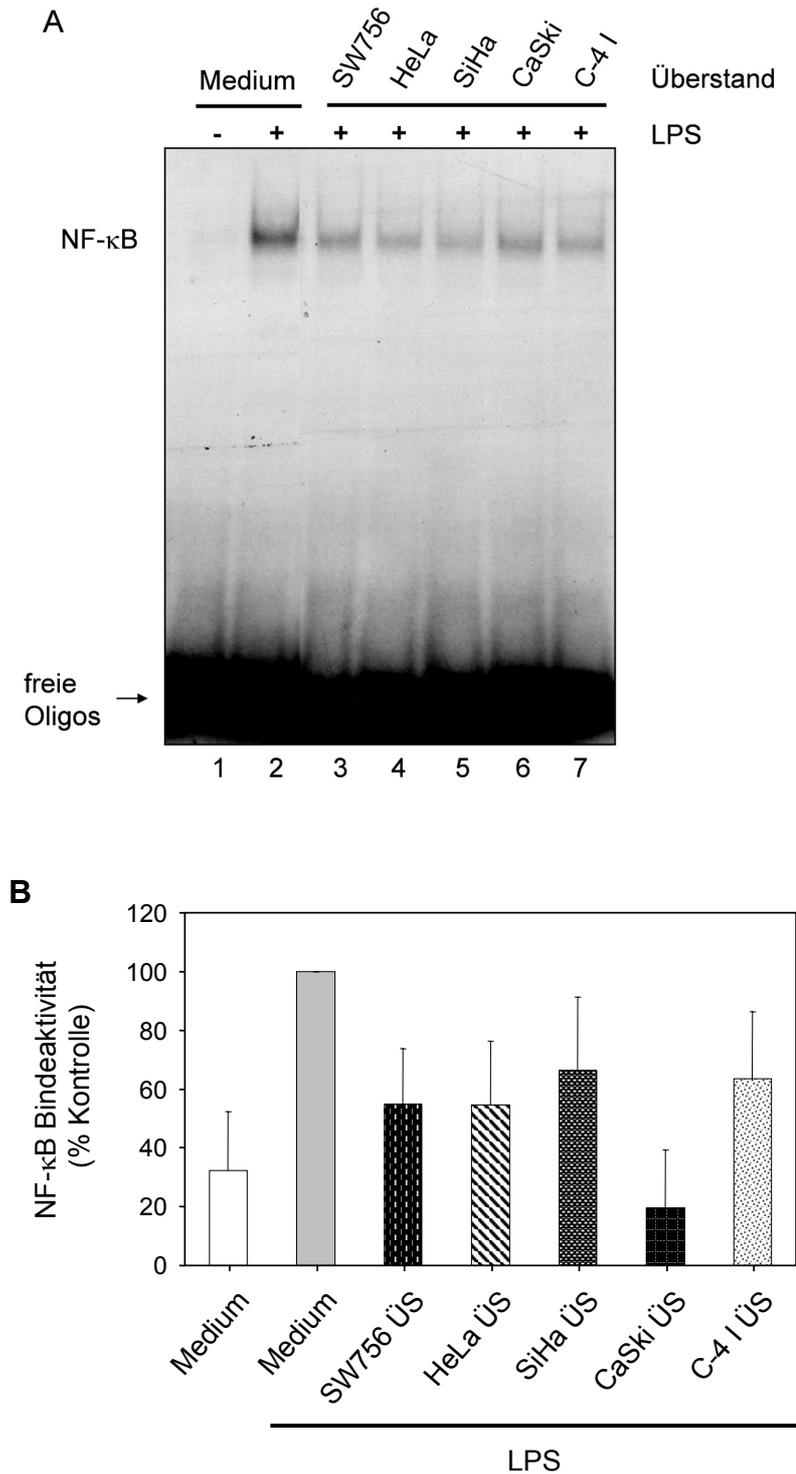
Um zu überprüfen, ob die Neutralisation von IL-6 in Tumorzell-Überständen einen Einfluss auf die Induktion von IL-10 durch DC hat, wurden die Zellen wie bereits beschrieben für vier Tage kultiviert. An Tag vier wurden die DC mit Medium, IL-6 oder SW756 Tumorzell-Überstand und dem IL-6-neutralisierenden Antikörper oder einer Isotyp-Kontrolle inkubiert. Nach 48h wurden die Überstände gesammelt und auf ihren IL-10 Gehalt mittels ELISA untersucht. Sowohl IL-6 als auch SW756 Überstand führten zu einer leichten Induktion der IL-10 Produktion (Abbildung 18). Die Zugabe von IL-6 neutralisierenden Antikörpern verringerte diese IL-10 Produktion nahezu auf den Wert der Medium-Kontrolle. Auch hier waren insgesamt nur sehr geringe Mengen (0,006 bis 0,055ng/ml) IL-10 nachweisbar.



**Abbildung 18: IL-6 Neutralisation hebt die SW756-vermittelte IL-10 Induktion wieder auf.** DC wurden ab Tag vier mit Medium, 25ng/ml IL-6 oder SW756 Überständen in An- oder Abwesenheit eines IL-6 neutralisierenden Antikörpers oder einer unspezifischen Isotyp-Kontrolle kultiviert und an Tag sechs die Überstände gesammelt. Der IL-10 Gehalt der zellfreien Überstände wurde mittels ELISA analysiert.

### 3.2.5.4. Tumorzell-Überstände reprimieren die NF- $\kappa$ B Bindeaktivität

Die Expression von IL-12 wird durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B reguliert. Um zu überprüfen, ob Tumorzell-Überstände die NF- $\kappa$ B Aktivierung in dendritischen Zellen beeinflussen, wurden DC mit den entsprechenden Tumorzell-Überständen kultiviert und an Tag sechs für 2h mit LPS stimuliert. Es wurden Kernextrakte hergestellt und jeweils 5 $\mu$ g im EMSA aufgetragen. Innerhalb von 2h kam es zu einer Induktion der NF- $\kappa$ B Bindeaktivität durch LPS gegenüber dem Mediumwert. Die Inkubation mit Tumorzell-Überständen führte zu einer Repression dieser NF- $\kappa$ B Bindeaktivität (Abbildung 19A). SW756 und HeLa Überstände zeigten dabei eine Repression um ca. 45%, SiHa und C-4 I um 35% und CaSki Überstände um bis zu 80% gegenüber der LPS-induzierten Bindeaktivität der Positiv-Kontrolle (Abbildung 19B).

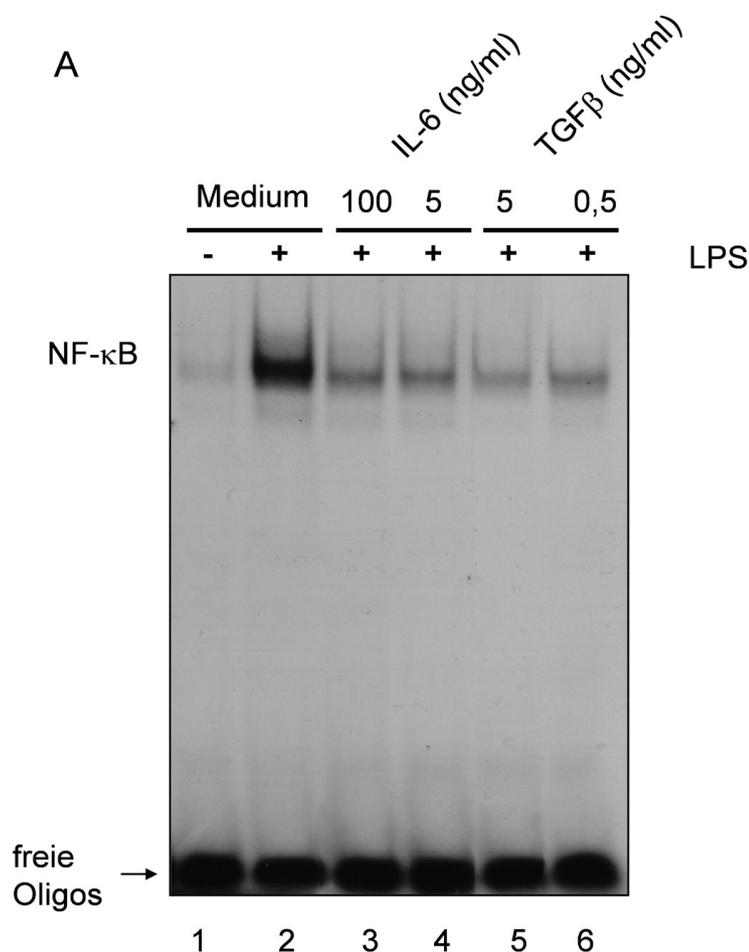


**Abbildung 19: Tumorzell-Überstände reprimieren NF-κB Bindeaktivität in DC. (A)** DC wurden mit Medium (Spuren 1 und 2) oder den angegebenen Tumorzell-Überständen (Spuren 3-7) kultiviert und an Tag sechs für 2h mit Medium (Spur 1) oder 250ng/ml LPS (Spuren 2-7) stimuliert. Kernextrakte wurden präpariert und mittels eines NF-κB spezifischen Oligos im EMSA untersucht.

**(B)** Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus zwei bis sechs unabhängigen Experimenten. Eine Quantifizierung der EMSA, mit Hilfe der QuantityOne Software der Firma BioRad, ergab die x-fache NF-κB Bindeaktivität. Die NF-κB Bindeaktivität der LPS-stimulierten Zellen ohne Tumorzell-Überstände wurde auf 100% gesetzt.

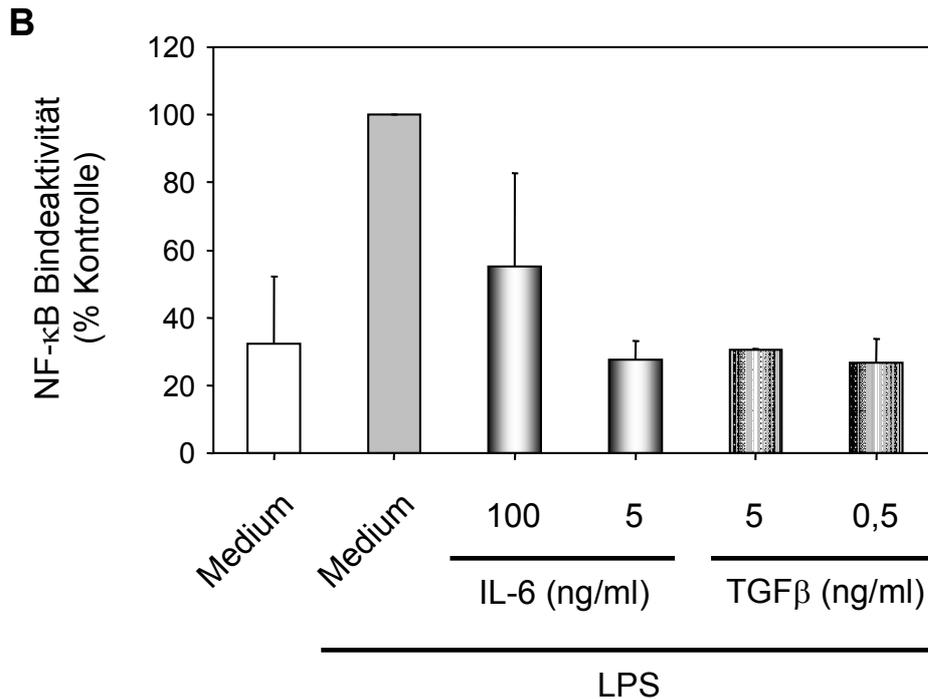
### 3.2.5.5. IL-6 und TGF $\beta$ reprimieren die NF- $\kappa$ B Bindeaktivität

Sowohl IL-6 als auch TGF $\beta$  führten zu einer Reduktion der LPS-induzierten NF- $\kappa$ B Bindeaktivität (Abbildung 20A).



**Abbildung 20: IL-6 und TGF $\beta$  reprimieren NF- $\kappa$ B Bindeaktivität in DC. (A)** DC wurden mit Medium (Spuren 1 und 2) oder den angegebenen Konzentrationen IL-6 (Spuren 3 und 4) oder TGF $\beta$  (Spuren 5 und 6) kultiviert, und an Tag sechs für 2h mit Medium (Spur 1) oder 250ng/ml LPS (Spuren 2-6) stimuliert. Kernextrakte wurden präpariert und mittels eines NF- $\kappa$ B spezifischen Oligos im EMSA untersucht.

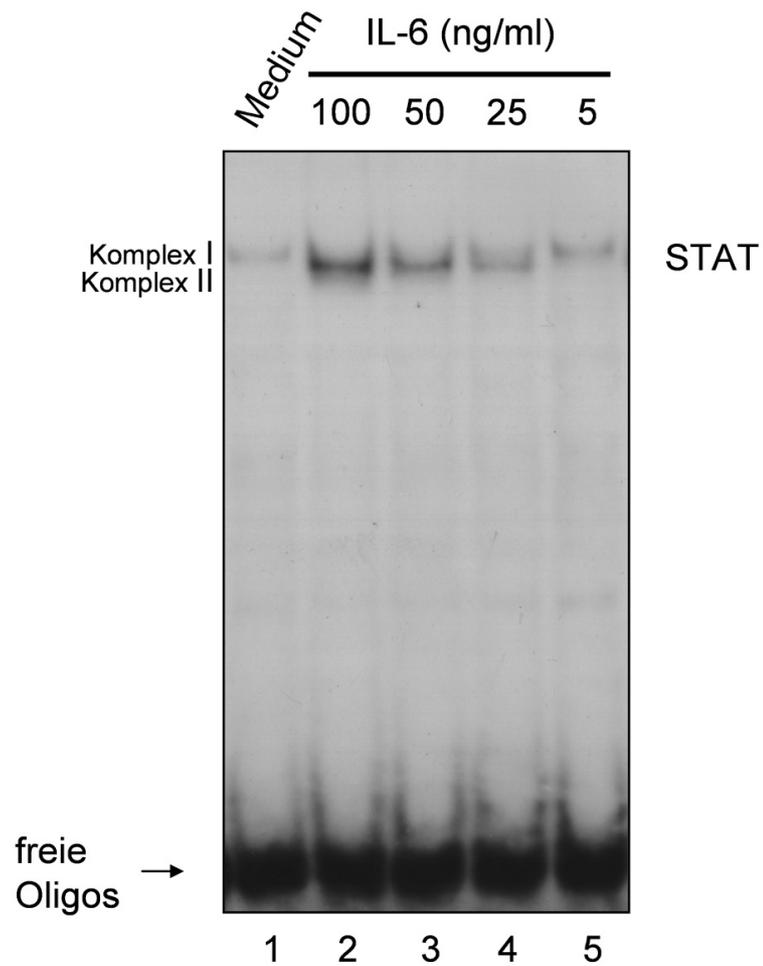
100ng/ml IL-6 reprimierten die Bindeaktivität um 45%, 5ng/ml um 73%. Die Behandlung mit TGF $\beta$  zeigte ein ähnliches Ergebnis. 5ng/ml TGF $\beta$  reprimierten die LPS-induzierte NF- $\kappa$ B Bindeaktivität um 70% und 0,5ng/ml TGF $\beta$  um 73% (Abbildung 20B) gegenüber der Kontrolle.



**Abbildung 20: IL-6 und TGFβ reprimieren NF-κB Bindeaktivität in DC. (B)** Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus zwei bis sechs unabhängigen Experimenten. Eine Quantifizierung der EMSA, mit Hilfe der QuantityOne Software der Firma BioRad, ergab die x-fache NF-κB Bindeaktivität. Die NF-κB Bindeaktivität der LPS-stimulierten Zellen ohne Tumorzell-Überstände wurde auf 100% gesetzt.

### 3.2.5.6. IL-6 aktiviert konzentrationsabhängig STAT3 in DC

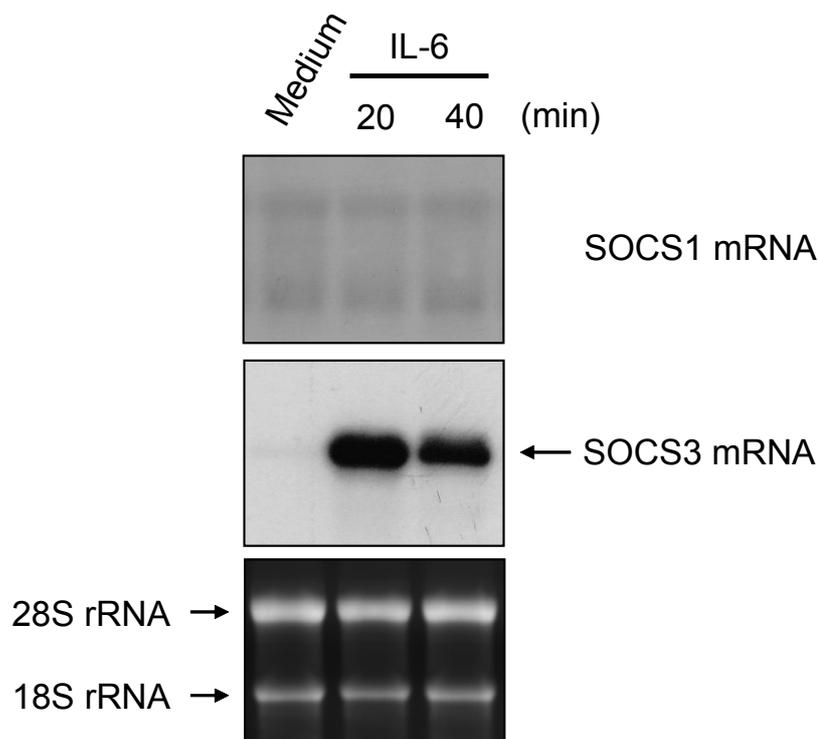
Um die Aktivierung von STAT Faktoren durch IL-6 zu untersuchen, wurden die DC für vier Tage kultiviert und für 15min mit den angegebenen Konzentrationen an IL-6 stimuliert. Es wurden Kernextrakte hergestellt und jeweils 5µg im EMSA aufgetragen. IL-6 führt konzentrationsabhängig zur Aktivierung von STAT3 in DC. Unstimulierte DC enthielten einen schwachen, nicht-induzierbaren Komplex I. Nach der Stimulation mit 100 oder 50ng/ml IL-6 zeigte sich ein stark-induzierbarer, neuer Komplex (Komplex II). Die Bildung dieses Komplexes wurde durch 25ng/ml IL-6 nur leicht und durch 5ng/ml IL-6 nur noch sehr schwach induziert (Abbildung 21).



**Abbildung 21: IL-6 induziert konzentrationsabhängig STAT3 in DC.** DC wurden für vier Tage kultiviert, für 15min mit Medium (Spur 1) oder den angegebenen Konzentrationen an IL-6 (Spuren 2-5) stimuliert und Kernextrakte hergestellt. Diese wurden auf ihre STAT Bindeaktivität mittels EMSA untersucht. Dazu wurde als STAT spezifische Bindestelle die Sequenz des sis-induzierbaren Elements aus dem c-fos Promotor verwendet.

### 3.2.5.7. Einfluss von IL-6 auf die SOCS Transkription

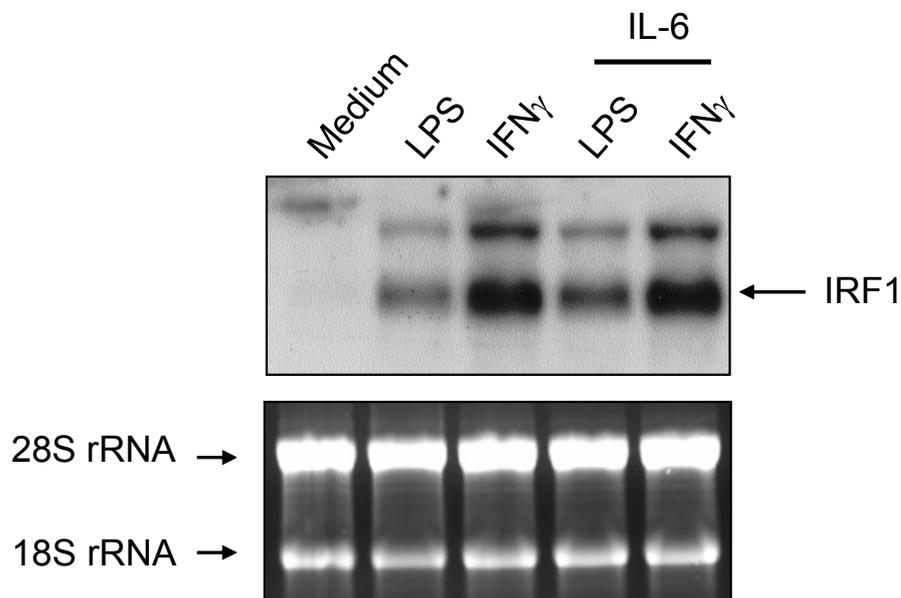
SOCS1 kann, wie bereits beschrieben, die LPS Signaltransduktion inhibieren und wird außerdem durch IL-6 reguliert (Starr *et al.*, 1997; Nakagawa *et al.*, 2002; Kiniyo *et al.*, 2002). Um zu überprüfen, ob IL-6 die SOCS Transkription in DC induzieren kann, wurden *Northern Blot* Analysen durchgeführt. Dazu wurden DC für vier Tage kultiviert, an Tag vier Medium oder IL-6 zugegeben und die RNA nach 20min oder 40min isoliert. Die Expression der SOCS1 mRNA wurde durch IL-6 nicht induziert (Abbildung 22). Im Gegensatz dazu führte die Stimulation mit IL-6 bereits innerhalb von 20min zu einer massiven Induktion der SOCS3 mRNA, die nach 40min Stimulation wieder leicht abnahm (Abbildung 22).



**Abbildung 22: IL-6 induziert die SOCS3 nicht jedoch SOCS1 mRNA Synthese in DC.** DC wurden an Tag vier für 20min bzw. 40min mit Medium oder 100ng/ml IL-6 stimuliert und die RNA präpariert. Je 5µg gesamte RNA wurde mittels *Northern Blot* untersucht. Die Markierung erfolgte mit den radioaktiven SOCS1 bzw. SOCS3 Sonden. Die 28S rRNA, 18S rRNA sowie die SOCS3 mRNA wurden mit Markierungen versehen.

### 3.2.5.8. Einfluss von IL-6 auf die IRF-1 Expression

Die Induktion weiterer IL-12-regulierender Transkriptionsfaktoren und deren Beeinflussung durch IL-6 wurde mittels *Northern Blots* untersucht. Dazu wurden DC kultiviert und an Tag vier mit IL-6 oder Medium inkubiert. Die Zellen wurden an Tag sechs für 4h mit LPS oder IFN $\gamma$  stimuliert und die RNA präpariert. Abbildung 23 zeigt, dass sowohl LPS als auch in stärkerem Maß IFN $\gamma$  IRF-1 mRNA Synthese induzierten. Diese Induktionen wurden durch die Zugabe von IL-6 nicht verändert.

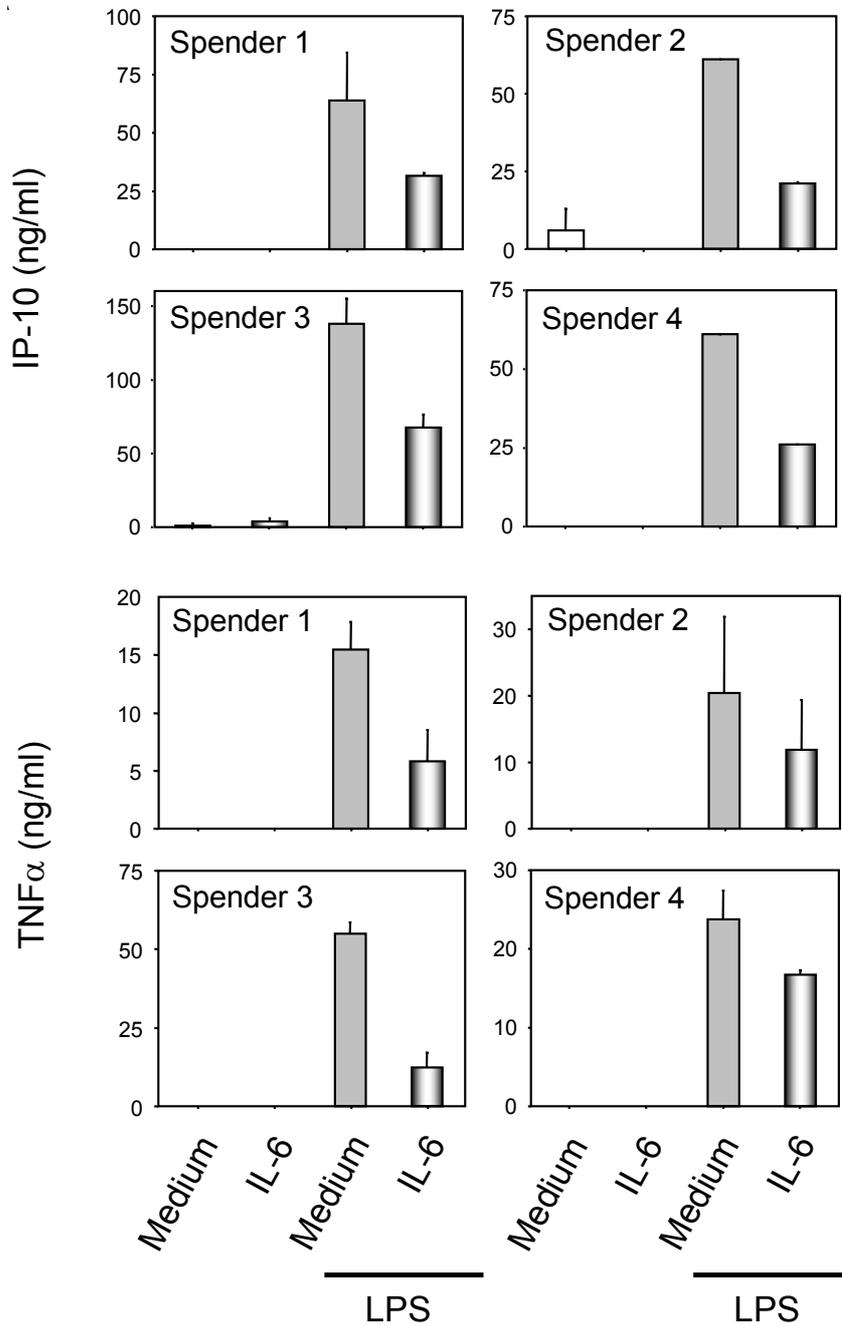


**Abbildung 23: LPS induziert die IRF-1 mRNA Synthese in DC.** DC wurden ab Tag vier mit Medium oder 100ng/ml IL-6 kultiviert, an Tag sechs für 4h mit Medium, 250ng/ml LPS oder 10U/ml IFN $\gamma$  stimuliert und die RNA präpariert. Je 5 $\mu$ g gesamte RNA wurde mittels *Northern Blot* untersucht. Die Markierung erfolgte mit einer radioaktiven IRF-1 Sonde. Die 28S rRNA, 18S rRNA sowie die IRF-1 mRNA wurden mit Markierungen versehen.

### 3.2.5.9. Einfluss von IL-6 auf pro-inflammatorische Moleküle

Weiterführend wurde untersucht, ob IL-6 neben der IL-12 Repression weitere Auswirkungen auf die Funktionen von DC haben kann. In diesem Zusammenhang wurde überprüft, ob IL-6 andere, pro-inflammatorische Moleküle, die durch NF- $\kappa$ B reguliert werden, inhibieren kann. Dazu wurden DC von vier verschiedenen Spendern in An- und Abwesenheit von IL-6 kultiviert. Am sechsten Tag wurden die Zellen mit LPS oder Medium als Kontrolle für 24h

stimuliert, am nächsten Tag die Überstände gesammelt und der Zytokingehalt untersucht. In Abbildung 24 ist gezeigt, dass sowohl die LPS-induzierte Produktion von IP-10 als auch  $\text{TNF}\alpha$  durch IL-6 reprimiert wurde.

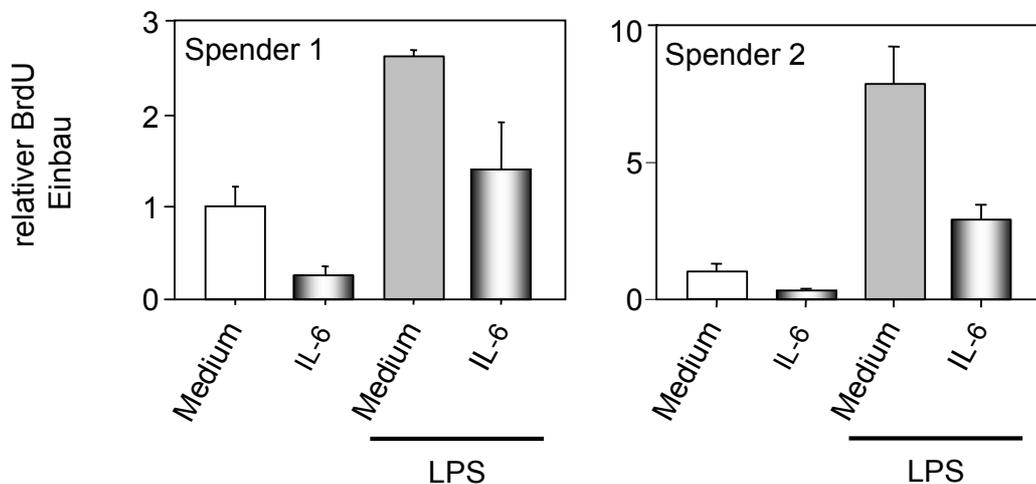


**Abbildung 24: IL-6 reprimiert die LPS-induzierte IP-10 und  $\text{TNF}\alpha$  Produktion.** DC von vier verschiedenen Spendern wurden mit Medium oder 100ng/ml IL-6 kultiviert. Am Tag sechs wurden die Zellen mit Medium oder 250ng/ml LPS für 24h stimuliert. Der IP-10 und  $\text{TNF}\alpha$  Gehalt der zellfreien Überstände wurde mittels ELISA analysiert.

### 3.2.6. Wirkung von IL-6 auf die Interaktion von DC mit T-Helferzellen

#### 3.2.6.1. Eingeschränkte, allogene T-Helferzell-Stimulation durch IL-6

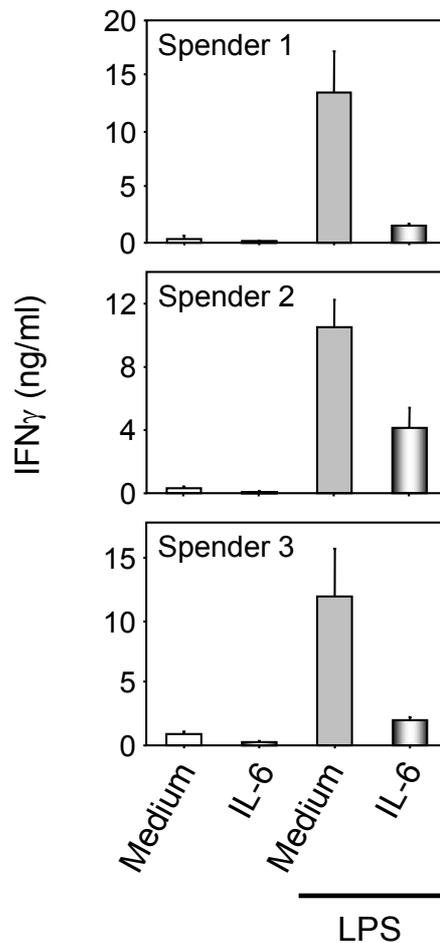
Da IL-6 vielfältige Einflüsse auf die Zellen des Immunsystems haben kann, war es interessant zu untersuchen, ob IL-6 auch eine Wirkung auf die DC-vermittelte Aktivierung von T-Zell Antworten haben kann. Für diesen Zweck wurden gemischte, allogene Lymphozyten Reaktionsanalysen (MLR) durchgeführt. DC wurden mit Medium oder IL-6 vorbehandelt und für 16h mit LPS oder Medium als Kontrolle aktiviert. Nach fünf Tagen einer Kokultur mit naiven, allogenen T-Helferzellen (TC) wurde der BrdU Einbau der T-Zell Fraktion gemessen. IL-6 unterdrückte die Induktion der allogenen T-Zell Proliferation durch DC (Verhältnis DC:TC 1:200) unabhängig davon, ob die DC zunächst mit LPS aktiviert wurden oder nicht (Abbildung 25). Ähnliche Ergebnisse lieferten zwei unabhängige MLR Experimente mit verschiedenen Spendern und einem DC:TC Verhältnis von 1:2 und 1:20 (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 25: Eingeschränkte, allogene T-Helferzell-Stimulation durch IL-6.** DC zweier Spender wurden für sieben Tage mit Medium oder 100ng/ml IL-6 kultiviert, an Tag sechs wurden die Zellen für die letzten 16h mit Medium oder 250ng/ml LPS stimuliert. CD4-positive, CD45R0-negative T-Zellen (TC) wurden in Duplikaten mit diesen DC in einem Verhältnis von DC:TC 1:200 für fünf Tage kokultiviert. Der Prozentsatz an CD3-gefärbten TC mit eingebautem BrdU wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Der BrdU Einbau der unstimulierten Zellen wurde auf 1 gesetzt.

### 3.2.6.2. IL-6 unterdrückt die IFN $\gamma$ Produktion von aktivierten T-Zellen

Die Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen hängt unter anderem von der Zytokinumgebung der Zellen ab, wobei IL-12 und IFN $\gamma$  die Entwicklung zu TH1-Zellen und IL-4 die Entwicklung zu TH2-Zellen fördert. Es blieb zu klären, ob neben der Unterdrückung der T-Zell Proliferation sowie der Suppression der LPS-induzierten IL-12 Produktion auch eine Veränderung der IFN $\gamma$  Expression zu beobachten war.



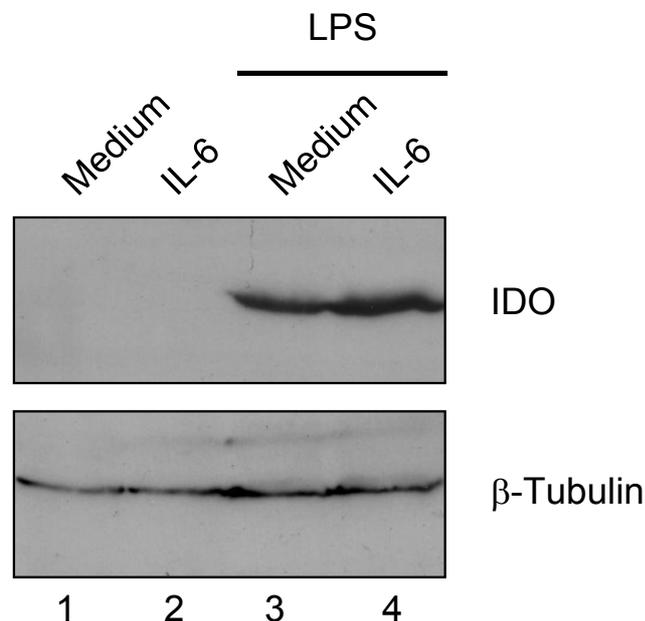
**Abbildung 26: IL-6 unterdrückt die IFN $\gamma$  Produktion von aktivierten T-Zellen.** DC wurden für sieben Tage mit Medium oder 100ng/ml IL-6 kultiviert, an Tag sechs wurden die Zellen für die letzten 16h mit Medium oder 250ng/ml LPS stimuliert. CD4-positive, CD45RO-negative T-Zellen (TC) wurden in Duplikaten mit diesen DC in einem Verhältnis von DC:TC 1:100 für fünf Tage kokultiviert. Überstände wurden gesammelt und auf ihren IFN $\gamma$  Gehalt mittels ELISA untersucht.

Zu diesem Zweck wurden MLR Experimente durchgeführt und am fünften Tag der Kokultur Überstände gesammelt. Die zellfreien Überstände wurden schließlich mittels ELISA auf ihren IFN $\gamma$  Gehalt untersucht. Eine Stimulation mit

LPS führte zu einer massiven IFN $\gamma$  Produktion bei drei untersuchten Spendern. Die Vorbehandlung mit IL-6 hingegen führte zu einer deutlichen Repression dieser LPS-induzierten IFN $\gamma$  Expression (Abbildung 26).

### 3.2.6.3. IDO Expression und IL-6

Die Expression von IDO führt zur Inhibition der T-Zell Proliferation sowie zur Induktion der Apoptose von T-Zellen *in vitro* und der Reduktion der T-Zell Antworten *in vivo*. Um zu überprüfen, ob die IL-6-vermittelte Repression der T-Zell Proliferation auf die Expression von IDO zurückzuführen ist, wurden DC für sechs Tage in An- und Abwesenheit von 100ng/ml IL-6 kultiviert. Am Tag sechs wurden die Zellen mit LPS oder Medium als Kontrolle aktiviert und nach 48h Ganzzellextrakte hergestellt. Der Nachweis der IDO Expression erfolgte mittels *Western Blot* Analyse. Abbildung 27 zeigt, dass es nach LPS Stimulation zu einer deutlichen Induktion der IDO Expression kam und dass diese Expression durch IL-6 nicht verändert wurde.



**Abbildung 27: IL-6 hat keinen Einfluss auf LPS-induzierte IDO Expression.** DC wurden mit Medium (Spuren 1 und 3) oder 100ng/ml IL-6 (Spuren 2 und 4) kultiviert, am Tag sechs mit Medium (Spuren 1 und 2) oder 50ng/ml LPS (Spuren 3 und 4) stimuliert und Ganzzellextrakte hergestellt. Jeweils 20 $\mu$ l Ganzzellextrakt wurden mittels *Western Blot* untersucht. Dazu wurden monoklonale anti IDO (obere Reihe) und, als Kontrolle für den gleichmäßigen Auftrag an Protein, anti  $\beta$ -Tubulin (untere Reihe) Antikörper verwendet.

## 4. Diskussion

In Abhängigkeit von seinen Zielzellen zeigt Interleukin-6 ein breites Spektrum an möglichen Aktivitäten, wie Modulation von Zellwachstum, Apoptose, Differenzierung, Proliferation, Expression zellulärer Gene und lokale sowie systemische Effekte auf das Immunsystem. Die Expression von IL-6 wird streng kontrolliert, doch in einigen malignen Tumoren kommt es zur Deregulation und konstitutiven Expression. IL-6 wird in invasiven Zervixkarzinomzellen *in situ* verstärkt exprimiert (Hess *et al.*, 2000). Eine erhöhte IL-6 Expression korreliert dabei mit einer schlechteren Prognose für den Krankheitsverlauf (Srivani und Nagarajan, 2003). Eine Vielzahl von (neu-) etablierten Zervixkarzinom-Zelllinien produzieren IL-6 konstitutiv *in vitro* (Eustace *et al.*, 1993; Hess *et al.*, 2000). Es wurde angenommen, dass IL-6, ähnlich wie beim multiplen Myelom, als autokriner Wachstumsfaktor für HPV-immortalisierte-Keratinocyten und Zervixkarzinomzellen fungiert (Eustace *et al.*, 1993). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Zellen des Zervixkarzinoms die IL-6-bindende Rezeptorkette gp80 kaum oder gar nicht exprimieren und damit nur mäßig auf autokrin produziertes IL-6 reagieren können (Bauknecht *et al.*, 1999; Hess *et al.*, 2000). Dies führte zu der Spekulation, dass Zervixkarzinomzellen möglicherweise von der gesteigerten IL-6 Produktion profitieren könnten, solange die intrazelluläre Signaltransduktion nur in einem geringen Maße stattfindet. In dieser Arbeit wurde untersucht, welche Konsequenzen eine Wiederherstellung der IL-6 Signaltransduktion mit Hilfe des löslichen gp80 Rezeptors (sgp80) in Zervixkarzinomzellen haben kann.

Zunächst konnten bereits bestehende Berichte über eine Beteiligung von IL-6 an der Proliferation bestätigt werden. Die Wiederherstellung der IL-6 Signaltransduktion führte zu einer gesteigerten Proliferation der HPV18-positiven Zervixkarzinom-Zelllinie SW756 und zudem zu einer rapiden Induktion des viralen Onkoproteins E7. Da die Gene E6 und E7 über einen gemeinsamen Promotor reguliert werden, ist es sehr wahrscheinlich, dass auch die E6 Expression induziert wurde. Leider fehlen zurzeit geeignete E6

spezifische Antikörper. Daher beschränkte sich der Nachweis auf das E7 Protein. In der Zukunft sollen jedoch für beide Proteine Untersuchungen auf mRNA Ebene durchgeführt werden. Neben der beobachteten Induktion von E7 kam es durch IL-6 zusätzlich zu einer gesteigerten Expression des zellulären Proto-Onkogens c-myc. Interessanterweise führte auch das IL-6 verwandte Zytokin OSM zu einer Induktion von c-myc. Dies galt nicht nur für die HPV18-positiven Karzinomzellen, sondern auch für die *in vitro* HPV16 transformierten nicht-malignen Zellen HPK1A.

Sowohl c-myc als auch die viralen Onkoproteine vermitteln den Fortschritt des Zellzyklus und die zelluläre Transformation. Andererseits verstärken sie auch die zelluläre Sensitivität für Apoptose (Hermeking und Eick, 1994; Routes *et al.*, 2005; Fan *et al.*, 2005; Fan und Chen, 2004; Thyrell *et al.*, 2005). So können hohe Expressionsspiegel von c-myc, wie auch HPV16 E6, Zellen für den TNF $\alpha$ -vermittelten Zelltod sensibilisieren (Klefstrom *et al.*, 1994; Janicke *et al.*, 1994; Filippova *et al.*, 2005). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Makrophagen HPV16 E6 exprimierende Tumorzellen durch einen TNF $\alpha$ - und Stickoxid-abhängigen Mechanismus abtöten können (Routes *et al.*, 2005). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob eine intakte IL-6 Signaltransduktion einen Einfluss auf den TNF $\alpha$ -vermittelten Zelltod HPV-positiver Zellen haben könnte. In Anwesenheit des Proteinsynthese Inhibitors CHX wurden HPV16- und HPV18-positiv Zervixkarzinomzellen, im Gegensatz zu nicht-malignen HPV-transformierten Zellen, für den TNF $\alpha$ -vermittelten Zelltod sensibilisiert. Sobald die Zellen mit IL-6 stimuliert wurden, kam es in allen untersuchten HPV-positiven Keratinozyten zu einer Sensibilisierung für die TNF $\alpha$ -vermittelte Apoptose. Im Falle der malignen Zellen wurde die IL-6 Signaltransduktion durch die Zugabe von sgp80 induziert und dadurch die Sensitivität gegenüber der TNF $\alpha$ -induzierten Apoptose noch einmal deutlich verstärkt. Gleiches gilt für die Behandlung mit OSM. Auch OSM verstärkte die Induktion der Apoptose der Karzinomzellen, bei *in vitro* transformierten Keratinozyten war dieser Effekt sogar stärker als nach Zugabe von IL-6. In beiden Fällen war die Apoptose innerhalb einer kurzen Zeit von nur acht Stunden induzierbar.

Eine Wiederherstellung des IL-6 Signalweges in verschiedenen HPV-positiven Zelllinien führte zu einer starken Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 (Hess *et al.*, 2000). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die Stimulation mit OSM beobachtet. In allen untersuchten Zelllinien kam es zu einer starken Aktivierung von STAT3, aber nur zu einer geringen Aktivierung von STAT1. Bei einer weiterführenden Untersuchung der STAT3 Aktivierung stellte sich heraus, dass beide Zytokine zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung von STAT3(Tyr705) führten. Diese Ergebnisse unterstützen die frühere Beobachtung, dass IL-6 STAT3-vermittelt zur Aktivierung des frühen Promotors der HPV18 Kontrollregion, der für die Expression der Onkoproteine E6 und E7 verantwortlich ist, führt (Smola-Hess *et al.*, 2001). Ähnliches wurde später für die HPV16 Kontrollregion beschrieben (Arany *et al.*, 2002). STAT3 wurde als ein Faktor charakterisiert, der für das zelluläre Überleben eine wichtige Rolle spielt (Fukada *et al.*, 1996). Er ist in der Lage verschiedenste Tumorunterstützende Faktoren zu induzieren (Übersicht Calo *et al.*, 2003). Weiterführende Analysen zeigten zudem eine Aktivierung der ERK MAPK durch beide Zytokine sowohl in Zervixkarzinomzellen als auch in *in vitro* HPV-transformierten Keratinozyten. Um zu untersuchen, welche Rolle die Transkriptionsfaktoren STAT3 und ERK MAPK bei der Induktion der TNF $\alpha$ -vermittelten Apoptose spielen, wurden der metabolische ERK Inhibitor PD98059 verwendet und transiente Transfektions-Analysen mit einem dominant-negativen STAT3 durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die Inhibition der ERK MAPK nach erfolgter IL-6 Stimulation zu einer Verstärkung des TNF $\alpha$ -vermittelten Zelltods führte. Das bedeutet, dass durch die Wiederherstellung der IL-6 Signaltransduktion ERK MAPK in HPV-positiven Zellen induziert wird und dies wiederum die Zellen vor TNF $\alpha$ -induzierter Apoptose schützen kann. Es wurde bereits gezeigt, dass die Inhibition der ERK Aktivität verschiedene Karzinomzellen für den Zelltod durch Chemotherapeutika sensibilisieren kann (Cui *et al.*, 2000; Persons *et al.*, 1999; Hayakawa *et al.*, 2000). Auf der anderen Seite wurde auch beschrieben, dass HPV-positive Karzinomzellen durch die Inhibition von ERK resistenter gegen Zelltod wurden (Wang *et al.*, 2000; Yeh *et al.*, 2002). Diese Diskrepanz lässt vermuten, dass die Verbindung zwischen ERK MAPK und den zellulären Antworten auf

verschiedenste Apoptosesignale vom individuellen zellulären Kontext und dem Apoptose-Induktor abhängen könnten. Im Gegensatz dazu führte die Transfektion eines dominant-negativen STAT3 Konstruktes zu einem Schutz vor TNF $\alpha$ -vermittelter Zytotoxizität. Die Induktion der STAT3 Aktivität durch IL-6 Signaltransduktion unterstützt demnach die TNF $\alpha$ -vermittelte Apoptose (Smola, unpubliziert).

IL-6 führt in Ratten Hepatozyten zu einem Anstieg der TNF $\alpha$ -vermittelten Apoptose durch eine gesteigerte TNF Rezeptor Expression (Boer *et al.*, 2003). Wenn dies auch in HPV-positiven Zellen der Fall wäre, müssten auch andere TNF $\alpha$  Funktionen, die nicht mit dem induzierten Zelltod in Verbindung stehen, durch IL-6 oder OSM Signaltransduktion verstärkt werden. Die Expression von IL-8 nach Stimulation mit TNF $\alpha$  wurde durch IL-6 oder OSM nur geringfügig verändert (Smola, unpubliziert). Zudem war die gesteigerte Sensibilisierung für TNF $\alpha$  auch nicht auf eine veränderte Expression der TNF Rezeptoren p55 und p75 durch diese Zytokine zurückzuführen (Smola, unpubliziert).

Dies führte zu dem Schluss, dass die induzierbare Sensibilisierung für Apoptose nicht auf die TNF Rezeptor Familie beschränkt sein muss. Die chemotherapeutischen Medikamente Cisplatin und Etoposid werden zur Therapie von fortgeschrittenen oder rezidivierenden Zervixkarzinomen entweder als Monotherapie oder Kombinationstherapie eingesetzt (Muggia *et al.*, 2004; Boruta *et al.*, 2001). Die Zervixkarzinom-Zelllinie SW756 zeigte nur eine geringe Sensitivität für Cisplatin und Etoposid. Eine Vorbehandlung mit IL-6 in der Anwesenheit von sgp80 oder OSM führte jedoch zu einer starken Sensibilisierung dieser Zellen für den Zytostatika-vermittelten Zelltod. Erhielten diese Zellen durch die Zugabe von sgp80 die Möglichkeit, auf ihr autokrin produziertes IL-6 zu reagieren, zeigte sich auch hier eine deutliche Sensibilisierung für Cisplatin- und Etoposid-vermittelte Apoptose. Eine Studie von Koivusalo *et al.* zeigte, dass die Expression von E6 die HPV18-positiven HeLa Zellen für Cisplatin und Etoposid-vermittelten Zelltod empfänglich macht. Diese Zellen wurden nach der Inhibition der E6 mRNA Synthese resistenter gegenüber Cisplatin und Etoposid Behandlung (Koivusalo *et al.*, 2005). Die hier beschriebenen Ergebnisse legen nahe, dass durch die Wiederherstellung der IL-6 Signaltransduktion die virale Onkogen Expression induziert wird, und

dadurch diese Zellen für Apoptose durch Cisplatin und Etoposid sensibilisiert werden konnten.

In verschiedenen humanen Krebszelllinien konnte bereits eine konstitutive Aktivierung von STAT3 gezeigt werden. Diese repräsentieren eine große Anzahl von soliden Tumoren, wie Brust- und Prostatakrebs, aber auch Leukämien und Lymphome (Bowman *et al.*, 2000; Buettner *et al.*, 2002). Konstitutiv aktives STAT3 ist für einige Tumoren, wie beispielsweise Kopf-Hals-Krebszellen und Zellen des multiplen Myeloms lebensnotwendig, während verschiedene HPV-positive Zervixkarzinom-Zelllinien *in vitro* nur eine sehr geringe konstitutive STAT3 Aktivierung aufweisen (Grandis *et al.*, 1998; Catlett-Falcone *et al.*, 1999; Hess *et al.*, 2000). Die Überprüfung der STAT3 Aktivierung *in situ* zeigte eine Zunahme der STAT3(Tyr705) Phosphorylierung in den intraepithelialen Neoplasien bis zum CIN II Stadium. Diese STAT3 Aktivierung nahm jedoch in den CIN III Läsionen deutlich ab. Im invasiven Zervixkarzinom konnte schließlich keine STAT3 Aktivierung mehr beobachtet werden. Im Zervixkarzinom scheint eine konstitutive STAT3 Aktivierung also nicht für das Überleben der Zellen notwendig zu sein, im Gegenteil, durch die IL-6 abhängige Aktivierung von STAT3 in Zervixkarzinomzellen wurden diese für die zytotoxischen Aktivitäten von TNF $\alpha$  bzw. den chemotherapeutischen Medikamenten Cisplatin und Etoposid sensibilisiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass IL-6 in Zervixkarzinomzellen dann als autokriner Wachstumsfaktor fungieren kann, wenn die IL-6-bindende Rezeptorkette gp80 exogen zugeführt wird. Gleichzeitig kann IL-6 diese Zellen für Zelltod-vermittelnde Stimuli sensibilisieren. Dies passt zu früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, in denen gezeigt wurde, dass die Wiederherstellung des IL-6 Signalweges zu einer gesteigerten Expression von MCP-1 führt (Hess *et al.*, 2000). MCP-1 ist ein Chemokin, das mononukleäre Zellen, wie z.B. die Vorläufer von Antigen-präsentierenden Zellen und Makrophagen, anlocken kann, was schon als negatives Ereignis für den Tumor beschrieben wurde (Rösl *et al.*, 1994). Durch eine intakte IL-6 Signaltransduktion in HPV-positiven Zervixkarzinomzellen entstehen so zwei deutliche Nachteile für den Tumor. Dies könnte erklären, warum Zervixkarzinomzellen nicht das volle Potential der IL-6 Signaltransduktion ausnutzen sondern stattdessen die IL-6 Rezeptor Expression

herunterregulieren. Hieraus ergab sich die Frage, zu welchem Zweck Zervixkarzinomzellen eine solch starke IL-6 Expression aufweisen bzw. ob Tumorzell-produziertes IL-6 eine parakrine Rolle im Tumor ausüben könnte.

Dendritische Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Initiation und Koordination von Immunantworten auf infektiöse Substanzen und Tumore. Tumore entwickeln dabei zahlreiche Strategien, um dem Immunsystem zu entkommen (Muller *et al.*, 2002). Die Sekretion von verschiedenen Faktoren, die die normale Funktion von DC inhibieren können, stellt einen dieser Mechanismen dar (Gabrilovich *et al.*, 1996a; Gastl *et al.*, 1993; Kavanaugh und Carbone, 1996; Wojtowicz-Praga, 1997). Reife DC fungieren nicht nur als „Antigen-Träger“ sondern legen auch die Richtung der Immunantwort im Lymphknoten fest. Abhängig von der Gefahr, der der Körper ausgesetzt ist, übermitteln DC Signale an naive CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, die sich daraufhin entweder in IL-4-produzierende T<sub>H</sub>2 Zellen oder in IFN $\gamma$ -produzierende T<sub>H</sub>1 Zellen differenzieren können. Dabei stellen T<sub>H</sub>1 Zellen Effektoren der entzündlichen Immunantwort dar, die außerdem in die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen involviert sind, die wiederum für die Eliminierung von virusinfizierten Zellen benötigt werden. T<sub>H</sub>2 Zellen bestimmen dagegen die anti-parasitäre, allergische und humorale Antwort. IL-12 ist ein wirksamer Induktor der T<sub>H</sub>1 Antwort und wird aufgrund der DC/T-Zell Interaktion in den Lymphknoten in großen Mengen von DC produziert (Hsieh *et al.*, 1993; Manetti *et al.*, 1993). Deshalb könnte jede Veränderung der IL-12 Produktion durch DC zu einer Verschiebung der Immunantwort in Richtung eines „unerwünschten“ T<sub>H</sub>2 Typs führen. Aus diesem Grund sollte hier untersucht werden, ob lösliche Faktoren in den Überständen von Zervixkarzinomzellen einen Einfluss auf fundamental wichtige Funktionen der DC, wie beispielsweise die Proliferation und Polarisierung von T-Zellen, ausüben können. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten bereits, dass IL-6 zu einer starken Unterdrückung der Produktion des T<sub>H</sub>1 polarisierenden Zytokins IL-12 führte (Hegde, 2003).

Die Interaktion zwischen DC und T-Zellen findet nicht nur durch T-Zell Rezeptor und Antigen-MHC-Komplexe, sondern auch durch wichtige kostimulatorische Moleküle statt. Darunter ist die Ligation von CD40 auf DC mit seinem Ligand CD40L auf T-Zellen besonders wichtig für eine effektive IL-12 Produktion. DC erhalten das erste pro-inflammatorische Signal im peripheren Gewebe und

wandern schließlich in die Lymphknoten ein, wo sie auf das zweite Signal, den CD40L auf T-Zellen, treffen. DC wurden zunächst mit verschiedenen Zervixkarzinomzell-Überständen kultiviert. Dies sollte eine *in vivo* Situation innerhalb des Tumors imitieren. Schließlich wurden die Zellen für acht Stunden mit LPS als inflammatorischem Signal stimuliert und für weitere 24 Stunden mit PFA-fixierten BHK<sub>CD40L</sub> Zellen als T-Zell Signal inkubiert. Die LPS/CD40L-vermittelte IL-12 Produktion wurde von allen untersuchten Karzinomzell-Überständen stark inhibiert. Dies war auch der Fall, wenn die Zellen erst für vier Tage in unreife DC differenzierten und ab dem vierten Tag mit den jeweiligen Überständen kultiviert wurden.

Um herauszufinden, welche löslichen Faktoren in den Tumorzell-Überständen für diese Repression verantwortlich waren, wurden alle Überstände auf ihren Zytokin Gehalt untersucht. Wie bereits beschrieben, exprimierten alle Zelllinien zelltyp-abhängig verschiedene Mengen an IL-6. Zusätzlich wurde für alle Zelllinien eine TGF $\beta$  Produktion festgestellt, während keine der Zelllinien das immunsuppressive Zytokin IL-10 exprimierte. Die Unterdrückung der IL-12 Produktion war also nicht auf eine gesteigerte IL-10 Produktion durch die Zervixkarzinomzellen zurückzuführen. Um herauszufinden, ob IL-6 und TGF $\beta$  für die beobachtete IL-12 Repression durch die Tumorzell-Überstände verantwortlich sein könnten, wurden die DC mit unterschiedlichen Mengen IL-6 und TGF $\beta$ , die im Bereich der autokrinen Produktion der Zellen lagen, kultiviert. Hier zeigte sich, dass sowohl IL-6 als auch TGF $\beta$  die LPS/CD40L-vermittelte IL-12 Produktion reprimieren konnten. Dies wurde für IL-6 schon mehrfach in der Literatur beschrieben (Takenaka *et al.*, 1997; Dodge *et al.*, 2003; Avila-Moreno *et al.*, 2005). Die Arbeitsgruppe Dodge *et al.*, konnte zeigen, dass murine DC aus der Lunge signifikante Mengen an IL-6 produzieren, aber im Gegensatz dazu kaum IL-12 exprimierten. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass IL-6 die IL-12 Produktion negativ regulieren kann. Aus den Lungen stammende DC aus IL-6-defizienten Mäusen produzieren signifikante Mengen an IL-12 und können zudem die T<sub>H</sub>1 Polarisierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen induzieren (Dodge *et al.*, 2003).

Die Neutralisation von rekombinantem IL-6 führte zu einer Aufhebung der IL-6-vermittelten IL-12 Repression. Im Falle der SW756 Überstände konnte die

IL-12 Repression durch Neutralisation von IL-6 ebenfalls um ca. 50% aufgehoben werden. Dies bestätigt eine Beobachtung der Gruppe Avila-Moreno *et al.*, die gezeigt hatten, dass DC, die mit löslichen Faktoren von Karzinomzellen aus der Lunge stimuliert wurden, im Vergleich zu Kontroll-DC größere Mengen an IL-6, aber geringere Mengen an IL-12 produzierten und nur vermindert zur Proliferation von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen beitragen konnten. Diese Effekte wurden durch eine Neutralisation von IL-6 während der Differenzierung nahezu aufgehoben (Avila-Moreno *et al.*, 2005).

Ein suppressiver Einfluss auf die IL-12 Produktion von DC wurde auch für TGFβ beschrieben. So führte die Behandlung mit TGFβ zu einer veränderten Zytokin und Chemokin Produktion in LPS-behandelten Monozyten. Sowohl die IL-12 als auch die IL-10 Produktion der DC wurde signifikant inhibiert (Lyakh *et al.*, 2005) und TGFβ inhibierte auch die IL-12 p40 Produktion in LPS-stimulierten Makrophagen (Tada *et al.*, 2004).

Faktoren, die von Tumorzellen produziert werden, führen zu einer defekten Differenzierung von DC und tragen damit zur gestörten Funktion der DC bei (Gabrilovich *et al.*, 1996a; Gabrilovich *et al.*, 1996b; Steinbrink *et al.*, 1997; Menetrier-Caux *et al.*, 1998; Ishida *et al.*, 1998; Gabrilovich *et al.*, 1998; Gabrilovich *et al.*, 1999). Zu diesen Faktoren gehört neben IL-6 und TGFβ auch der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF). Nahezu alle Tumore produzieren konstitutiv VEGF, welches direkt das Wachstum von vaskulären endothelialen Zellen und somit die Bildung von Gefäßsystemen im Tumor stimuliert (Übersicht in Ferrara, 2005). Auch HPV-positive Zervixkarzinomzellen produzieren VEGF (Dobbs *et al.*, 1997; Guidi *et al.*, 1995). Die beobachteten, suppressiven Effekte durch Tumorzell-Überstände können also auch zusätzlich durch andere lösliche, vom Tumor produzierte Faktoren, wie beispielsweise VEGF oder noch nicht charakterisierte Moleküle, vermittelt werden.

Um die Frage zu klären, wie IL-6 und TGFβ die immunsuppressiven Effekte in DC vermitteln, wurden verschiedene Faktoren untersucht. Es stellte sich heraus, dass sowohl Tumorzell-Überstände als auch IL-6 zu einer geringen Induktion der IL-10 Expression führen. SiHa Zellen produzieren mittlere Mengen IL-6 (ca. 5ng/ml) und zeigten im Vergleich zu den restlichen Überständen als einzige Zelllinie eine geringe IL-10 Induktion. IL-10 ist bereits als potenter IL-12

Repressor beschrieben (Aste-Amezaga *et al.*, 1998; D'Andrea *et al.*, 1993). Aufgrund der sehr geringen Mengen von maximal 0,65ng/ml IL-10 und der Tatsache, dass TGF $\beta$  nicht die IL-10 Expression induziert, diese Behandlung aber sehr wohl zur Suppression der IL-12 Expression führte, kann die IL-10 Expression nur zu einem geringen Teil zur beobachteten IL-12 Repression beitragen.

Als nächstes wurden Faktoren untersucht, die bekanntermaßen an der Regulation von IL-12 beteiligt sind. Die zwei entscheidenden cis-Elemente innerhalb des IL-12 p40 Promotors, eine ETS-2 und eine NF- $\kappa$ B Bindestelle, werden von unterschiedlich zusammengesetzten Komplexen gebunden. Im Falle von ETS-2 besteht dieser Komplex aus ETS-2, PU.1, c-Rel, ICSBP, IRF-1 und IRF-2 (Gri *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 1997; Salkowski *et al.*, 1999), während die NF- $\kappa$ B Bindestelle nach LPS-Stimulation von einem heterodimeren Komplex bestehend aus p50 und c-Rel gebunden wird (Murphy *et al.*, 1995; Plevy *et al.*, 1997). Unter den Mitgliedern der NF- $\kappa$ B Familie von Transkriptionsfaktoren scheint c-Rel besonders wichtig für die positive Regulation des p40 Gens zu sein. Hier konnte gezeigt werden, dass die Bindeaktivität des essentiell wichtigen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B durch LPS in DC induziert wird und diese sowohl durch alle untersuchten Tumorzell-Überstände als auch durch IL-6 und TGF $\beta$  stark reprimiert wird. Dabei korreliert der IL-6 bzw. TGF $\beta$  Gehalt der einzelnen Überstände nicht mit der Unterdrückung der NF- $\kappa$ B Bindeaktivität. Bis auf CaSki Zellen, die am stärksten die Bindeaktivität inhibiert haben, zeigen alle Überstände eine ähnliche Repression der NF- $\kappa$ B Bindeaktivität, obwohl beispielsweise SW756 Zellen mit ca. 14ng/ml IL-6 deutlich größere Mengen von diesem Zytokin produzierten als die übrigen Zelllinien. Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass durch die Stimulation mit LPS mehrere unterschiedlich zusammengesetzte NF- $\kappa$ B Komplexe in DC aktiviert wurden. Durch die Behandlung mit IL-6 kam es zu einer gestörten NF- $\kappa$ B Bindeaktivität. Besonders auffällig ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass IL-6 die Bildung eines c-Rel-haltigen Komplexes komplett verhindern konnte (Hegde *et al.*, 2004). Die beobachtete IL-12 Repression durch Tumorzell-Überstände und IL-6 könnte also auf eine verminderte Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Rel, der wie beschrieben eine wichtige

Rolle bei der Regulation von IL-12 p40 spielt, zurückgeführt werden. Da IL-6 zu einer gesteigerten Aktivierung der p38 MAPK in DC führt, kann eine Involvierung dieses Transkriptionsfaktors in die IL-6-vermittelte Repression der IL-12 Expression ebenfalls ausgeschlossen werden (Hegde *et al.*, 2004). IRF-1 ist ein weiterer wichtiger Faktor, der an der Regulation von IL-12 p40 beteiligt ist. Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass IL-6 die IRF-1 mRNA Transkription in Brustkarzinomzellen sogar induzieren kann (Harroch *et al.*, 1994). Da IL-6 keinen Einfluss auf LPS-induzierte IRF-1 mRNA Transkription hatte, scheint IRF-1 jedoch nicht an der IL-6 vermittelten IL-12 Repression in DC beteiligt zu sein.

STAT3 ist für die Regulation der Rekrutierung von NF- $\kappa$ B an den IL-12 p40 Promotor in DC verantwortlich. Eine gestörte LPS-induzierte IL-12 p40 Expression in IL-10-defizienten Mäusen war in Abwesenheit von aktiviertem STAT3 auf eine verstärkte NF- $\kappa$ B Rekrutierung an den IL-12 p40 Promotor zurückzuführen. Die Blockade des JAK/STAT Signalweges in Wildtyp-DC führte zu einer verstärkten LPS-induzierten IL-12 p40 Sekretion (Hoentjen *et al.*, 2005). STAT3 spielt also eine wichtige Rolle bei der Herunter-Regulation der LPS-induzierten IL-12 Expression. Für die IL-6-induzierte Suppression der LPS-vermittelten Aktivierung bzw. Reifung von DC wird ebenfalls aktiviertes STAT3 benötigt (Park *et al.*, 2004). Zudem wurde bereits beschrieben, dass STAT3 die Aktivierung von NF- $\kappa$ B inhibieren kann (Nefedova *et al.*, 2005). Hier konnte gezeigt werden, dass mittlere bis große Mengen (25-100ng/ml) IL-6 konzentrationsabhängig zur Aktivierung von STAT3 in DC führten. Eine niedrige Dosis IL-6 von 5ng/ml reichte für eine Aktivierung nicht mehr aus. STAT3 Aktivierung könnte also über die Repression der NF- $\kappa$ B Bindeaktivität zur Suppression der IL-12 Expression durch IL-6 beitragen.

Ein direktes Ziel von aktiviertem STAT3 sind die SOCS Gene (Auernhammer *et al.*, 1999). SOCS Proteine können die Signale von Zytokin-Rezeptoren, wie beispielsweise dem IL-6 Rezeptor, durch direkte Interaktionen mit JAKs inhibieren und so deren katalytische Aktivität stören (Endo *et al.*, 1997; Naka *et al.*, 1997; Alexander *et al.*, 1999; Nicholson *et al.*, 1999). IL-6 kann in anderen Zelltypen die Expression von SOCS3 und SOCS1 induzieren (Starr *et al.*, 1997). In LPS-aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen führt IL-6 zur gesteigerten Expression

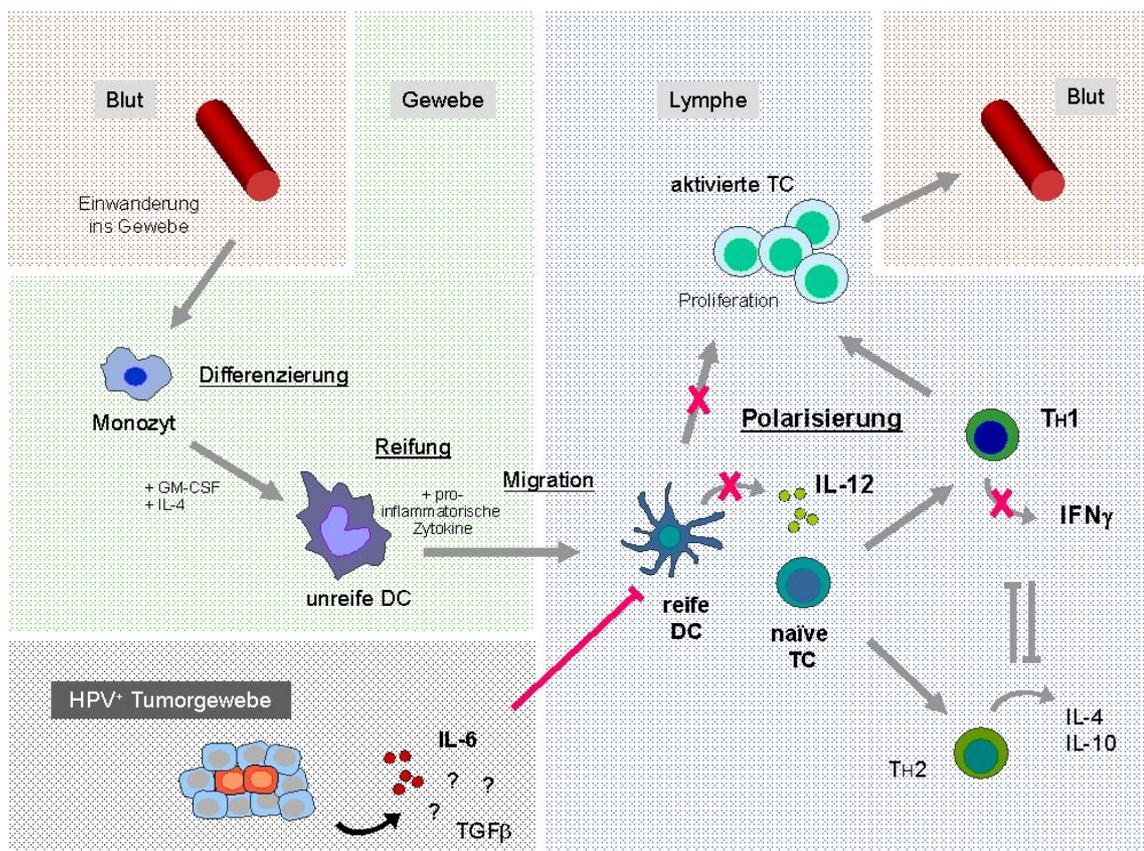
von SOCS1 und damit zur Inhibition von IFN $\gamma$ -aktiviertem STAT1 (Diehl *et al.*, 2000). Neben dieser Inhibition der T<sub>H</sub>1-Differenzierung unterstützt IL-6 zudem direkt die T<sub>H</sub>2-Differenzierung (Lotz *et al.*, 1988; Uyttenhove *et al.*, 1988). In SOCS3-defizienten Makrophagen unterdrückt IL-6 ähnlich wie IL-10 die LPS-induzierte TNF $\alpha$  und IL-12 Produktion (Yasukawa *et al.*, 2003). SOCS3 kann spezifisch die IL-6-vermittelte STAT3 Aktivierung inhibieren, und damit zu einer klassischen „negativen Rückkopplung“ führen. Die Untersuchung der SOCS1 und SOCS3 mRNA Transkription zeigte bereits nach 20min eine massive Induktion der SOCS3 mRNA durch IL-6 in DC, während SOCS1 mRNA Transkription in diesen Zellen nicht durch IL-6 induziert werden konnte. Gleiches konnte bereits die Arbeitsgruppe Park *et al.* zeigen (Park *et al.*, 2004). Die Behandlung mit IL-6 führt jedoch wie gezeigt, zur Aktivierung von STAT3. SOCS3 und SOCS1 sind demnach nicht in die IL-6-vermittelte IL-12 Suppression involviert.

IL-6 unterdrückt in Monozyten die TNF $\alpha$  und IL-1 Produktion nach einem pro-inflammatorischen Stimulus, wie Lipopolysaccharid (LPS) (Aderka *et al.*, 1989; Schindler *et al.*, 1990; Wadee *et al.*, 1993). Zusätzlich wurde in IL-6 *knock out* Mäusen eine stark erhöhte TNF $\alpha$  Produktion nach LPS Stimulierung beobachtet (Fattori *et al.*, 1994). Aus diesem Grund wurde der Einfluss von IL-6 auf pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine untersucht. IL-6 unterdrückt sowohl LPS-induziertes TNF $\alpha$  als auch IP-10 in DC. Daraus ergab sich die Frage, ob IL-6 auch die T-Zell-stimulatorische Kapazität von DC verändern kann. Das Zytokinprofil der DC hängt von dem Subtyp, dem lokalen Milieu, der anatomischen Lokalisierung und dem Reifungsstimulus ab (Dzionek *et al.*, 2001). Um den Einfluss von IL-6 auf die DC-vermittelte Proliferation der naiven T-Helferzellen zu überprüfen, wurden allogene, gemischte Lymphozyten Reaktionen durchgeführt. IL-6 führte zu einer verminderten Proliferation der T-Helferzellen unabhängig davon, ob die Zellen durch LPS aktiviert wurden oder nicht. Neben der verminderten Proliferation der T-Helferzellen sekretierten die IL-6 behandelten DC auch deutlich weniger IFN $\gamma$  nach LPS-Stimulation als unbehandelte DC.

Ein Molekül, das zur Inhibition der T-Zell Proliferation und der Reduktion der T-Zell Antworten beiträgt istIDO. Die Untersuchung derIDO Expression in DC

zeigte keine Veränderung der LPS-induziertenIDO Produktion durch IL-6 Stimulation. Die beobachteten Effekte der IL-6-behandelten DC auf T-Helferzellen scheinen also unabhängig von IDO stattzufinden.

IL-6-behandelte DC vermindern also einerseits die Polarisierung von naiven T-Helferzellen in Richtung  $T_H1$ -Zellen durch die Repression der IL-12 Produktion, andererseits vermindern sie die  $IFN\gamma$  Produktion von aktivierten T-Helferzellen. IL-6 verschiebt also die DC-vermittelte Immunantwort in Richtung einer, für die Eliminierung von Tumoren ungünstigen  $T_H2$ -Immunantwort. Das als pro-inflammatorisch bezeichnete Zytokin IL-6 kann so auch anti-inflammatorische und immunsuppressive Effekte vermitteln. Zusammengekommen könnte dies einen Mechanismus für den beobachteten Wechsel von  $T_H1$  in Richtung  $T_H2$  Zytokinen im Gewebe darstellen.



**Abbildung 28: Einflüsse von Tumorzell-produziertem IL-6 auf verschiedene Funktionen von dendritischen Zellen.** Tumorzell-produziertes IL-6 inhibiert die IL-12 Produktion durch DC, die DC-vermittelte Proliferation von T-Helferzellen und deren  $IFN\gamma$  Sekretion.

## 5. Zusammenfassung

Persistierende humane Papillomvirus (HPV) Infektionen sind ursächlich an der Entstehung von Zervixkarzinomen beteiligt. Zervixkarzinomzellen produzieren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* große Mengen des Zytokins Interleukin-6 (IL-6). *In vivo* korreliert das Vorhandensein von IL-6-positiven Zellen mit einer schlechten Prognose für die Progression der Krankheit. HPV-positive Zervixkarzinomzellen zeigten nur eine schwache autokrine IL-6 Aktivität, wie die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 *in vitro*. Dies war auf den Verlust der IL-6-bindenden Rezeptorkette gp80 zurückzuführen. *In situ* Färbungen zeigten korrespondierend eine Abnahme der Phospho-STAT3(Tyr705) Aktivierung im Verlauf der malignen Progression.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Wiederherstellung des autokrinen IL-6 Signalweges in HPV-positiven Zellen mit Hilfe des löslichen gp80, diese Zellen für die Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )-vermittelte Apoptose sensibilisiert wurden. Zusätzlich kam es zu einer gesteigerten Expression des viralen Onkogens E7 in HPV-positiven Zellen. Dieselben Effekte wurden bei der Stimulation mit dem IL-6-verwandten Zytokin Oncostatin M (OSM) beobachtet. Wie IL-6 aktivierte auch OSM STAT3. Beide Zytokine induzierten den STAT3-regulierten Transkriptionsfaktor c-myc, der Zellen für TNF $\alpha$ -vermittelte Apoptose sensibilisieren kann. Beide Zytokine sensibilisierten auch für den Zelltod durch die chemotherapeutischen Medikamente Cisplatin und Etoposid. Durch eine intakte IL-6 Signaltransduktion in HPV-positiven Zervixkarzinomzellen entsteht also ein deutlicher Nachteil für den Tumor, was die verminderte Expression von gp80 durch diese Zellen erklären könnte.

Im Verlauf der Progression von leichtgradigen zu schwergradigen intraepithelialen Neoplasien kommt es nicht nur zur verstärkten Expression von IL-6 sondern auch zu einer Verschiebung von T<sub>H1</sub> zu T<sub>H2</sub> Zytokinen im Gewebe. Hier konnte gezeigt werden, dass Überstände von Zervixkarzinomzellen, die IL-6 und TGF $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ), jedoch kein IL-10, enthielten, die Produktion von IL-12 in dendritischen Zellen (DC) supprimieren. IL-12 spielt eine essentielle Rolle beim Aufbau einer T<sub>H1</sub>

Immunantwort. Sowohl IL-6 als auch TGF $\beta$  waren in der Lage, den Effekt der Karzinomzellen auf die IL-12 Produktion zu reproduzieren. Die Untersuchung von IL-12-regulierenden Signalfaktoren ergab, dass der Suppression von IL-12 eine starke Inhibition der Bindeaktivität des Nukleären Faktors- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in DC vorausgeht. Im Gegensatz zur NF- $\kappa$ B Aktivität wurde die mRNA Expression von IRF-1 (*interferon regulatory factor 1*) oder des inhibitorischen Faktors SOCS1 (*suppressor of cytokine signalling*) nicht durch IL-6 verändert. IL-6-behandelte DC zeigten in gemischten allogenen Lymphozyten Reaktionen eine stark verminderte T-Zell-stimulatorische Kapazität und führten zu einer geringeren Sekretion des T<sub>H</sub>1 Zytokins IFN $\gamma$  durch T-Zellen. Maligne, HPV-transformierte Keratinozyten vermitteln somit durch die gesteigerte Expression von IL-6 und TGF $\beta$  immunsuppressive Effekte.

## 6. Abstract

Persistent infection with human papillomavirus (HPV) is the main etiological factor for the development of cervical cancer. Cervical cancer cells produce high amounts of the cytokine interleukin-6 (IL-6) *in vitro* and *in vivo*. The presence of IL-6 positive tumor cells correlated with a poor prognosis of disease progression. HPV-positive cervical carcinoma cells showed only low autocrine IL-6 activity, like activation of the transcription factor STAT3 *in vitro*. This was due to the loss of the IL-6 receptor ligand binding chain gp80. Correspondingly, no *in situ* phospho-STAT3(Tyr705) activity was found in cervical carcinomas.

Here we could show, that restoration of autocrine IL-6 signalling in HPV-positive carcinoma cells with soluble gp80 strongly sensitizes these cells to tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )-mediated apoptosis. In addition the expression of the viral oncogene E7 was up-regulated in HPV-positive cells. Similar to IL-6, the functionally related cytokine Oncostatin M (OSM) activated STAT3, sensitized HPV-transformed keratinocytes to TNF $\alpha$ -mediated apoptosis and led to the up-regulation of E7. Both cytokines induced the STAT3-regulated transcription factor c-myc, known to sensitize to TNF $\alpha$ -mediated apoptosis. Both cytokines made these cells also susceptible to the chemotherapeutic actions of cisplatin and etoposide. An intact IL-6 signalling in HPV-positive cervical carcinoma cells thus creates a disadvantage to the tumor, which could explain the down-regulation of gp80 in these cells.

Following progression from low grade to high grade cervical intraepithelial lesions, not only IL-6 expression is up-regulated but also a pronounced shift from T<sub>H</sub>1 to T<sub>H</sub>2 cytokines is observed within the tissue. Here we show that supernatants of cervical carcinoma cells, which contain IL-6 and TGF $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ) but no IL-10, suppress IL-12 production in dendritic cells (DC). IL-12 plays an essential role in mounting a T<sub>H</sub>1 response. Both IL-6 and TGF $\beta$  were able to reproduce the effects of the carcinoma cell supernatants. Different signalling factors important for IL-12 regulation were investigated. Suppression of IL-12 was preceded by strong inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) binding activity in DC. In contrast to NF- $\kappa$ B activity, mRNA

expression of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) or the inhibitory factor SOCS1 (*suppressor of cytokine signalling*) was unaffected by IL-6. IL-6-treated DC showed a poor T cell stimulatory capacity in allogenic mixed lymphocyte reactions, which was accompanied by reduced secretion of the TH1 cytokine IFN $\gamma$  by T cells. Our data indicate that malignant, HPV-transformed keratinocytes mediate immunosuppression by up-regulating the cytokines IL-6 and TGF $\beta$ .

## 7. Literaturverzeichnis

- Adams S., O'Neill D. W. and Bhardwaj N.** (2005) Recent advances in dendritic cell biology. *J Clin Immunol* 25, 177-88.
- Aderka D., Le J. M. and Vilcek J.** (1989) IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. *J Immunol* 143, 3517-23.
- Akira S., Isshiki H., Sugita T., Tanabe O., Kinoshita S., Nishio Y., Nakajima T., Hirano T. and Kishimoto T.** (1990) A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *Embo J* 9, 1897-906.
- Alexander A. M., Crawford M., Bertera S., Rudert W. A., Takikawa O., Robbins P. D. and Trucco M.** (2002) Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in transplanted NOD Islets prolongs graft survival after adoptive transfer of diabetogenic splenocytes. *Diabetes* 51, 356-65.
- Alexander W. S.** (2002) Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2, 410-6.
- Alexander W. S., Starr R., Fenner J. E., Scott C. L., Handman E., Sprigg N. S., Corbin J. E., Cornish A. L., Darwiche R., Owczarek C. M., Kay T. W., Nicola N. A., Hertzog P. J., Metcalf D. and Hilton D. J.** (1999) SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell* 98, 597-608.
- Altenburg A., Baldus S. E., Smola H., Pfister H. and Hess S.** (1999) CD40 ligand-CD40 interaction induces chemokines in cervical carcinoma cells in synergism with IFN-gamma. *J Immunol* 162, 4140-7.
- Andrews P. A. and Jones J. A.** (1991) Characterization of binding proteins from ovarian carcinoma and kidney tubule cells that are specific for cisplatin modified DNA. *Cancer Commun* 3, 93-102.
- Arany I., Grattendick K. G. and Tyring S. K.** (2002) Interleukin-10 induces transcription of the early promoter of human papillomavirus type 16 (HPV16) through the 5'-segment of the upstream regulatory region (URR). *Antiviral Res* 55, 331-9.
- Ardeshna K. M., Pizzey A. R., Walker S. J., Devereux S. and Khwaja A.** (2002) The upregulation of CC chemokine receptor 7 and the increased migration of maturing dendritic cells to macrophage inflammatory protein 3beta and secondary lymphoid chemokine is mediated by the p38 stress-activated protein kinase pathway. *Br J Haematol* 119, 826-9.

- Aste-Amezaga M., Ma X., Sartori A. and Trinchieri G.** (1998) Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J Immunol* 160, 5936-44.
- Auernhammer C. J., Bousquet C. and Melmed S.** (1999) Autoregulation of pituitary corticotroph SOCS-3 expression: characterization of the murine SOCS-3 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6964-9.
- Ausubel F. M., Brent R., Kingstone R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. and Struhl K.** (1994) Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Avila-Moreno F., Lopez-Gonzalez J. S., Galindo-Rodriguez G., Prado-Garcia H., Bajana S. and Sanchez-Torres C.** (2005) Lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma cell lines use different mediators to induce comparable phenotypic and functional changes in human monocyte-derived dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother*, 1-14.
- Babik J. M., Adams E., Tone Y., Fairchild P. J., Tone M. and Waldmann H.** (1999) Expression of murine IL-12 is regulated by translational control of the p35 subunit. *J Immunol* 162, 4069-78.
- Bais A. G., Beckmann I., Lindemans J., Ewing P. C., Meijer C. J., Snijders P. J. and Helmerhorst T. J.** (2005) A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. *J Clin Pathol* 58, 1096-100.
- Baker C. C., Phelps W. C., Lindgren V., Braun M. J., Gonda M. A. and Howley P. M.** (1987) Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* 61, 962-71.
- Banchereau J. and Steinman R. M.** (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-52.
- Bauknecht T., Randelzhofer B., Schmitt B., Ban Z. and Hernando J. J.** (1999) Response to IL-6 of HPV-18 cervical carcinoma cell lines. *Virology* 258, 344-54.
- Bechtold V., Beard P. and Raj K.** (2003) Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. *J Virol* 77, 2021-8.
- Bell D., Young J. W. and Banchereau J.** (1999) Dendritic cells. *Adv Immunol* 72, 255-324.
- Boer U., Fennekohl A. and Puschel G. P.** (2003) Sensitization by interleukin-6 of rat hepatocytes to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J Hepatol* 38, 728-35.
- Borger D. R., Mi Y., Geslani G., Zyzak L. L., Batova A., Engin T. S., Pirisi L. and Creek K. E.** (2000) Retinoic acid resistance at late stages of human papillomavirus type 16-mediated transformation of human keratinocytes arises despite intact retinoid signaling and is due to a loss of sensitivity to transforming growth factor-beta. *Virology* 270, 397-407.

- Boruta D. M., 2nd, Schorge J. O., Duska L. A., Crum C. P., Castrillon D. H. and Sheets E. E.** (2001) Multimodality therapy in early-stage neuroendocrine carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 81, 82-7.
- Bosch F. X., Manos M. M., Munoz N., Sherman M., Jansen A. M., Peto J., Schiffman M. H., Moreno V., Kurman R. and Shah K. V.** (1995) Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 87, 796-802.
- Boukamp P., Petrussevska R. T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A. and Fusenig N. E.** (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106, 761-71.
- Bouso P. and Robey E.** (2003) Dynamics of CD8<sup>+</sup> T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nat Immunol* 4, 579-85.
- Bowman T., Garcia R., Turkson J. and Jove R.** (2000) STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19, 2474-88.
- Braun L., Durst M., Mikumo R. and Gruppuso P.** (1990) Differential response of nontumorigenic and tumorigenic human papillomavirus type 16-positive epithelial cells to transforming growth factor beta 1. *Cancer Res* 50, 7324-32.
- Braun M. C., Lahey E. and Kelsall B. L.** (2000) Selective suppression of IL-12 production by chemoattractants. *J Immunol* 164, 3009-17.
- Bromberg J. F., Wrzeszczynska M. H., Devgan G., Zhao Y., Pestell R. G., Albanese C. and Darnell J. E., Jr.** (1999) Stat3 as an oncogene. *Cell* 98, 295-303.
- Buettner R., Mora L. B. and Jove R.** (2002) Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res* 8, 945-54.
- Calo V., Migliavacca M., Bazan V., Macaluso M., Buscemi M., Gebbia N. and Russo A.** (2003) STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol* 197, 157-68.
- Catlett-Falcone R., Landowski T. H., Oshiro M. M., Turkson J., Levitzki A., Savino R., Ciliberto G., Moscinski L., Fernandez-Luna J. L., Nunez G., Dalton W. S. and Jove R.** (1999) Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 10, 105-15.
- Caux C., Dezutter-Dambuyant C., Schmitt D. and Banchereau J.** (1992) GM-CSF and TNF- $\alpha$  cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360, 258-61.
- Caux C., Massacrier C., Dezutter-Dambuyant C., Vanbervliet B., Jacquet C., Schmitt D. and Banchereau J.** (1995) Human dendritic Langerhans cells generated in vitro from CD34<sup>+</sup> progenitors can prime naive CD4<sup>+</sup> T cells and process soluble antigen. *J Immunol* 155, 5427-35.

- Caux C., Massacrier C., Vanbervliet B., Dubois B., Van Kooten C., Durand I. and Banchereau J.** (1994) Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 180, 1263-72.
- Cella M., Sallusto F. and Lanzavecchia A.** (1997) Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 9, 10-6.
- Cella M., Scheidegger D., Palmer-Lehmann K., Lane P., Lanzavecchia A. and Alber G.** (1996) Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 184, 747-52.
- Chan V. W., Kothakota S., Rohan M. C., Panganiban-Lustan L., Gardner J. P., Wachowicz M. S., Winter J. A. and Williams L. T.** (1999) Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) is chemotactic for mature dendritic cells. *Blood* 93, 3610-6.
- Chen R. H., Chang M. C., Su Y. H., Tsai Y. T. and Kuo M. L.** (1999) Interleukin-6 inhibits transforming growth factor-beta-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and signal transducers and activators of transcription 3 pathways. *J Biol Chem* 274, 23013-9.
- Clerici M., Merola M., Ferrario E., Trabattoni D., Villa M. L., Stefanon B., Venzon D. J., Shearer G. M., De Palo G. and Clerici E.** (1997) Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* 89, 245-50.
- Clerici M., Shearer G. M. and Clerici E.** (1998) Cytokine dysregulation in invasive cervical carcinoma and other human neoplasias: time to consider the TH1/TH2 paradigm. *J Natl Cancer Inst* 90, 261-3.
- Cui W., Yazlovitskaya E. M., Mayo M. S., Pelling J. C. and Persons D. L.** (2000) Cisplatin-induced response of c-jun N-terminal kinase 1 and extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in a series of cisplatin-resistant ovarian carcinoma cell lines. *Mol Carcinog* 29, 219-28.
- Cullen A. P., Reid R., Campion M. and Lorincz A. T.** (1991) Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* 65, 606-12.
- D'Andrea A., Aste-Amezaga M., Valiante N. M., Ma X., Kubin M. and Trinchieri G.** (1993) Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 178, 1041-8.
- D'Andrea A., Rengaraju M., Valiante N. M., Chehimi J., Kubin M., Aste M., Chan S. H., Kobayashi M., Young D., Nickbarg E. and et al.** (1992) Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med* 176, 1387-98.

- Darnell J. E., Jr.** (1997) STATs and gene regulation. *Science* 277, 1630-5.
- Darnell J. E., Jr., Kerr I. M. and Stark G. R.** (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415-21.
- de Gruijl T. D., Bontkes H. J., van den Muysenberg A. J., van Oostveen J. W., Stukart M. J., Verheijen R. H., van der Vange N., Snijders P. J., Meijer C. J., Walboomers J. M. and Scheper R. J.** (1999) Differences in cytokine mRNA profiles between premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. *Eur J Cancer* 35, 490-7.
- Debatin K. M. and Krammer P. H.** (2004) Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* 23, 2950-66.
- Diehl S., Anguita J., Hoffmeyer A., Zapton T., Ihle J. N., Fikrig E. and Rincon M.** (2000) Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. *Immunity* 13, 805-15.
- Dignam J. D., Lebovitz R. M. and Roeder R. G.** (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 11, 1475-89.
- Dobbs S. P., Hewett P. W., Johnson I. R., Carmichael J. and Murray J. C.** (1997) Angiogenesis is associated with vascular endothelial growth factor expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 76, 1410-5.
- Dodge I. L., Carr M. W., Cernadas M. and Brenner M. B.** (2003) IL-6 production by pulmonary dendritic cells impedes Th1 immune responses. *J Immunol* 170, 4457-64.
- Dubbs D. R. and Scherer W. F.** (1969) Variants of Japanese encephalitis virus cytopathic for L mouse fibroblasts and less human epithelial cells. *Jpn J Med Sci Biol* 22, 253-61.
- Durst M., Glitz D., Schneider A. and zur Hausen H.** (1992) Human papillomavirus type 16 (HPV 16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hybridization. *Virology* 189, 132-40.
- Durst M., Kleinheinz A., Hotz M. and Gissman L.** (1985) The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol* 66 (Pt 7), 1515-22.
- Dzionic A., Sohma Y., Nagafune J., Cella M., Colonna M., Facchetti F., Gunther G., Johnston I., Lanzavecchia A., Nagasaka T., Okada T., Vermi W., Winkels G., Yamamoto T., Zysk M., Yamaguchi Y. and Schmitz J.** (2001) BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med* 194, 1823-34.
- Eilers M.** (1999) Control of cell proliferation by Myc family genes. *Mol Cells* 9, 1-6.

- Endo T. A., Masuhara M., Yokouchi M., Suzuki R., Sakamoto H., Mitsui K., Matsumoto A., Tanimura S., Ohtsubo M., Misawa H., Miyazaki T., Leonor N., Taniguchi T., Fujita T., Kanakura Y., Komiya S. and Yoshimura A.** (1997) A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387, 921-4.
- Eustace D., Han X., Gooding R., Rowbottom A., Riches P. and Heyderman E.** (1993) Interleukin-6 (IL-6) functions as an autocrine growth factor in cervical carcinomas in vitro. *Gynecol Oncol* 50, 15-9.
- Evander M., Frazer I. H., Payne E., Qi Y. M., Hengst K. and McMillan N. A.** (1997) Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* 71, 2449-56.
- Facchini L. M. and Penn L. Z.** (1998) The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *Faseb J* 12, 633-51.
- Fallarino F., Grohmann U., Hwang K. W., Orabona C., Vacca C., Bianchi R., Belladonna M. L., Fioretti M. C., Alegre M. L. and Puccetti P.** (2003) Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 4, 1206-12.
- Fan X. and Chen J. J.** (2004) Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the papillomavirus E6 oncogene. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 14, 183-202.
- Fan X., Liu Y. and Chen J. J.** (2005) Down-regulation of p21 contributes to apoptosis induced by HPV E6 in human mammary epithelial cells. *Apoptosis* 10, 63-73.
- Fattori E., Cappelletti M., Costa P., Sellitto C., Cantoni L., Carelli M., Faggioni R., Fantuzzi G., Ghezzi P. and Poli V.** (1994) Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. *J Exp Med* 180, 1243-50.
- Ferrara N.** (2005) VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology* 69 Suppl 3, 11-6.
- Filippova M., Brown-Bryan T. A., Casiano C. A. and Duerksen-Hughes P. J.** (2005) The human papillomavirus 16 E6 protein can either protect or further sensitize cells to TNF: effect of dose. *Cell Death Differ.* [Epub ahead of print].
- Filippova M., Parkhurst L. and Duerksen-Hughes P. J.** (2004) The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *J Biol Chem* 279, 25729-44.
- Filippova M., Song H., Connolly J. L., Dermody T. S. and Duerksen-Hughes P. J.** (2002) The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277, 21730-9.
- Finter N.B.** (1969) Dye uptake methods of assessing viral cytopathogenicity and their application to interferon assays. *J Gen Virol* 5, 419-27.
- Frassanito M. A., Cusmai A., Iodice G. and Dammacco F.** (2001) Autocrine interleukin-6 production and highly malignant multiple myeloma: relation with resistance to drug-induced apoptosis. *Blood* 97, 483-9.

- Freedman R. S., Bowen J. M., Leibovitz A., Pathak S., Siciliano M. J., Gallager H. S. and Giovanella B. C.** (1982) Characterization of a cell line (SW756) derived from a human squamous carcinoma of the uterine cervix. *In Vitro* 18, 719-26.
- Fujii S., Shimizu K., Smith C., Bonifaz L. and Steinman R. M.** (2003) Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein. *J Exp Med* 198, 267-79.
- Fujimoto Y., Tu L., Miller A. S., Bock C., Fujimoto M., Doyle C., Steeber D. A. and Tedder T. F.** (2002) CD83 expression influences CD4+ T cell development in the thymus. *Cell* 108, 755-67.
- Fukada T., Hibi M., Yamanaka Y., Takahashi-Tezuka M., Fujitani Y., Yamaguchi T., Nakajima K. and Hirano T.** (1996) Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity* 5, 449-60.
- Gabrilovich D. I., Chen H. L., Girgis K. R., Cunningham H. T., Meny G. M., Nadaf S., Kavanaugh D. and Carbone D. P.** (1996a) Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 2, 1096-103.
- Gabrilovich D. I., Ishida T., Nadaf S., Ohm J. E. and Carbone D. P.** (1999) Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving endogenous dendritic cell function. *Clin Cancer Res* 5, 2963-70.
- Gabrilovich D. I., Nadaf S., Corak J., Berzofsky J. A. and Carbone D. P.** (1996b) Dendritic cells in antitumor immune responses. II. Dendritic cells grown from bone marrow precursors, but not mature DC from tumor-bearing mice, are effective antigen carriers in the therapy of established tumors. *Cell Immunol* 170, 111-9.
- Gabrilovich D., Ishida T., Oyama T., Ran S., Kravtsov V., Nadaf S. and Carbone D. P.** (1998) Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* 92, 4150-66.
- Gastl G. A., Abrams J. S., Nanus D. M., Oosterkamp R., Silver J., Liu F., Chen M., Albino A. P. and Bander N. H.** (1993) Interleukin-10 production by human carcinoma cell lines and its relationship to interleukin-6 expression. *Int J Cancer* 55, 96-101.
- Gately M. K., Renzetti L. M., Magram J., Stern A. S., Adorini L., Gubler U. and Presky D. H.** (1998) The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol* 16, 495-521.

- Ge K., DuHadaway J., Du W., Herlyn M., Rodeck U. and Prendergast G. C.** (1999) Mechanism for elimination of a tumor suppressor: aberrant splicing of a brain-specific exon causes loss of function of Bin1 in melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9689-94.
- Ge K., Duhadaway J., Sakamuro D., Wechsler-Reya R., Reynolds C. and Prendergast G. C.** (2000a) Losses of the tumor suppressor BIN1 in breast carcinoma are frequent and reflect deficits in programmed cell death capacity. *Int J Cancer* 85, 376-83.
- Ge K., Minhas F., Duhadaway J., Mao N. C., Wilson D., Buccafusca R., Sakamuro D., Nelson P., Malkowicz S. B., Tomaszewski J. and Prendergast G. C.** (2000b) Loss of heterozygosity and tumor suppressor activity of Bin1 in prostate carcinoma. *Int J Cancer* 86, 155-61.
- Grandis J. R., Drenning S. D., Chakraborty A., Zhou M. Y., Zeng Q., Pitt A. S. and Tweardy D. J.** (1998) Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor-mediated cell growth in vitro. *J Clin Invest* 102, 1385-92.
- Green J. A., Kirwan J. M., Tierney J. F., Symonds P., Fresco L., Collingwood M. and Williams C. J.** (2001) Survival and recurrence after concomitant chemotherapy and radiotherapy for cancer of the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 358, 781-6.
- Gri G., Savio D., Trinchieri G. and Ma X.** (1998) Synergistic regulation of the human interleukin-12 p40 promoter by NF $\kappa$ B and Ets transcription factors in Epstein-Barr virus-transformed B cells and macrophages. *J Biol Chem* 273, 6431-8.
- Grohmann U., Fallarino F. and Puccetti P.** (2003) Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol* 24, 242-8.
- Grohmann U., Fallarino F., Bianchi R., Belladonna M. L., Vacca C., Orabona C., Uyttenhove C., Fioretti M. C. and Puccetti P.** (2001a) IL-6 inhibits the tolerogenic function of CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Immunol* 167, 708-14.
- Grohmann U., Fallarino F., Silla S., Bianchi R., Belladonna M. L., Vacca C., Micheletti A., Fioretti M. C. and Puccetti P.** (2001b) CD40 ligation ablates the tolerogenic potential of lymphoid dendritic cells. *J Immunol* 166, 277-83.
- Guermonprez P., Valladeau J., Zitvogel L., Thery C. and Amigorena S.** (2002) Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20, 621-67.
- Guidi A. J., Abu-Jawdeh G., Berse B., Jackman R. W., Tognazzi K., Dvorak H. F. and Brown L. F.** (1995) Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 87, 1237-45.
- Hanahan D. and Weinberg R. A.** (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

- Hansgen G., Kuhnt T., Pigorsch S., Strauss H. and Dunst J.** (2002) Adjuvant simultaneous radiochemotherapy after operated uterine cervix carcinoma in high risk situation. Results of a pilot study. *Strahlenther Onkol* 178, 71-7.
- Harroch S., Revel M. and Chebath J.** (1994) Induction by interleukin-6 of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) gene expression through the palindromic interferon response element pIRE and cell type-dependent control of IRF-1 binding to DNA. *Embo J* 13, 1942-9.
- Hart D. N.** (1997) Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90, 3245-87.
- Hashida T. and Yasumoto S.** (1991) Induction of chromosome abnormalities in mouse and human epidermal keratinocytes by the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. *J Gen Virol* 72 ( Pt 7), 1569-77.
- Hasskarl J., Butz K., Whitaker N., Ullmann A., Durst M. and Hoppe-Seyler F.** (2000) Differential cell cycle response of nontumorigenic and tumorigenic human papillomavirus-positive keratinocytes towards transforming growth factor-beta1. *J Mol Med* 78, 94-101.
- Hayakawa J., Ohmichi M., Kurachi H., Kanda Y., Hisamoto K., Nishio Y., Adachi K., Tasaka K., Kanzaki T. and Murata Y.** (2000) Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal-regulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin. *Cancer Res* 60, 5988-94.
- Hayes M. P., Murphy F. J. and Burd P. R.** (1998) Interferon-gamma-dependent inducible expression of the human interleukin-12 p35 gene in monocytes initiates from a TATA-containing promoter distinct from the CpG-rich promoter active in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells. *Blood* 91, 4645-51.
- Hayes M. P., Wang J. and Norcross M. A.** (1995) Regulation of interleukin-12 expression in human monocytes: selective priming by interferon-gamma of lipopolysaccharide-inducible p35 and p40 genes. *Blood* 86, 646-50.
- Hegde S.** (2003) Modulation of dendritic cell function by interleukin-6. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.
- Hegde S., Pahne J. and Smola-Hess S.** (2004) Novel immunosuppressive properties of interleukin-6 in dendritic cells: inhibition of NF-kappaB binding activity and CCR7 expression. *Faseb J* 18, 1439-41.
- Heinrich P. C., Behrmann I., Haan S., Hermanns H. M., Muller-Newen G. and Schaper F.** (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374, 1-20.

- Heinrich P. C., Behrmann I., Muller-Newen G., Schaper F. and Graeve L.** (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334 ( Pt 2), 297-314.
- Henriksson M. and Luscher B.** (1996) Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res* 68, 109-82.
- Hermeking H. and Eick D.** (1994) Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science* 265, 2091-3.
- Hess S., Kurrle R., Lauffer L., Riethmuller G. and Engelmann H.** (1995) A cytotoxic CD40/p55 tumor necrosis factor receptor hybrid detects CD40 ligand on herpesvirus saimiri-transformed T cells. *Eur J Immunol* 25, 80-6.
- Hess S., Smola H., Sandaradura De Silva U., Hadaschik D., Kube D., Baldus S. E., Flucke U. and Pfister H.** (2000) Loss of IL-6 receptor expression in cervical carcinoma cells inhibits autocrine IL-6 stimulation: abrogation of constitutive monocyte chemoattractant protein-1 production. *J Immunol* 165, 1939-48.
- Hinz M., Lemke P., Anagnostopoulos I., Hacker C., Krappmann D., Mathas S., Dorken B., Zenke M., Stein H. and Scheidereit C.** (2002) Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. *J Exp Med* 196, 605-17.
- Hirano T.** (1998) Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol* 16, 249-84.
- Hirano T., Ishihara K. and Hibi M.** (2000) Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* 19, 2548-56.
- Hirano T., Nakajima K. and Hibi M.** (1997) Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. *Cytokine Growth Factor Rev* 8, 241-52.
- Hoebe K., Du X., Georgel P., Janssen E., Tabeta K., Kim S. O., Goode J., Lin P., Mann N., Mudd S., Crozat K., Sovath S., Han J. and Beutler B.** (2003) Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 424, 743-8.
- Hoentjen F., Sartor R. B., Ozaki M. and Jobin C.** (2005) STAT3 regulates NF-kappaB recruitment to the IL-12p40 promoter in dendritic cells. *Blood* 105, 689-96.
- Howley P. M.** (1996) Papillomaviridae: The viruses and their replication. Raven Press, Philadelphia.
- Hsieh C. S., Macatonia S. E., Tripp C. S., Wolf S. F., O'Garra A. and Murphy K. M.** (1993) Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260, 547-9.

- Hwu P., Du M. X., Lapointe R., Do M., Taylor M. W. and Young H. A.** (2000) Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol* 164, 3596-9.
- Ihle J. N.** (1996) STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* 84, 331-4.
- Ihle J. N. and Kerr I. M.** (1995) Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet* 11, 69-74.
- Ishida T., Oyama T., Carbone D. P. and Gabrilovich D. I.** (1998) Defective function of Langerhans cells in tumor-bearing animals is the result of defective maturation from hemopoietic progenitors. *J Immunol* 161, 4842-51.
- Jacobs N., Giannini S. L., Doyen J., Baptista A., Moutschen M., Boniver J. and Delvenne P.** (1998) Inverse modulation of IL-10 and IL-12 in the blood of women with preneoplastic lesions of the uterine cervix. *Clin Exp Immunol* 111, 219-24.
- Janicke R. U., Lee F. H. and Porter A. G.** (1994) Nuclear c-Myc plays an important role in the cytotoxicity of tumor necrosis factor alpha in tumor cells. *Mol Cell Biol* 14, 5661-70.
- Jansen J. H., Wientjens G. J., Fibbe W. E., Willemze R. and Kluin-Nelemans H. C.** (1989) Inhibition of human macrophage colony formation by interleukin 4. *J Exp Med* 170, 577-82.
- Jonuleit H. and Schmitt E.** (2003) The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 171, 6323-7.
- Kamimura D., Ishihara K. and Hirano T.** (2003) IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 149, 1-38.
- Kavanaugh D. Y. and Carbone D. P.** (1996) Immunologic dysfunction in cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 10, 927-51.
- Kawano M., Hirano T., Matsuda T., Taga T., Horii Y., Iwato K., Asaoku H., Tang B., Tanabe O., Tanaka H. and *et al.*** (1988) Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 332, 83-5.
- Kennedy M. K., Picha K. S., Fanslow W. C., Grabstein K. H., Alderson M. R., Clifford K. N., Chin W. A. and Mohler K. M.** (1996) CD40/CD40 ligand interactions are required for T cell-dependent production of interleukin-12 by mouse macrophages. *Eur J Immunol* 26, 370-8.
- Keys H. M., Bundy B. N., Stehman F. B., Muderspach L. I., Chafe W. E., Suggs C. L., 3rd, Walker J. L. and Gersell D.** (1999) Cisplatin, radiation, and adjuvant hysterectomy compared with radiation and adjuvant hysterectomy for bulky stage IB cervical carcinoma. *N Engl J Med* 340, 1154-61.
- Kinjo I., Hanada T., Inagaki-Ohara K., Mori H., Aki D., Ohishi M., Yoshida H., Kubo M. and Yoshimura A.** (2002) SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation. *Immunity* 17, 583-91.

- Kishimoto T.** (2005) Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* 23, 1-21.
- Kiuchi N., Nakajima K., Ichiba M., Fukada T., Narimatsu M., Mizuno K., Hibi M. and Hirano T.** (1999) STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *J Exp Med* 189, 63-73.
- Kleefstrom J., Arighi E., Littlewood T., Jaattela M., Saksela E., Evan G. I. and Alitalo K.** (1997) Induction of TNF-sensitive cellular phenotype by c-Myc involves p53 and impaired NF-kappaB activation. *Embo J* 16, 7382-92.
- Kleefstrom J., Vastrik I., Saksela E., Valle J., Eilers M. and Alitalo K.** (1994) c-Myc induces cellular susceptibility to the cytotoxic action of TNF-alpha. *Embo J* 13, 5442-50.
- Kobayashi A., Greenblatt R. M., Anastos K., Minkoff H., Massad L. S., Young M., Levine A. M., Darragh T. M., Weinberg V. and Smith-McCune K. K.** (2004) Functional attributes of mucosal immunity in cervical intraepithelial neoplasia and effects of HIV infection. *Cancer Res* 64, 6766-74.
- Kobayashi M.** (2005) Abstract H-03, 22nd International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop, Vancouver, BC, Kanada.
- Kobayashi M., Fitz L., Ryan M., Hewick R. M., Clark S. C., Chan S., Loudon R., Sherman F., Perussia B. and Trinchieri G.** (1989) Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 170, 827-45.
- Koivusalo R., Krausz E., Helenius H. and Hietanen S.** (2005) Chemotherapy compounds in cervical cancer cells primed by reconstitution of p53 function after short interfering RNA-mediated degradation of human papillomavirus 18 E6 mRNA: opposite effect of siRNA in combination with different drugs. *Mol Pharmacol* 68, 372-82.
- Liu Z. G.** (2005) Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell Res* 15, 24-7.
- Livingstone L. R., White A., Sprouse J., Livanos E., Jacks T. and Tlsty T. D.** (1992) Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* 70, 923-35.
- Logan G. J., Smyth C. M., Earl J. W., Zaikina I., Rowe P. B., Smythe J. A. and Alexander I. E.** (2002) HeLa cells cocultured with peripheral blood lymphocytes acquire an immunoinhibitory phenotype through up-regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase activity. *Immunology* 105, 478-87.
- Lotz M., Jirik F., Kabouridis P., Tsoukas C., Hirano T., Kishimoto T. and Carson D. A.** (1988) B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *J Exp Med* 167, 1253-8.

- Lu H. T., Yang D. D., Wysk M., Gatti E., Mellman I., Davis R. J. and Flavell R. A.** (1999) Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. *Embo J* 18, 1845-57.
- Lyakh L. A., Sanford M., Chekol S., Young H. A. and Roberts A. B.** (2005) TGF-beta and vitamin D3 utilize distinct pathways to suppress IL-12 production and modulate rapid differentiation of human monocytes into CD83+ dendritic cells. *J Immunol* 174, 2061-70.
- Ma X. and Trinchieri G.** (2001) Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells. *Adv Immunol* 79, 55-92.
- Ma X., Aste-Amezaga M. and Trinchieri G.** (1996) Regulation of interleukin-12 production. *Ann N Y Acad Sci* 795, 13-25.
- Ma X., Aste-Amezaga M., Gri G., Gerosa F. and Trinchieri G.** (1997) Immunomodulatory functions and molecular regulation of IL-12. *Chem Immunol* 68, 1-22.
- Macatonia S. E., Hosken N. A., Litton M., Vieira P., Hsieh C. S., Culpepper J. A., Wysocka M., Trinchieri G., Murphy K. M. and O'Garra A.** (1995) Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 154, 5071-9.
- Malejczyk J., Malejczyk M., Urbanski A., Kock A., Jablonska S., Orth G. and Luger T. A.** (1991) Constitutive release of IL6 by human papillomavirus type 16 (HPV16)-harboring keratinocytes: a mechanism augmenting the NK-cell-mediated lysis of HPV-bearing neoplastic cells. *Cell Immunol* 136, 155-64.
- Manetti R., Parronchi P., Giudizi M. G., Piccinni M. P., Maggi E., Trinchieri G. and Romagnani S.** (1993) Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* 177, 1199-204.
- McCance D.J.** (2006) The biology of the E7 protein of HPV16. In Campo M.S. (ed), *Papillomavirus research: From natural history to vaccines and beyond*. Caister Academic Press, Norfolk.
- Medzhitov R.** (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1, 135-45.
- Mellor A. L., Chandler P., Baban B., Hansen A. M., Marshall B., Pihkala J., Waldmann H., Cobbold S., Adams E. and Munn D. H.** (2004) Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase. *Int Immunol* 16, 1391-401.
- Mellor A. L., Keskin D. B., Johnson T., Chandler P. and Munn D. H.** (2002) Cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase inhibit T cell responses. *J Immunol* 168, 3771-6.

- Menetrier-Caux C., Montmain G., Dieu M. C., Bain C., Favrot M. C., Caux C. and Blay J. Y.** (1998) Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 92, 4778-91.
- Miki S., Iwano M., Miki Y., Yamamoto M., Tang B., Yokokawa K., Sonoda T., Hirano T. and Kishimoto T.** (1989) Interleukin-6 (IL-6) functions as an in vitro autocrine growth factor in renal cell carcinomas. *FEBS Lett* 250, 607-10.
- Miles S. A., Rezai A. R., Salazar-Gonzalez J. F., Vander Meyden M., Stevens R. H., Logan D. M., Mitsuyasu R. T., Taga T., Hirano T., Kishimoto T. and et al.** (1990) AIDS Kaposi sarcoma-derived cells produce and respond to interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4068-72.
- Mora J. R., Bono M. R., Manjunath N., Weninger W., Cavanagh L. L., Roseblatt M. and Von Andrian U. H.** (2003) Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature* 424, 88-93.
- Morris M., Eifel P. J., Lu J., Grigsby P. W., Levenback C., Stevens R. E., Rotman M., Gershenson D. M. and Mutch D. G.** (1999) Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Engl J Med* 340, 1137-43.
- Muggia F. M., Blessing J. A., McGehee R. and Monk B. J.** (2004) Cisplatin and irinotecan in squamous cell carcinoma of the cervix: a phase II study of the Gynecologic Oncology Group. *Gynecol Oncol* 94, 483-7.
- Muller A. J., DuHadaway J. B., Donover P. S., Sutanto-Ward E. and Prendergast G. C.** (2004) Targeted deletion of the suppressor gene bin1/amphiphysin2 accentuates the neoplastic character of transformed mouse fibroblasts. *Cancer Biol Ther* 3, 1236-42.
- Muller A. J., DuHadaway J. B., Donover P. S., Sutanto-Ward E. and Prendergast G. C.** (2005) Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat Med* 11, 312-9.
- Muller L., Kiessling R., Rees R. C. and Pawelec G.** (2002) Escape mechanisms in tumor immunity: an update. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 21, 277-330.
- Munn D. H., Sharma M. D., Hou D., Baban B., Lee J. R., Antonia S. J., Messina J. L., Chandler P., Koni P. A. and Mellor A. L.** (2004) Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest* 114, 280-90.
- Munn D. H., Sharma M. D., Lee J. R., Jhaver K. G., Johnson T. S., Keskin D. B., Marshall B., Chandler P., Antonia S. J., Burgess R., Slingluff C. L., Jr. and Mellor A. L.** (2002) Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* 297, 1867-70.

- Munn D. H., Zhou M., Attwood J. T., Bondarev I., Conway S. J., Marshall B., Brown C. and Mellor A. L.** (1998) Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281, 1191-3.
- Munoz N., Bosch F. X., de Sanjose S., Herrero R., Castellsague X., Shah K. V., Snijders P. J. and Meijer C. J.** (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348, 518-27.
- Muraguchi A., Hirano T., Tang B., Matsuda T., Horii Y., Nakajima K. and Kishimoto T.** (1988) The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J Exp Med* 167, 332-44.
- Murphy K. M. and Reiner S. L.** (2002) The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2, 933-44.
- Murphy T. L., Cleveland M. G., Kulesza P., Magram J. and Murphy K. M.** (1995) Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF-kappa B half-site. *Mol Cell Biol* 15, 5258-67.
- Nagayama H., Sato K., Kawasaki H., Enomoto M., Morimoto C., Tadokoro K., Juji T., Asano S. and Takahashi T. A.** (2000) IL-12 responsiveness and expression of IL-12 receptor in human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 165, 59-66.
- Naka T., Narazaki M., Hirata M., Matsumoto T., Minamoto S., Aono A., Nishimoto N., Kajita T., Taga T., Yoshizaki K., Akira S. and Kishimoto T.** (1997) Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 387, 924-9.
- Nakagawa R., Naka T., Tsutsui H., Fujimoto M., Kimura A., Abe T., Seki E., Sato S., Takeuchi O., Takeda K., Akira S., Yamanishi K., Kawase I., Nakanishi K. and Kishimoto T.** (2002) SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity* 17, 677-87.
- Nebert D. W. and Gelboin H. V.** (1970) The role of ribonucleic acid and protein synthesis in microsomal aryl hydrocarbon hydroxylase induction in cell culture. The independence of transcription and translation. *J Biol Chem* 245, 160-8.
- Nefedova Y., Cheng P., Gilkes D., Blaskovich M., Beg A. A., Sebt S. M. and Gabilovich D. I.** (2005) Activation of dendritic cells via inhibition of Jak2/STAT3 signaling. *J Immunol* 175, 4338-46.
- Nesbit C. E., Tersak J. M. and Prochownik E. V.** (1999) MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 18, 3004-16.
- Nicholson S. E., Willson T. A., Farley A., Starr R., Zhang J. G., Baca M., Alexander W. S., Metcalf D., Hilton D. J. and Nicola N. A.** (1999) Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. *Embo J* 18, 375-85.

- Okamoto M., Hattori K. and Oyasu R.** (1997) Interleukin-6 functions as an autocrine growth factor in human bladder carcinoma cell lines in vitro. *Int J Cancer* 72, 149-54.
- Omata N., Yasutomi M., Yamada A., Iwasaki H., Mayumi M. and Ohshima Y.** (2002) Monocyte chemoattractant protein-1 selectively inhibits the acquisition of CD40 ligand-dependent IL-12-producing capacity of monocyte-derived dendritic cells and modulates Th1 immune response. *J Immunol* 169, 4861-6.
- Park S. J., Nakagawa T., Kitamura H., Atsumi T., Kamon H., Sawa S., Kamimura D., Ueda N., Iwakura Y., Ishihara K., Murakami M. and Hirano T.** (2004) IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J Immunol* 173, 3844-54.
- Pearcey R., Brundage M., Drouin P., Jeffrey J., Johnston D., Lukka H., MacLean G., Souhami L., Stuart G. and Tu D.** (2002) Phase III trial comparing radical radiotherapy with and without cisplatin chemotherapy in patients with advanced squamous cell cancer of the cervix. *J Clin Oncol* 20, 966-72.
- Persons D. L., Yazlovitskaya E. M., Cui W. and Pelling J. C.** (1999) Cisplatin-induced activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian carcinoma cells: inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity increases sensitivity to cisplatin. *Clin Cancer Res* 5, 1007-14.
- Peters W. A., 3rd, Liu P. Y., Barrett R. J., 2nd, Stock R. J., Monk B. J., Berek J. S., Souhami L., Grigsby P., Gordon W., Jr. and Alberts D. S.** (2000) Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early-stage cancer of the cervix. *J Clin Oncol* 18, 1606-13.
- Pfister H.** (1984) Biology and biochemistry of papillomaviruses. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 99, 111-81.
- Pfister H. and Fuchs P. G.** (1987) Papillomaviruses: Particles, genome organization and proteins. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Plevy S. E., Gemberling J. H., Hsu S., Dorner A. J. and Smale S. T.** (1997) Multiple control elements mediate activation of the murine and human interleukin 12 p40 promoters: evidence of functional synergy between C/EBP and Rel proteins. *Mol Cell Biol* 17, 4572-88.
- Purdie K. J., Sexton C. J., Proby C. M., Glover M. T., Williams A. T., Stables J. N. and Leigh I. M.** (1993) Malignant transformation of cutaneous lesions in renal allograft patients: a role for human papillomavirus. *Cancer Res* 53, 5328-33.
- Rodriguez A., Regnault A., Kleijmeer M., Ricciardi-Castagnoli P. and Amigorena S.** (1999) Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol* 1, 362-8.

- Romani N., Gruner S., Brang D., Kampgen E., Lenz A., Trockenbacher B., Konwalinka G., Fritsch P. O., Steinman R. M. and Schuler G.** (1994) Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 180, 83-93.
- Romani N., Reider D., Heuer M., Ebner S., Kampgen E., Eibl B., Niederwieser D. and Schuler G.** (1996) Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 196, 137-51.
- Rosl F., Lengert M., Albrecht J., Kleine K., Zawatzky R., Schraven B. and zur Hausen H.** (1994) Differential regulation of the JE gene encoding the monocyte chemoattractant protein (MCP-1) in cervical carcinoma cells and derived hybrids. *J Virol* 68, 2142-50.
- Routes J. M., Morris K., Ellison M. C. and Ryan S.** (2005) Macrophages kill human papillomavirus type 16 E6-expressing tumor cells by tumor necrosis factor alpha- and nitric oxide-dependent mechanisms. *J Virol* 79, 116-23.
- Sadowski H. B., Shuai K., Darnell J. E., Jr. and Gilman M. Z.** (1993) A common nuclear signal transduction pathway activated by growth factor and cytokine receptors. *Science* 261, 1739-44.
- Sakaguchi S.** (2003) Control of immune responses by naturally arising CD4+ regulatory T cells that express toll-like receptors. *J Exp Med* 197, 397-401.
- Sakamoto H., Yasukawa H., Masuhara M., Tanimura S., Sasaki A., Yuge K., Ohtsubo M., Ohtsuka A., Fujita T., Ohta T., Furukawa Y., Iwase S., Yamada H. and Yoshimura A.** (1998) A Janus kinase inhibitor, JAB, is an interferon-gamma-inducible gene and confers resistance to interferons. *Blood* 92, 1668-76.
- Sakamuro D., Elliott K. J., Wechsler-Reya R. and Prendergast G. C.** (1996) BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumour suppressor. *Nat Genet* 14, 69-77.
- Salkowski C. A., Kopydlowski K., Blanco J., Cody M. J., McNally R. and Vogel S. N.** (1999) IL-12 is dysregulated in macrophages from IRF-1 and IRF-2 knockout mice. *J Immunol* 163, 1529-36.
- Sallusto F. and Lanzavecchia A.** (1994) Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179, 1109-18.
- Sallusto F., Cella M., Danieli C. and Lanzavecchia A.** (1995) Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182, 389-400.
- Sallusto F., Schaerli P., Loetscher P., Schaniel C., Lenig D., Mackay C. R., Qin S. and Lanzavecchia A.** (1998) Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 28, 2760-9.

- Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T.** (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Schindler R., Mancilla J., Endres S., Ghorbani R., Clark S. C. and Dinarello C. A.** (1990) Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 75, 40-7.
- Schmidt E. V.** (1999) The role of c-myc in cellular growth control. *Oncogene* 18, 2988-96.
- Schulz O., Edwards A. D., Schito M., Aliberti J., Manickasingham S., Sher A. and Reis e Sousa C.** (2000) CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity* 13, 453-62.
- Schwarz E., Freese U. K., Gissmann L., Mayer W., Roggenbuck B., Stremlau A. and zur Hausen H.** (1985) Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 314, 111-4.
- Sehgal P. B., Helfgott D. C., Santhanam U., Tatter S. B., Clarick R. H., Ghayeb J. and May L. T.** (1988) Regulation of the acute phase and immune responses in viral disease. Enhanced expression of the beta 2-interferon/hepatocyte-stimulating factor/interleukin 6 gene in virus-infected human fibroblasts. *J Exp Med* 167, 1951-6.
- Shafti-Keramat S., Handisurya A., Kriehuber E., Meneguzzi G., Slupetzky K. and Kirnbauer R.** (2003) Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol* 77, 13125-35.
- Shah K. V. and Howley P. M.** (1996) *Papillomaviruses*. Raven Press, Philadelphia.
- Sheu B. C., Lin R. H., Lien H. C., Ho H. N., Hsu S. M. and Huang S. C.** (2001) Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. *J Immunol* 167, 2972-8.
- Smola-Hess S. and Pfister H.** (2006) Immune evasion in genital papillomavirus infection and cervical cancer: role of cytokines and chemokines. In Campo M.S. (ed), *Papillomavirus research: From natural history to vaccines and beyond*. Caister Academic Press, Norfolk.
- Smola-Hess S. and Pfister H.J.** (2002) Interaction of papillomaviral oncoproteins with cellular factors. In Bogner E. and Holzenburg A. (eds), *Structure-function relationships of human pathogenic viruses*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Smola-Hess S., de Silva U. S., Hadaschik D. and Pfister H. J.** (2001) Soluble interleukin-6 receptor activates the human papillomavirus type 18 long control region in SW756 cervical carcinoma cells in a STAT3-dependent manner. *J Gen Virol* 82, 2335-9.

- Sozzani S., Allavena P., D'Amico G., Luini W., Bianchi G., Kataura M., Imai T., Yoshie O., Bonecchi R. and Mantovani A.** (1998) Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 161, 1083-6.
- Spencer C. A. and Groudine M.** (1991) Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res* 56, 1-48.
- Spitkovsky D., Hehner S. P., Hofmann T. G., Moller A. and Schmitz M. L.** (2002) The human papillomavirus oncoprotein E7 attenuates NF-kappa B activation by targeting the Ikappa B kinase complex. *J Biol Chem* 277, 25576-82.
- Srivani R. and Nagarajan B.** (2003) A prognostic insight on in vivo expression of interleukin-6 in uterine cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 13, 331-9.
- Starr R., Willson T. A., Viney E. M., Murray L. J., Rayner J. R., Jenkins B. J., Gonda T. J., Alexander W. S., Metcalf D., Nicola N. A. and Hilton D. J.** (1997) A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387, 917-21.
- Steinbrink K., Wolfi M., Jonuleit H., Knop J. and Enk A. H.** (1997) Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 159, 4772-80.
- Steinman R. M.** (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9, 271-96.
- Stern A. S., Podlaski F. J., Hulmes J. D., Pan Y. C., Quinn P. M., Wolitzky A. G., Familletti P. C., Stremlo D. L., Truitt T., Chizzonite R. and et al.** (1990) Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6808-12.
- Stoler M. H., Wolinsky S. M., Whitbeck A., Broker T. R. and Chow L. T.** (1989) Differentiation-linked human papillomavirus types 6 and 11 transcription in genital condylomata revealed by in situ hybridization with message-specific RNA probes. *Virology* 172, 331-40.
- Stoll S., Delon J., Brotz T. M. and Germain R. N.** (2002) Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* 296, 1873-6.
- Stone T. W. and Darlington L. G.** (2002) Endogenous kynurenes as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 1, 609-20.
- Stoppler M. C., Straight S. W., Tsao G., Schlegel R. and McCance D. J.** (1996) The E5 gene of HPV-16 enhances keratinocyte immortalization by full-length DNA. *Virology* 223, 251-4.
- Tada Y., Asahina A., Fujita H., Mitsui H., Torii H., Watanabe T. and Tamaki K.** (2004) Differential effects of LPS and TGF-beta on the production of IL-6 and IL-12 by Langerhans cells, splenic dendritic cells, and macrophages. *Cytokine* 25, 155-61.

- Taga T., Hibi M., Hirata Y., Yamasaki K., Yasukawa K., Matsuda T., Hirano T. and Kishimoto T.** (1989) Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 58, 573-81.
- Tajiri T., Liu X., Thompson P. M., Tanaka S., Suita S., Zhao H., Maris J. M., Prendergast G. C. and Hogarty M. D.** (2003) Expression of a MYCN-interacting isoform of the tumor suppressor BIN1 is reduced in neuroblastomas with unfavorable biological features. *Clin Cancer Res* 9, 3345-55.
- Takenaka H., Maruo S., Yamamoto N., Wysocka M., Ono S., Kobayashi M., Yagita H., Okumura K., Hamaoka T., Trinchieri G. and Fujiwara H.** (1997) Regulation of T cell-dependent and -independent IL-12 production by the three Th2-type cytokines IL-10, IL-6, and IL-4. *J Leukoc Biol* 61, 80-7.
- Tamura T., Udagawa N., Takahashi N., Miyaura C., Tanaka S., Yamada Y., Koishihara Y., Ohsugi Y., Kumaki K., Taga T. and *et al.*** (1993) Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11924-8.
- Thomas J. T., Laimins L. A. and Ruesch M. N.** Perturbation of cell cycle control by E6 and E7 oncoproteins of human papillomaviruses. *Papillomavirus Report* 9, 59-64.
- Thyrell L., Sangfelt O., Zhivotovsky B., Pokrovskaja K., Wang Y., Einhorn S. and Grander D.** (2005) The HPV-16 E7 oncogene sensitizes malignant cells to IFN-alpha-induced apoptosis. *J Interferon Cytokine Res* 25, 63-72.
- Trinchieri G.** (1998) Immunobiology of interleukin-12. *Immunol Res* 17, 269-78.
- Uyttenhove C., Coulie P. G. and Van Snick J.** (1988) T cell growth and differentiation induced by interleukin-HP1/IL-6, the murine hybridoma/plasmacytoma growth factor. *J Exp Med* 167, 1417-27.
- Van Damme J., Schaafsma M. R., Fibbe W. E., Falkenburg J. H., Opdenakker G. and Billiau A.** (1989) Simultaneous production of interleukin 6, interferon-beta and colony-stimulating activity by fibroblasts after viral and bacterial infection. *Eur J Immunol* 19, 163-8.
- van Regenmortel M. H., Mayo M. A., Fauquet C. M. and Maniloff J.** (2000) Virus nomenclature: consensus versus chaos. *Arch Virol* 145, 2227-32.
- Wadee A. A., Sussman G., Kuschke R. H. and Reddy S. G.** (1993) Suppression of cytokine production by supernatants from CD8+ lymphocytes activated by mycobacterial fractions: the role of interleukins 4 and 6. *Biotherapy* 7, 125-36.
- Walboomers J. M., Jacobs M. V., Manos M. M., Bosch F. X., Kummer J. A., Shah K. V., Snijders P. J., Peto J., Meijer C. J. and Munoz N.** (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189, 12-9.
- Wang X., Martindale J. L. and Holbrook N. J.** (2000) Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* 275, 39435-43.

- Weinmann A. S., Mitchell D. M., Sanjabi S., Bradley M. N., Hoffmann A., Liou H. C. and Smale S. T.** (2001) Nucleosome remodeling at the IL-12 p40 promoter is a TLR-dependent, Rel-independent event. *Nat Immunol* 2, 51-7.
- Wen Z., Zhong Z. and Darnell J. E., Jr.** (1995) Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82, 241-50.
- Wojtowicz-Praga S.** (1997) Reversal of tumor-induced immunosuppression: a new approach to cancer therapy. *J Immunother* 20, 165-77.
- Wolf S. F., Temple P. A., Kobayashi M., Young D., Diczig M., Lowe L., Dzialo R., Fitz L., Ferenz C., Hewick R. M. and et al.** (1991) Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J Immunol* 146, 3074-81.
- Yasukawa H., Ohishi M., Mori H., Murakami M., Chinen T., Aki D., Hanada T., Takeda K., Akira S., Hoshijima M., Hirano T., Chien K. R. and Yoshimura A.** (2003) IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat Immunol* 4, 551-6.
- Yee C., Krishnan-Hewlett I., Baker C. C., Schlegel R. and Howley P. M.** (1985) Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 119, 361-6.
- Yeh P. Y., Chuang S. E., Yeh K. H., Song Y. C., Ea C. K. and Cheng A. L.** (2002) Increase of the resistance of human cervical carcinoma cells to cisplatin by inhibition of the MEK to ERK signaling pathway partly via enhancement of anticancer drug-induced NF kappa B activation. *Biochem Pharmacol* 63, 1423-30.
- Yin Y., Tainsky M. A., Bischoff F. Z., Strong L. C. and Wahl G. M.** (1992) Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell* 70, 937-48.
- Yoshida R., Imai T., Hieshima K., Kusuda J., Baba M., Kitaura M., Nishimura M., Kakizaki M., Nomiyama H. and Yoshie O.** (1997) Molecular cloning of a novel human CC chemokine EBI1-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EBI1, CCR7. *J Biol Chem* 272, 13803-9.
- Yu H. and Jove R.** (2004) The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 4, 97-105.
- Zabel U., Schreck R. and Baeuerle P. A.** (1991) DNA binding of purified transcription factor NF-kappa B. Affinity, specificity, Zn<sup>2+</sup> dependence, and differential half-site recognition. *J Biol Chem* 266, 252-60.

- zur Hausen H.** (2000) Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 92, 690-8.
- zur Hausen H. and de Villiers E. M.** (1994) Human papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol* 48, 427-47.

## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen - die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Dr. h.c. Herbert J. Pfister betreut worden.

---

(Jennifer Pahne)

Publikationen:

**Smola-Hess S., Pahne J., Mauch C., Zigrino P., Smola H. und Pfister H.J.**

Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase in papillomavirus-positive cells: role of the human papillomavirus (HPV) 16 and HPV8 E7 gene products. *J Gen Virol.* 2005 May; 86 (Pt 5):1291-6

**Hegde S., Pahne J. und Smola-Hess S.** Novel immunosuppressive properties

of interleukin-6 in dendritic cells: inhibition of NF-kappaB binding activity and CCR7 expression. *FASEB J.* 2004 Sep; 18 (12):1439-41

Vortrag:

**Pahne J., Sandaradura de Silva U. und Smola-Hess S.** STAT3-activating

cytokines sensitize HPV-transformed keratinocytes to TNF $\alpha$  mediated cell death. Gesellschaft für Virologie Annual Meeting 2005 in Hannover.  
Vortrag.

# **LEBENS LAUF**

## **PERSÖNLICHE DATEN:**

Name, Vorname: Pahne, Jennifer  
geboren: 12. Juni 1975 in Lemgo  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## **SCHULAU SBILDUNG:**

1981 - 1985 Katholische Grundschule Bergneustadt  
1985 - 1995 St. Franziskus-Gymnasium Olpe  
06/1995 Allgemeine Hochschulreife

## **HOCHSCHULAU SBILDUNG:**

1995 - 2002 Studium der Biologie (Diplom) an der  
Universität zu Köln  
07/1998 Vordiplom  
11/1998 - 03/1999 Praktikum am Institut für Virologie der Universität zu Köln  
unter Anleitung von Prof. Dr. med. S. Smola  
12/2000 Diplom Hauptprüfungen: Genetik, Biochemie und  
Entwicklungsbiologie  
01/2001 - 01/2002 Diplomarbeit am Institut für Virologie der Universität zu  
Köln unter Anleitung von Prof. Dr. med. S. Smola  
Thema: „Einfluss von Zytokinsignalen auf die Aktivität des  
frühen HPV18 Promotors“  
03/2002 - 05/2006 Dissertation am Institut für Virologie der Universität zu  
Köln unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. h.c. H. J. Pfister  
Thema: „Konsequenzen der Interleukin-6  
Signaltransduktion in Zervixkarzinomzellen und  
dendritischen Zellen“

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. H. J. Pfister danke ich für die Betreuung meiner Promotion und die immerwährende Diskussionsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. S. Smola für die Themenstellung, die Betreuung der Arbeit, die Diskussionsbereitschaft, ihre Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit und die vielen, hilfreichen Antworten auf alle „kurzen“ Fragen.

Frau Prof. Dr. K. Schnetz danke ich für ihre Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten.

Frau PD Dr. C. Wickenhauser danke ich für das zur Verfügung stellen der Patientinnen-Proben und die Durchführung der immunhistochemischen Untersuchungen. Frau Prof. Dr. med. Gathof möchte ich für die Bereitstellung der *Buffy Coats* danken.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts möchte ich mich für das angenehme und nette Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft bedanken. Ganz besonderer Dank gilt meinen Kollegen Ute Sandaradura de Silva, Nadine Schröer, David Müller, Susanne Schmidt, Alexandra van Mil, Tanya Sperling, Lena Dürbaum und Dr. Steffi Silling für die vielen hilfreichen Ratschläge, die Diskussionsstunden, die technische Assistenz, die Unterstützung bei manchen Experimenten sowie diverse nette Kaffee/Zigaretten/Kuchen-Pausen. Nadine Schröer danke ich außerdem für die gute Laune, das tolle Arbeits-„Klima“ und die geschmackvollen Mittagspausen. Meinem Ex-Kollegen Dr. Subramanya Hegde möchte ich für die Vorarbeiten, die Einführung in die Methodik und die vielen Tipps und Ratschläge danken.

Thomas, meinen Eltern und dem Rest meiner Familie danke ich von ganzem Herzen für die Geduld, die Rücksichtnahme, die verständnisvolle Unterstützung und die vielen aufmunternden Worte. Außerdem danke ich Ben für die Hilfe beim Lösen von verschiedenen Computer-Problemen und Ivonne fürs Zuhören, „Mitleiden“ (besonders bei „Agnes-Kerstin“) und Allem übrigen.