

Aus der Klinik und Poliklinik für  
Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie  
Chirurgische Klinik I  
Direktor: Professor Dr. med. C.-T. Germer  
Molekulare Onkoimmunologie  
Prof. Dr. Ana Maria Waaga-Gasser

Untersuchungen zu den  
kostimulatorischen Signalwegen  
PD-1/PD-L1 und CD137/CD137L  
beim kolorektalen Karzinom

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Martin Wagner  
aus Ravensburg

Würzburg, Juni 2018

Referent: Professor Dr. M. Gasser

Koreferent: Professor Dr. M. Scheurlen

Dekan: Professor Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juli 2019

Der Promovend ist Arzt.

MEINEN ELTERN

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Das kolorektale Karzinom .....	1
1.2 Immunologischer Hintergrund der Tumorabwehr .....	4
1.3 PD-1 .....	5
1.4 CD137 .....	8
2 Fragestellungen der Arbeit .....	10
3 Material und Methoden.....	12
3.1 Material .....	12
3.1.1 Zellkulturen .....	12
3.1.2 Sonden und Antikörper .....	12
3.1.2.1 Verwendete Sonden für die TaqMan-RT-qPCR .....	12
3.1.2.2 Verwendete Antikörper für die Western-Blot-Analyse.....	13
3.1.2.3 Verwendete Antikörper für die FACS-Analyse.....	13
3.1.3 Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen.....	14
3.2 Methoden .....	15
3.2.1 Zellkultur .....	15
3.2.1.1 Kultivierung der Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 .....	15
3.2.1.2 Auftauen der gefrorenen Zellen .....	15
3.2.1.3 Kultur und Splitten adhärenter Zellen .....	16
3.2.1.4 Automatische Zellzählung nach Trypanblau-Färbung .....	16
3.2.1.5 Vorbereiten der adhärenter Zellen zur Probenaufbereitung.....	16
3.2.1.6 cDNA-Synthese .....	17
3.2.1.7 Real Time Quantitative PCR (RT-qPCR).....	17
3.2.1.8 Western Blot.....	18
3.2.1.9 Durchflusszytometrie .....	19

3.2.2 Aufarbeitung der murinen Gewebeproben .....	19
3.2.3 Aufarbeiten der humanen Gewebeproben .....	19
3.2.4 Statistische Analyse.....	20
4 Ergebnisse .....	21
4.1 Einfluss der Wachstumsbedingungen auf die Expression der kostimulatorischen Signalwege im Kolonkarzinom .....	21
4.1.1 PD-1-Expression in SW480, SW620 und HT-29 Kolonkarzinomzellen .....	21
4.1.1.1 SW480 Kolonkarzinom .....	21
4.1.1.2 SW620 Kolonkarzinom .....	22
4.1.1.3 HT-29 Kolonkarzinom .....	22
4.1.1.4 Vergleich der PD-1-Expression innerhalb der verschiedenen Kolonkarzinome.....	23
4.1.2 PD-L1-Expression in SW480, SW620 und HT-29 Kolonkarzinomzellen .....	25
4.1.2.1 SW480 Kolonkarzinom .....	25
4.1.2.2 SW620 Kolonkarzinom .....	26
4.1.2.3 HT-29 Kolonkarzinom .....	26
4.1.2.4 Vergleich der PD-L1-Expression innerhalb der verschiedenen Kolonkarzinome.....	27
4.1.3 CD137-Expression in SW480, SW620 und HT-29 Kolonkarzinomzellen .....	28
4.1.3.1 SW480 Kolonkarzinom .....	28
4.1.3.2 SW620 Kolonkarzinom .....	29
4.1.3.3 HT-29 Kolonkarzinom .....	30
4.1.3.4 Vergleich der CD137-Expression innerhalb der verschiedenen Kolonkarzinome.....	31

4.1.4 CD137L-Expression in SW480, SW620 und HT-29 Kolonkarzinomzellen .....	32
4.1.4.1 SW480 Kolonkarzinom .....	32
4.1.4.2 SW620 Kolonkarzinom .....	33
4.1.4.3 HT-29 Kolonkarzinom .....	34
4.1.4.4 Vergleich der CD137L-Expression innerhalb der verschiedenen Kolonkarzinome .....	35
4.2 Relative Genexpression von PD-1/PD-L1 und CD137/CD137L im murinen Modell .....	36
4.2.1 SW480 Kolonkarzinom .....	37
4.2.2 HT-29 Kolonkarzinom .....	38
4.2.3 Relative Genexpression von PD-1/PD-L1 und CD137/CD137L im humanen Kolonkarzinom .....	40
4.2.4 Korrelationsanalyse der relativen Genexpression von PD-1/PD-L1 und CD137/CD137L .....	41
5 Beantwortung der Fragen .....	43
6 Diskussion .....	47
6.1 Expression von PD-1 und CD137 sowie ihrer Liganden in Kolonkarzinomzellen .....	47
6.1.1 Expression von PD-1 im humanen Kolonkarzinom .....	47
6.1.2 Expression von PD-L1 im humanen Kolonkarzinom .....	49
6.1.3 Expression von CD137 im humanen Kolonkarzinom .....	51
6.1.4 Expression von CD137L im humanen Kolonkarzinom .....	53
6.2 Korrelation der PD1/PD-L1- und CD137/CD137L-Expression im humanen Kolonkarzinom .....	56
6.3 Klinische Bedeutung und Ausblick .....	56
7 Zusammenfassung .....	60

8 Literaturverzeichnis .....	62
9 Abbildungsverzeichnis.....	74
10 Tabellenverzeichnis.....	75

## Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
APC	Antigen Presenting Cell („Antigen-präsentierende Zelle“)
CD	Cluster of Differentiation („Unterscheidungsgruppen“)
CRC	Colorectal Cancer („kolorektales Karzinom“)
DNA	Desoxyribonucleic Acid („Desoxyribonukleinsäure“)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting („Durchflusszytometrie“)
FHC	Fetal Human Colon („fetales menschliches Kolon“)
Ig	Immunglobulin
Konz	Konzentration
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer („nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom“)
OS	Overall Survival („Gesamtüberleben“)
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell („mononukleäre Zellen des peripheren Blutes“)
RNA	Ribonucleic Acid („Ribonukleinsäure“)
rpm	Rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT-qPCR	Real Time Detection PCR („quantitative Echtzeit-PCR“)
Tab	Tabelle
Tbl	Tablette
UICC	Union internationale contre le cancer („Internationale Vereinigung gegen Krebs“)

# 1 Einleitung

Die immunologischen Vorgänge in und direkt um einen bösartigen Tumor im Menschen, insbesondere das sogenannte Tumor-Microenvironment, weckte in den letzten Jahren zunehmend das Interesse der medizinischen Forschung. Verschiedene Zellen der menschlichen Immunabwehr interagieren hier auf unterschiedlichste Weise mit den Zellen des Malignoms, sezernieren Zytokinen, Antikörpern sowie Liganden und Rezeptoren. Mittlerweile gibt es Hinweise, dass Tumorzellen gezielt die körpereigene Immunabwehr schwächen, indem sie immunmodulierende Faktoren sezernieren und so die Abwehrreaktion in unmittelbarer Umgebung eines Tumors inhibieren. Die Kenntnis dieser Faktoren ermöglicht die gezielte therapeutische Gabe von Inhibitoren oder Aktivatoren, welche die Immunevasion des Tumors verhindern könnten und so gegenüber der klassischen Chemotherapie eine nebenwirkungsärmere Behandlung von Tumorleiden ermöglichen würden.

Zwei Rezeptor-Liganden-Paare, PD-1/PD-L1 sowie CD137/CD137L, rückten in letzter Zeit aufgrund vielversprechender Ergebnisse in den wissenschaftlichen Vordergrund. Sie regulieren über intrazelluläre Signalwege die Aktivität von T-Zellen und sind somit direkt an der Immunreaktion beteiligt (Driessens et al. 2009). Ihr Vorkommen beim kolorektalen Karzinom sowie ihre Bedeutung für eine potentielle Therapie soll diese Arbeit weiter erörtern.

## 1.1 Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom (CRC) ist eine der häufigsten malignen Tumorerkrankungen in Deutschland. Mit einem prozentualen Anteil von 10,6% aller Krebssterbefälle spielt dieses Malignom eine bedeutende Rolle in der medizinischen Versorgung. Im Jahr 2014 verstarben ca. 24.500 Menschen in Deutschland am kolorektalen Karzinom (Statistisches Bundesamt 2014). Trotz eines Rückgangs der Zahl der Neuerkrankungen zeigen epidemiologische Hochrechnungen, dass die Fallzahlen durch die steigende Lebenserwartung bis 2020 um 16% (Frauen) bzw. um 24% (Männer) steigen werden (Nowossadeck et al. 2014).

Der Großteil aller kolorektalen Karzinome entsteht sporadisch bei Patienten nach dem 50. Lebensjahr im Rahmen einer Adenom/Dysplasie-Karzinom-Sequenz, bei der das Karzinom aus einer intraepithelialen Neoplasie in Form eines Adenoms hervorgeht. In 10% der Fälle liegt eine genetische Prädisposition vor, beispielsweise in Mutationen des Tumorsuppressorgens APC bei der familiären adenomatösen Polyposis oder DNA-Mismatch-Reparaturproteinen beim hereditären non-polypösen kolorektalen Karzinom (Lynch et al. 1993; Burt et al. 1995; Yurgelun et al. 2017). Als Risikofaktoren für das sporadische Karzinom gelten neben einer Ernährungsweise mit ballaststoffarmer, fett- und fleischreicher Kost, Adipositas und Alkoholkonsum auch Risikofaktoren bzw. -erkrankungen wie kolorektale Adenome und langjährige chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (Leitlinienprogramm Onkologie AWMF 2014).

Die konventionelle Therapie des CRC fußt auf chirurgischer Exzision, Chemo- und Radiotherapie. Trotz Therapie lag die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate im Jahr 2012 bei 63% (Robert Koch-Institut 2015). Hinzu kommt, dass das kolorektale Karzinom häufig insbesondere hepatisch metastasiert. Einer großen Metastudie zufolge stellt sich die Hälfte der Patienten bereits mit einer Metastase vor oder wird eine entwickeln. Nur 20-30% dieser Patienten können in kurativer Absicht operiert werden und tragen folgend ein Risiko von 60% für intra- oder extrahepatische Rezidive (Antoniou et al. 2007).

Aufgrund der Häufigkeit und Schwere der neoplastischen Erkrankung wird Nicht-Risikopersonen neben einer jährlichen digital-rektalen Untersuchung ab dem 55. Lebensjahr ein Koloskopie-Screening im Abstand von 10 Jahren angeboten, alternativ ein jährlicher fäkaler Okkultblut-Test („Screening“).

Nach Diagnosestellung eines kolorektalen Karzinoms erfolgen üblicherweise weitere Untersuchungen, die die Beurteilung der Tumorausdehnung und Operabilität ermöglichen sollen („Staging“). Dabei wird die Neoplasie anhand der TNM-Klassifikation, einem prognose-orientierten Klassifikationssystem der UICC, eingeteilt.

**Tab. 1: TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms (Wittekind 2010)**

TIS	Carcinoma in situ: Intraepithelial oder Infiltration der Lamina propria
T1	Tumor infiltriert die Submukosa
T2	Tumor infiltriert die Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa
T4	Tumor infiltriert in andere Organe oder Strukturen
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in 1 bis 3 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Aus den erhobenen Befund-Ergebnissen erfolgt eine Einteilung in UICC-Stadien, die aus statistischen Daten die Prognose der Erkrankung einzuschätzen versucht, woraus sich die weitere Therapie ergibt. Darüber hinaus erlaubt auch die histologische Beurteilung des Differenzierungsgrades nach dem WHO-System in gut (G1), mäßig (G2), schlecht (G3) differenziert oder entdifferenziert (G4) eine Beurteilung der Prognose („Grading“).

Dennoch hat sich gezeigt, dass der klinische Verlauf bei Patienten des gleichen histologischen Stadiums großen Schwankungen unterliegt; so können einige Patienten darunter lange Jahre im Zustand des *Stable Disease* überleben, während andere eine sehr schnelle Progression der Erkrankung erleiden. Dies könnte daran liegen, dass es nicht ausreichend ist, ausschließlich die Tumorzellen zu beurteilen, sondern auch Faktoren, die das Wachstum des Tumors begünstigen oder erschweren können, allen voran das Immunsystem. So wurde festgestellt, dass die Dichte und Position der Immunzellen im Tumorgebiet eines kolorektalen Karzinoms einen prognostischen Wert besitzen, der die Aussagekraft der TNM-Klassifikation übertreffen kann (Galon et al. 2006; Mlecnik et al. 2011a, 2011b). Eine Untersuchung der Gewebeproben von 602 Patienten mit kolorektalem Karzinom im UICC-Stadium 1 und 2 konnte eine hohe Dichte von CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen und CD45RO<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen mit verbesserter Prognose korrelieren (Pagès et al. 2009).

Ebenso konnte gezeigt werden, dass in höheren T-Stadien des Tumors die T-Zell-Dichte drastisch abnimmt (Mlecik et al. 2011b). Dies lässt vermuten, dass eine stärkere Immuninfiltration des Tumors vor Progression schützt.

Aus diesen Erkenntnissen ist es schlüssig, auch für die Therapie prognoserelevante Immunfaktoren zu identifizieren und Wege zu finden, sie therapeutisch zu modifizieren. Neue Ansätze wie die aktive Immunisierung mit dendritischen Zellen oder die Gabe von immunstimulatorischen Antikörpern zeigten sich in vorklinischen Studien als sehr vielversprechend und gut kombinierbar mit einer konventionellen Chemotherapie (Mazzolini et al. 2007). Für bestimmte Neoplasien wie zum Beispiel dem malignen Melanom, für das umfangreichere immunonkologische Daten vorliegen, sind bereits immunmodulierende Therapien von der Europäischen Arzneimittel-Agentur zugelassen. Darunter zählen die PD-1-Immun-Checkpoint-Inhibitoren Nivolumab (Opdivo®) und Pembrolizumab (Keytruda®; European Medicines Agency 2015a, 2015b). Zur Therapie des kolorektalen Karzinoms werden verschiedenste Ansätze derzeit verfolgt.

## **1.2 Immunologischer Hintergrund der Tumorabwehr**

Ein besonderer Forschungsschwerpunkt in den letzten Jahren war die Frage, wie das Immunsystem auf den wachsenden Tumor reagiert. Histopathologische Schnitte von CRC-Lungenmetastasen zeigen, dass eine große Zahl an dendritischen Zellen, Makrophagen und CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-positiven T-Zellen in das Tumorgebiet einwandern und der Tumor somit vom Immunsystem als körperfremd erkannt wird. Dennoch war die Immunreaktion insofern inadäquat, da die T-Zellen nur eine geringe IFN- $\gamma$ -Produktion zeigten und keinerlei zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Reaktion nachweisbar war (Jarnicki et al. 2006). Die Immunreaktion im Umfeld des Tumors war also trotz Erkennung der Antigenität schwächer als erwartet, was mit einer Immunevasion des Tumors erklärbar wäre. Diese Tumormimmunevasion findet meist an den immunologischen Synapsen statt, die auch als supramolekulare Adhäsionskomplexe (SMAC) bezeichnet werden. Hierbei bindet eine antigenpräsentierende Zelle an eine T-Zelle und moduliert deren Verhalten.

Eine naive T-Zelle benötigt für ihre Aktivierung mindestens zwei Signale: Neben der Aktivierung von T-Zell-Rezeptoren, welche das Tumorantigen hochspezifisch erkennen, wenn es ihnen an MHC-I-Molekülen auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen präsentiert wird, braucht es kostimulatorische Moleküle wie CD28, das konstitutiv auf der Oberfläche der meisten T-Zellen exprimiert wird. Erst wenn dieses Molekül durch CD80 und CD86 (B7-1 und B7-2) auf professionellen APCs gebunden wird, kommt es zur Aktivierung der T-Zelle. Dadurch werden Checkpoint-Moleküle der immunologischen Signalwege stimuliert, welche entweder ihrerseits zu einer vermehrten T-Zell-Aktivierung, zur IL-2-Sekretion, Proliferation und klonalen Expansion führen (z.B. CD137, OX40), oder die klonale Vermehrung inhibieren (z.B. PD-1, CTLA-4). Diese Möglichkeit der Einflussnahme auf die T-Zell-Aktivierung reguliert überschießende Immunreaktionen, die zu Autoimmunerkrankungen führen können und beispielsweise bei CTLA-4-defizienten Menschen gehäuft vorkommen (Schubert et al. 2014). CTLA-4 ähnelt CD28 und bindet ebenso CD80 und CD86, allerdings mit deutlich höherer Affinität und inhibitorischer Wirkung, und reduziert somit kompetitiv die T-Zell-Aktivierung (van der Merwe et al. 1997).

Tumorzellen stehen unter dem Verdacht, durch die verstärkte Expression immuninhibierender Faktoren bzw. die verminderte Expression immunstimulierender Faktoren innerhalb des Tumor-Microenviroments die körpereigene Abwehrreaktion außer Kraft zu setzen.

### **1.3 PD-1**

PD-1 ist ein negativ kostimulatorischer Checkpoint-Rezeptor, der wie CD28 zur B7/CD28-Superfamilie gehört. Er reguliert die T-Zell-Antwort zu zwei Zeitpunkten: Zuerst beim Kontakt der antigenpräsentierenden Zelle mit der naiven T-Zelle, um die T-Zell-Rezeptor-Transduktion abzubremsen. Hierfür spricht, dass die T-Zell-Aktivierung die PD-1-Expression erhöht, genauso wie eine PD-L1/PD-1-Interaktion den T-Zell-Rezeptor herabreguliert. Zweitens reguliert der Signalweg den Angriff der zytotoxischen T-Zelle, um den Schaden auf das

umgebende Gewebe zu begrenzen (Hebeisen 2013). Auf diese beiden Weisen induziert der Signalweg Immuntoleranz bei aktivierten T-Zellen.

PD-1 wird unter anderem auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen, B-Zellen, NKT-Zellen und dendritischen Zellen, allerdings nicht auf ruhenden T-Zellen exprimiert (Agata et al. 1996). Darüber hinaus wurde die Expression auf Zellen des Gehirns, des Herzens, der Niere und der Leber beschrieben (Ling et al. 2000). Wenn die entsprechenden Liganden PD-L1 (auch B7-H1 und CD274 genannt) und PD-L2 (auch B7-DC und CD273) an den Rezeptor binden, wird die T-Zell-Funktion inhibiert. PD-L1 ist gleichzeitig ein Ligand von CD80. Im Unterschied zu PD-L2 wird PD-L1 konstitutiv exprimiert und kann durch Entzündungsmediatoren wie IFN- $\alpha$ , - $\beta$  und - $\gamma$  weiter hochreguliert werden (Keir et al. 2007). Man konnte den Liganden auf antigenpräsentierenden Zellen, aber auch auf nicht-lymphoiden Gewebe wie Herz oder Lunge nachweisen. Er fand sich außerdem auf Tumorzellen verschiedener Neoplasien wie Glioblastom, Pankreas-, Ovarial-, Mamma-, Nierenzell- und Ösophagealtumoren und nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (Droeser et al. 2013). Dabei variiert der Anteil von PD-1-positiven Immunzellen im Tumormilieu von 0% beim Chondrosarkom zu 93% bei Ovarialtumoren. Ebenso erhöht sich die PD-1- und PD-L1-Expression auf Tumorzellen bei abnehmender Differenzierung wie beim triple-negativen oder TP-53-mutierten Mammakarzinom und Kolonkarzinomen mit hoher Mikrosatelliteninstabilität (Gatalica et al. 2014).

Gesunde Darmzellen exprimieren PD-L1 nur in geringer Menge, die Expression ist vermutlich essentiell zur Abwehr autoimmuner Reaktionen auf das Gewebe. In Tumorzellen kolorektaler Karzinome ist der PD-L1-Anteil deutlich erhöht (Hua et al. 2012; Inaguma et al. 2017). So zeigte sich der Ligand in über 30% der CRC deutlich erhöht, unerwarteterweise eher in frühen Tumorstadien, ohne Lymphknotenmetastasen, keiner Gefäßinvasion und erhöhtem 5-Jahres-Überleben. Diese CRC-Zellen waren außerdem verstärkt von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen umgeben, welche jedoch den PD-1-Korezeptor nicht exprimierten (Droeser et al. 2013; Hua 2012). In einer anderen Arbeit konnte durch die immunhistologische Untersuchung von 454 primären kolorektalen Karzinomen nachgewiesen werden, dass PD-L1-positive Tumorzellen signifikant verknüpft

waren mit schlechterer Differenzierung und Mikrosatelliteninstabilität (Inaguma et al. 2017). Eine Metaanalyse assoziierte PD-L1 mit verringertem Gesamtüberleben bei soliden Tumoren (Wu et al. 2015). Bei Patienten mit NSCLC sprach eine höhere Expression von PD-L1 bei widersprüchlicher Datenlage für eine schlechtere Differenzierung und reduziertes Gesamtüberleben in bestimmten Populationen (Wang et al. 2015; Yang et al. 2017). Schlechtere Prognose bei PD-L1-Expression fand sich ebenfalls für renale Karzinome (Thompson et al. 2006), Brustkrebs (Ghebeh et al. 2006), Magen- (Wu et al. 2006) und Ösophagus-Karzinom (Ohigashi et al. 2005).

Es konnte gezeigt werden, dass humanes PD-L1-Ig-Fusionsprotein die anti-CD3-vermittelte Aktivierung von aufgereinigten T-Zellen dosisabhängig inhibieren kann (Freeman et al. 2000b). Eine andere Arbeitsgruppe wies nach, dass PD-1/PD-L1-Interaktion die zytolytische Aktivität von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen herabsetzen kann (Hirano et al. 2005). PD-1-positive Makrophagen im Mikromilieu eines Kolonkarzinoms bei Mäusen hatten eine reduzierte Phagozytose-Aktivität im Vergleich zu PD-1-negativen Makrophagen. Eine verringerte Expression von PD-L1 resultierte ebenso in vermehrter Phagozytose der Tumorzellen und reduzierter Tumorgröße. Die Unterbrechung des kostimulatorischen PD-1/PD-L1-Signalwegs mittels PD-1- oder PD-L1-Antikörpern reproduzierte diesen Effekt im Tiermodell (Gordon et al. 2017).

Strittig ist derzeit, ob es sich bei der verstärkten Expression von PD-L1 auf Tumorzellen um eine onkogen-induzierte konstitutive Erhöhung handelt. Eine neuere These lautet, dass die Hochregulation eine Adaption der Tumorzelle auf die endogene Entzündungsreaktion gegen Tumorantigene sein könnte, indem der physiologische gewebeprotective Mechanismus des Signalwegs genutzt wird, um die Anti-Tumor-Reaktion abzubremsen (Topalian et al. 2012).

Sicher ist, dass die PD-L1-Expression des Tumors ein Marker für ein immunaktives Mikromilieu ist und mit der Wirksamkeit von anti-PD-1-Therapie korreliert. Andere *Microenvironment*-assoziierte Faktoren wie PD-L2, PD-1-Expression tumorinfiltrierender Lymphozyten und die Anzahl der T- und B-Zell-Infiltraten sind mit der PD-L1-Expression des Tumors oder tumorinfiltrierender Immunzellen assoziiert, allerdings nicht direkt mit dem Ansprechen auf die

Therapie (Taube et al. 2014). PD-L1-positive Tumore sprachen auch auf konventionelle Chemotherapie besser an (Carbognin et al. 2015). Erste Studienergebnisse zur Wirksamkeit des PD-1-Antikörpers Nivolumab sprechen dafür, dass die Ansprechrate auf die Therapie nicht von dem Anteil PD-L1-positiver Zellen abhängig ist. Stattdessen korreliert die Dauer des progressionsfreien Überlebens mit einer hohen Mutations-Rate des Tumors. Hierbei war die Ansprechrate mit 47% fast doppelt so hoch wie nach einer Platin-basierten Chemotherapie mit 28% (Carbone et al. 2017).

#### **1.4 CD137**

Bei CD137 (4-1BB, TNFR-Superfamilie) handelt es sich um einen kostimulatorischen Rezeptor aus der Tumornekrosefaktor-Familie. Die Bindung des Rezeptors auf T-Zellen durch seinen Liganden CD137L steigert die Proliferation und zytolytische Aktivität, was über IFN- $\gamma$  und zytolytische Proteine zu einer verstärkten Aktivität des Immunsystems und der Tumorabwehr führt (Sun et al. 2004). Darüber hinaus verlängert CD137 das Überleben von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Aktivierung der antiapoptotischen Gene bcl-x<sub>L</sub> und bfl-1 über den NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktor (Lee et al. 2002). Neben der pro-inflammatorischen Wirkung führt die Aktivierung von CD137 zur Produktion von anti-inflammatorischem IL-13 in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Shin et al. 2007). Diese Kombination aus verstärkter T-Zell-Antwort bei gleichzeitiger Limitierung autoimmuner Reaktion macht CD137 zu einem interessanten Ziel immunonkologischer Forschung.

Die Expression von CD137-messenger-RNA konnte in allen aktivierten hämatopoetischen Zellen nachgewiesen werden, CD137-Protein hauptsächlich auf aktivierten T-Zellen insbesondere vom CD8<sup>+</sup>-Typ (Schwarz et al. 1995). Tumor-infiltrierende und -assoziierte Lymphozyten hatten eine höhere CD137-Expression als zirkulierende T-Zellen (Ye et al. 2014).

Auch Endothel- und Epithelzellen exprimieren bei Inflammation CD137 und CD137L: Immunhistochemisch zeigte sich in malignen Tumoren die höchste Konzentration, in benignen Tumoren und entzündetem Gewebe eine deutlich niedrigere und in gesundem Gewebe gelang kein Nachweis. Dabei fand sich

CD137L lokalisiert auf Tumorzellen, CD137 auf Endothel- und Gefäßmuskelzellen innerhalb des Tumors. So wurde die Hypothese aufgestellt, dass CD137 zur Monozytenaktivierung und deren Extravasation in das Tumorgewebe führt (Broll et al. 2001). Eine andere Forschungsgruppe vermutete, die Interaktion des Rezeptors mit CD137L auf Tumorgewebe begünstige über stimulierte IL-8-Produktion die weitere Progression des Tumors (Wang et al. 2008). Dies konnte widerlegt werden mit der Untersuchung, dass CD137L in NSCLC, gebunden durch CD137-Fc, über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die Proliferation inhibiert und Apoptose induziert (Qian et al. 2015).

Interessanterweise konnte sowohl beim Rektumkarzinom als auch beim Kolonkarzinom eine gegenüber dem Normalgewebe reduzierte Expression von CD137L und beim rektalen Karzinom eine signifikant höhere CD137-Expression im Vergleich zu gesundem Gewebe nachgewiesen werden, während die Ergebnisse beim Kolonkarzinom statistisch nicht signifikant waren (Dimberg et al. 2006). CRC-Zellreihen, welche nicht in Konfrontation mit Immunzellen standen, wiesen erhöhte CD137L-Spiegel auf (Salih et al. 2000).

Beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom sprach eine hohe CD137L-Expression für gut differenzierte Tumore in frühen Stadien und für ein längeres Gesamtüberleben. Bei Tumoren des UICC-Stadiums III/IV war die CD137L-Expression mit einem höheren Gesamtüberleben assoziiert (Qian et al. 2015).

Eine Aktivierung des CD137-Signalwegs stimuliert zytotoxische T-Zellen, welche Tumorgewebe infiltrieren und lysieren können (Curran et al. 2013). Die Gabe von immobilisiertem CD137-Protein und agonistischen CD137-Antikörpern führte im Mausmodell zur Tumorremission und nach primärer Resektion zur Expansion Tumorantigen-spezifischer T-Gedächtniszellen (Schwarz et al. 1996; Narazaki et al. 2010). Bei Patienten mit triple-negativem Brustkrebs, d.h. ohne Nachweis von Östrogen-, Progesteron- oder HER2-Rezeptoren auf der Tumorzelloberfläche, folgte der Injektion von anti-CD137 eine Zunahme der CD8<sup>+</sup>-Zellen und der zytotoxischen Wirkung (Harao et al. 2017). Eine Kombinationstherapie mit IL12 bei metastasiertem MCA26-Kolonkarzinom heilte bei Mäusen Leber- und Lungenmetastasen und verlängerte das Überleben (Martinet 2000; Chen 2000).

## 2 Fragestellungen der Arbeit

Die Expression der Checkpoint-Immun-Modulatoren PD-1/PD-L1 und CD137/CD137L konnte für einige Malignome nachgewiesen werden. Die Therapie von soliden Tumoren mit hoher Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) und weiterem Progress nach Erstlinientherapie durch den PD-1-Antikörper Pembrolizumab (Keytruda®, Merck & Co.) wurde im Mai 2017 von der amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde FDA im beschleunigten Verfahren genehmigt. Begründung war die hohe Ansprechrate in den KEYNOTE-Studien. Auch der PD-L1-Antikörper Avelumab (Bavencio®, Merck KgaA) erhielt im Frühjahr 2017 die beschleunigte Zulassung zur Erstlinientherapie des metastasierten Merkelzell- und Urothel-Karzinoms nach deutlichen Erfolgen in der JAVELIN-Solid-Tumor-Studie (Heery et al. 2017; Kaufman et al. 2016). CD137-Antikörper wie Urelumab (Bristol-Myers Squibb) und Utomilumab (Pfizer) befinden sich in klinischen Studien.

Weiterhin ist jedoch für das kolorektale Karzinom die Expression, die prognostische Aussage und die therapeutische Nutzbarkeit der kostimulatorischen Signalwege wenig erforscht und teils widersprüchlich. Ziel dieser Arbeit war es, die Expression dieser Proteine und ihrer Gene im Kolonkarzinom zu untersuchen. Zur angesprochenen Bedeutung der Expression und möglichen therapeutischen Nutzbarkeit der beiden Signalwege wurden folgende Fragen in dieser Arbeit weitergehend bearbeitet:

1. Werden die für das Zustandekommen einer Immunantwort beschriebenen kostimulatorischen Signale PD-1 und CD137 bzw. deren Liganden PD-L1 und CD137L von Zellen humaner Kolonkarzinome exprimiert? Welche Gemeinsamkeiten oder Unterschiede werden dazu beobachtet?
2. Zeigen sich Unterschiede in der Expression im Laufe des Tumorzellwachstums in vitro?

3. Wie wirkt sich eine Reduktion des Nährstoffangebots im Kulturmedium auf die Expression in vitro aus?
4. Welches Expressionsverhalten zeigt sich für die kostimulatorischen Signale und deren Liganden bei einem Tumorwachstum in vivo und unterscheidet sich dieses gegenüber dem Wachstum in vitro?
5. Welche Erkenntnisse leiten sich aus den in vivo und in vitro gewonnenen Ergebnissen für die kostimulatorischen Signalwege PD-1 und CD137 und deren Liganden für die Klinik ab?

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Zellkulturen

In den Versuchen wurde die Genexpression kostimulatorischer Signalwege in den Kolonkarzinomen SW480, SW620 und HT-29 untersucht. Zur Normalisierung der RT-qPCR-Ergebnisse wurden FHC-Zellen aus epithelalem Kolongewebe verwendet. Die Zellen wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) aus Rockville, MD bezogen. Die Anzucht erfolgte wie in 3.2.1 beschrieben.

Bei der Zelllinie SW480 handelt es sich um Zellen eines kolorektalen Adenokarzinoms eines 50-jährigen Kaukasiers, die Zelllinie SW620 wurde aus einer Lymphknotenmetastase dieses Primärtumors isoliert. HT-29-Zellen entstammen dem kolorektalen Adenokarzinom einer 44-jährigen Kaukasierin.

#### 3.1.2 Sonden und Antikörper

##### 3.1.2.1 Verwendete Sonden für die TaqMan-RT-qPCR

Tab. 2: Verwendete Sonden für die TaqMan-RT-qPCR

Target	Gene Expression Assay	Assay ID	Hersteller
CD137 / TNFRSF9	TNFRSF9 TaqMan Gene Expression Assay	Hs00155512_m1	Life Technologies (Carlsbad, CA)
CD137L / TNFSF9	TNFSF9 TaqMan Gene Expression Assay	Hs00169409_m1	Life Technologies (Carlsbad, CA)
CD274 / PD-L1	CD274 TaqMan Gene Expression Assay	Hs01125301_m1	Life Technologies (Carlsbad, CA)
CD279 / PD-1	PDCD1 TaqMan Gene Expression Assay	Hs01550088_m1	Life Technologies (Carlsbad, CA)
B2M	B2M TaqMan Gene Expression Assay	Hs00984230_m1	Life Technologies (Carlsbad, CA)
TBP	TBP TaqMan Gene Expression Assay	Hs00427620_m1	Life Technologies (Carlsbad, CA)

### 3.1.2.2 Verwendete Antikörper für die Western-Blot-Analyse

Tab. 3: Verwendete Antikörper für die Western-Blot-Analyse

Target	Antikörper	Hersteller	Konz.
CD137	NBP1-68012	Novus Biologicals (Littleton, CO)	1:500
CD137L	ab57932	abcam (Cambridge, MA)	1:200
CD274	NBP1-76769	Novus Biologicals (Littleton, CO)	1:200
CD279	PA5-20351	ThermoFisher Scientific (Waltham, MA)	1:1.000
$\beta$ -Actin	$\beta$ -Actin (13E5) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology (Danvers, MA)	1:1.000
Sekundärantikörper Anti-Rabbit	goat anti-rabbit IgG-HRP sc-2030	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX)	1:2.000
Sekundärantikörper Anti-Mouse	goat anti-mouse IgG-HRP sc-2005	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX)	1:2.000

### 3.1.2.3 Verwendete Antikörper für die FACS-Analyse

Tab. 4: Verwendete Antikörper für die FACS-Analyse

Target	Antikörper	Hersteller
CD137	CD137-PE 130-093-475	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany)
CD137L	CD137L-PE 130-103-720	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany)
CD274	BD 561787	BD Pharmingen (Franklin Lakes, NJ)
CD279	CD279-PE 130-102-299	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany)
Isotypkontrolle IgG1	Anti-IgG1-PE, human, 130-093-188	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany)
Isotypkontrolle IgG2b	Mouse IgG2b-PE, 130-092-215	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany)

### 3.1.3 Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen

Tab. 5: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen

<b>RIPA Puffer:</b>	20 mM Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1% (v/v) IGEPAL CA-630 1% (m/v) NaDOC 1% (m/v) SDS 5 mM (m/v) NaF 1 Tbl. protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) per 100 ml Kurz vor Gebrauch hinzugeben: 1 mM DTT, 1 mM PMSF
<b>0,05% TBS-Tween (TBS-T):</b>	500 mM Tris-HCl 1,5 M NaCl 0,05% (v/v) Tween 20 pH 7,4
<b>Blockierungslösung:</b>	5% (m/v) non-fat dried milk powder in TBS-T - oder - 5% (m/v) BSA in TBS-T
<b>10x TBE Puffer:</b>	1 M Tris 100 mM EDTA 0,83 M Borsäure pH 8,3
<b>Promega Mastermix:</b>	1,0 µl Random Primer 4,0 µl 5x Puffer 1,2 µl MgCl <sub>2</sub> 0,2 µl RNAsin 1,0 µl R-Transkriptase 1,0 µl dNTPs
<b>TaqMan PCR Mastermix:</b>	10 µl TaqMan Gene Expression Mix (2x) 1 µl TaqMan Gene Expression Assay (20x) 7 µl dH <sub>2</sub> O
<b>MACS-Puffer:</b>	MACS BSA Stock Solution in autoMACS Rinsing Solution 1:20

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

#### 3.2.1.1 Kultivierung der Zelllinien HT-29, SW480 und SW620

Tab. 6: Inkubationsmedien

<b>Inkubationsmedium für HT-29-Zellen:</b>	1% Penicillin-Streptomycin-Lösung 10% fetales Kälberserum in McCoy-Medium
<b>Inkubationsmedium für SW480-Zellen und SW620-Zellen:</b>	1% Penicillin-Streptomycin-Lösung 10% fetales Kälberserum in L-15 Medium
<b>Inkubationsmedium für FHC-Zellen:</b>	10 ng/ml Cholera-Toxin 0,005 mg/ml Insulin 0,005 mg/ml Transferrin 100 ng/ml Hydrokortison 10 mM HEPES (Gesamtkonzentration 25 mM) 10% fetales Kälberserum in DMEM/F-12-Medium

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter aseptischen Bedingungen in einer Sterilwerkbank durchgeführt. Verwendete Medien und Lösungen wurden vor Verwendung auf 37°C vorgewärmt.

#### 3.2.1.2 Auftauen der gefrorenen Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden entnommen und für kurze Zeit (< 60 Sekunden) in einem 37°C warmen Wasserbad erwärmt. Direkt danach wurden sie vorsichtig mit 50 ml Nährmedium verdünnt und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand abgegossen, das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert und auf 50 ml mit Medium aufgefüllt. Nach erneutem Zentrifugieren für 10 Minuten bei 300 x g wurde der Überstand abgegossen, das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert und vollständig in eine mit 15 ml Medium befüllte 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche gegeben.

### **3.2.1.3 Kultur und Splitten adhärenter Zellen**

Zellen der Zelllinie HT-29 wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und verschlossener Zellkulturflasche in McCoy-Medium mit 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung und 10% fetalem Kälberserum (FKS) kultiviert. Die Zelllinien SW480 und SW620 wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und einer Zellkulturflasche mit filterlosem Deckel in L-15-Medium mit 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung und 10% FKS kultiviert.

Zum Splitten adhärenter Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml dPBS gewaschen und anschließend nach Zugabe von 5 ml Trypsin-EDTA bei 37°C 5 Minuten inkubiert. Durch Zugabe von 10 ml frischem Medium wurde die Wirkung von Trypsin abgestoppt. Die Zellsuspension wurde nun in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 10 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet in 1 ml Nährmedium resuspendiert und auf 10 ml aufgefüllt. Nach Trypanblau-Färbung (siehe 3.2.1.4) wurden 4x10<sup>6</sup> bzw. bei FKS-freien Hungermedien 5x10<sup>6</sup> Zellen ausgesät.

### **3.2.1.4 Automatische Zellzählung nach Trypanblau-Färbung**

Zum Ermitteln der Zahl lebender Zellen wurde die Zelllösung 1:1 mit Trypanblau gemischt und 20 µl der Lösung in eine Cellometer SD100 Zählkammer überführt. Die Messung erfolgte mit einem Cellometer Auto T4 Plus, einem mikroskopbasierten, automatischen Zellzähler mit CCD-Kamera. Trypanblau kann durch die perforierten Zellmembranen in tote Zellen eindringen und sie färben, während lebendige Zellen kaum angefärbt werden.

### **3.2.1.5 Vorbereiten der adhärenter Zellen zur Probenaufbereitung**

Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte 3 (d1), 5 (d3) und 7 Tage (d5) nach Aussaat. Zellen unter Mangelbedingungen wurden 48 Stunden nach Aussaat in einem FKS-freien Medium kultiviert und 72h, 96h und 120h danach aufgearbeitet.

Vorbereitend wurde das Medium abgesaugt, die adhärenter Zellen mit 10 ml dPBS gewaschen und nach Hinzugeben von 4 ml Accutase 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die nun vom Boden der Kulturflasche gelösten Zellen wurden mit 11 ml dPBS verdünnt und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben, das mit weiteren 35 ml dPBS aufgefüllt und 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert wurde.

Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml dPBS resuspendiert. Nach Verdünnung mit 9ml dPBS wurden die Zellen nach Trypanblau-Färbung gezählt (siehe 3.2.1.4).

### **3.2.1.6 cDNA-Synthese**

Der auf  $5 \times 10^6$  Zellen angesetzte Zellansatz wurde in 350  $\mu$ l Buffer RLT resuspendiert und die RNA gemäß Herstellerprotokoll mittels Qiagen QIAcube isoliert. Anschließend wurde die Konzentration der aufbereiteten RNA in einem Nanodrop 2000c gemessen. Hiervon wurden 1000 ng RNA in Wasser auf ein Volumen von 11,6  $\mu$ l verdünnt und mit 8,4  $\mu$ l Promega Mastermix (angesetzt gemäß Herstellerprotokoll) zu insgesamt 20  $\mu$ l vermengt. Die cDNA-Synthese erfolgte in einem Mastercycler Gradient für 5 Minuten bei 25°C, 59 Minuten bei 40°C und 15 Minuten bei 70°C. Die synthetisierte cDNA wurde erneut mit einem Nanodrop 2000c vermessen und auf eine Konzentration von 50 ng/ $\mu$ l verdünnt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

### **3.2.1.7 Real Time Quantitative PCR (RT-qPCR)**

Der TaqMan PCR Mastermix wurde in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gemäß Herstellerprotokoll vorbereitet und unter Lichtschutz auf Eis aufbewahrt. Jeweils 2  $\mu$ l der verdünnten cDNA (entsprechend 100 ng) wurden in eine 96-Well PCR-Platte pipettiert und 18  $\mu$ l des Mastermix hinzugegeben. Die RT-qPCR erfolgte nach initialen 10 Minuten bei 95°C in 40 Zyklen á 15 Sekunden bei 95°C und 60 Sekunden bei 60°C mit anschließender Messung. Das verwendete Gerät war ein Biorad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System.

Zur Auswertung wurde der Ct-Wert (*Cycle Threshold*) verwendet, der den Teil der exponentiellen Wachstumskurve beschreibt, in dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über den Hintergrundwert ansteigt. Die relative Quantifizierung der Ct-Werte erfolgte mit den Housekeeping-Genen  $\beta$ 2-Mikroglobulin (B2M) und TATA-bindendem Protein (TBP). Hierzu wurde entsprechend der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode der Ct-Wert des Housekeepers vom Zielgen subtrahiert und anschließend der  $\Delta$ Ct-Wert von FHC-Zellkulturen abgezogen. Das Ergebnis wurde als n-fache Expression  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  präsentiert.

### **3.2.1.8 Western Blot**

#### *3.2.1.8.1 Vorbereitung der Proben*

Die restlichen aufgearbeiteten Zellen wurden je nach Größe des Pellets in 400-1000 ml RIPA-Puffer resuspendiert, 10 Minuten auf Eis gelegt und der Überstand nach Zentrifugierung bis zur Western-Blot-Analyse in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen bei -80°C gelagert.

#### *3.2.1.8.2 SDS-Page*

Die Bestimmung der Proteinkonzentration des Lysates erfolgte durch photometrischen Bradford-Test im BioPhotometer. Danach wurden 50 µg Proteinprobe gemäß Herstellerprotokoll mit Hilfe von NuPAGE reducing agent und NuPAGE SDS-Puffer 10 Minuten bei 70°C denaturiert. Der SDS-Page erfolgte im Kühlraum bei 4°C in jeweils 2 NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gelen pro Kammer bei 200 V und 125 mA während einer Dauer von ca. 80 Minuten.

#### *3.2.1.8.3 Western Blot*

Der Transfer von NuPage-Gel auf Nitrocellulose-Membran erfolgte mit dem iBlot Dry Blotting System gemäß Herstellerprotokoll. Die Membranen wurden anschließend zwei Mal in 0,1% TBS/T-Lösung gewaschen und eine Stunde in 5% Magermilchlösung geblockt. Entsprechend der Konzentrationsangaben in Tabelle 5 wurde der Primärantikörper in 8 ml 5% Magermilchlösung gegeben und über Nacht bei 4°C im Kühlraum inkubiert. Am kommenden Morgen wurden die Membranen drei Mal mit 0,1% TBS/T-Lösung für je 10 Minuten gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper in 8 ml 5% Magermilchlösung 1 Stunde inkubiert. Nach weiteren drei Waschvorgängen wurden die Membranen 5 Minuten unter Lichtschutz in SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, bestehend aus 4 ml Luminol und 4 ml Peroxide Solution, gelegt und anschließend in der Dunkelkammer belichtet und entwickelt. Analog erfolgte daraufhin nach 2 Waschvorgängen die Detektion von  $\beta$ -Aktin nach Hinzugabe des Antikörpers in 5% BSA-Lösung und Inkubation über Nacht. Sämtliche Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten auf einem Schüttler bei ca. 60 rpm.

### **3.2.1.9 Durchflusszytometrie**

Die Bestimmung des prozentualen Anteils Target-positiver Zellen der Zellkulturen SW480, SW620 und HT-29 erfolgte analog zu den Messzeitpunkten der RNA-Analyse per Durchflusszytometrie (FACS).

Zur Messung wurden jeweils  $1 \times 10^6$  gewaschene und in MACS-Puffer gelöste Zellen nach Zugabe des PE-konjugierten Primärantikörpers bzw. der Isotypkontrolle für 20 Minuten unter Lichtschutz bei 4°C inkubiert. Die Messung erfolgte gemäß Herstellerprotokoll in einem Coulter EPICS XLFlow Cytometer.

### **3.2.2 Aufarbeitung der murinen Gewebeproben**

Die verwendeten Proben entstammen aus subkutanen Balb/c-Nacktmaus-Xenotransplantaten. Die Mäuse wurden gemäß der vom Institut vorgegebenen und genehmigten Bedingungen gehalten.

Jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen wurden subkutan in die Flanken der Maus injiziert und nach durchschnittlich 20 Tagen wurden die Mäuse geopfert. Die Tumorgewebeproben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und asserviert.

Zum Aufarbeiten wurden die Gewebestücke je nach Größe mit 400 µl oder 800 µl Buffer RLT vermengt und mittels Kugelmühle zerkleinert. Nach Zentrifugierung für 10 Minuten bei 300 x g wurde der Überstand in 2 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und die RNA mittels QIAcube gemäß Herstellerprotokoll isoliert.

### **3.2.3 Aufarbeiten der humanen Gewebeproben**

Die verwendeten humanen Gewebeproben stammen von Patienten mit histologisch gesichertem Kolonkarzinom, die sich im Zeitraum zwischen Januar 2001 und Juni 2004 in der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie einer kurativen chirurgischen Resektion unterzogen. Die Klassifikation des Tumors erfolgte histologisch nach UICC-TNM-Stadien. Von den 14 aufbereiteten Proben wurden 6 Proben den UICC-Stadien I und II zugeordnet, 8 Gewebeproben entsprachen Stadium III und IV. Alle Gewebespender stimmten vor Operation schriftlich in die Probengewinnung und wissenschaftliche

Verwendung ein. Patienten mit R1-Resektion oder neoadjuvanter Therapie wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Die Gewebeproben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefrostet, asserviert und zur Analyse analog zu den murinen Gewebeproben aufgearbeitet (siehe 3.2.2).

#### **3.2.4 Statistische Analyse**

Die statistische Datenanalyse erfolgte mittels Microsoft Excel und IBM SPSS Statistics. Um in der RT-qPCR die Signifikanz der Unterschiede in der relativen Genexpression zweier unabhängiger Messgruppen zu bestimmen, wurde der Welch's T-Test verwendet. Der p-Wert einer einzelnen Stichprobe wurde mittels T-Test in SPSS errechnet. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant betrachtet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Einfluss der Wachstumsbedingungen auf die Expression der kostimulatorischen Signalwege im Kolonkarzinom

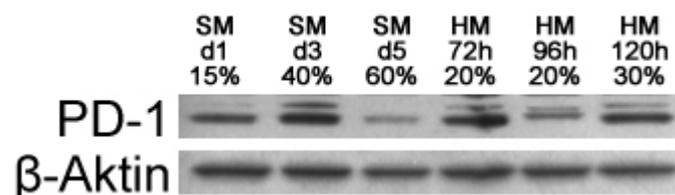
#### 4.1.1 PD-1-Expression in SW480, SW620 und HT-29 Kolonkarzinomzellen

##### 4.1.1.1 SW480 Kolonkarzinom

SW480 Kolonkarzinome zeigten fluoreszenzzytometrisch bereits am ersten Messtag in Standardmedium mit 28,7% einen hohen Anteil PD-1-positiver Zellen, der sich mit zunehmender Konfluenz bis Tag 5 auf 41% noch weiter erhöhte. Unter Nährstoffentzug fiel dieser Wert schon nach 72h auf 12,5% und bei anhaltendem Hungerstress auf 5,6% nach 120h ab (Abb. 4A).

Analog stieg die relative Genexpression unter Standardbedingungen bei zunehmendem Wachstum auf das bis zu 1,5fache ( $p < 0,05$  bezogen auf die Differenz zwischen Tag 1 und Tag 3). Bei Nährstoffentzug reduzierte sie sich auf das 0,2-0,5fache des Ausgangswertes an Tag 1 (Abb. 5A,  $p < 0,04$ ).

Mittels Western-Blot waren die Veränderungen nicht in dieser Deutlichkeit nachzuvollziehen. Zwar stieg der Proteingehalt der Probe bis Tag 3 bei Standardbedingungen stark, nahm bis Tag 5 daraufhin allerdings deutlich ab. Unter Mangelbedingungen fand sich nach 72h eine kräftige Expression, die nach 96h wieder abgenommen hatte (Abb. 1).



**Abb. 1: Repräsentativer Western-Blot der PD-1-Proteinexpression in SW480 Kolonkarzinomzellen.**

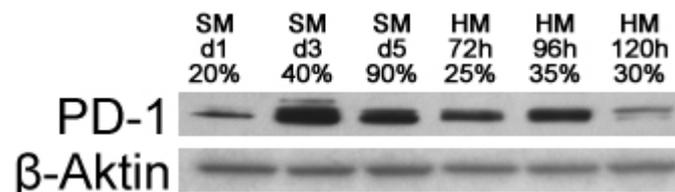
Die PD-1-Expression stieg bei Wachstum in Standardmedium (SM) bis Tag 3 an und fiel danach bei weiter steigender Konfluenz deutlich ab. Unter Nährstoffentzug (HM) kam es nach 96h zunächst zu einem Abfall des Gesamtproteins, nach 120h erreichte es erneut den Ausgangswert.

#### 4.1.1.2 SW620 Kolonkarzinom

Der Nachweis von PD-1<sup>+</sup>-Zellen bei SW620 Kolonkarzinomzellen gelang an den Messtagen 1 und 3 fluoreszenzzytometrisch nicht (Abb. 4B). An Tag 5 fanden sich ca. 4% PD-1<sup>+</sup>-Zellen in der Probe. Unter Mangelbedingungen waren nach 72h Nährstoffentzug noch 3,1% PD-1<sup>+</sup>-Zellen zu detektieren, deren Anteil nach 96h auf 2,3% abfiel und nach insgesamt 120h unterhalb der Nachweisgrenze lag.

Die relative Genexpression steigerte sich unter Standardbedingungen bis Tag 5 auf das 4,1fache des Ausgangswertes (Abb. 5B,  $p < 0,006$ ). In nährstoffreduziertem Medium lag dieser Wert nach 72 und 96 Stunden beim 0,4fachen dieses Wertes ( $p < 0,005$ ). Nach 120h Nährstoffentzug stieg die relative Genexpression allerdings auf das 1,3fache des Referenzwertes von Tag 1 an.

Im Western-Blot (Abb. 2) zeigte sich eine deutliche Steigerung der Expression bei zunehmender Konfluenz in Standardmedium. Unter Hungerbedingungen in FKS-freiem Medium erhöhte sich mit zunehmender Konfluenz nach 96h der PD-1-Proteingehalt, nahm nach 120h allerdings deutlich ab.



**Abb. 2: Repräsentativer Western-Blot der PD-1-Proteinexpression in SW620 Kolonkarzinomzellen.**

Bei zunehmender Konfluenz kam es unter Standardbedingungen (SM) zu einem Anstieg der PD-1-Proteinexpression. Bei Nährstoffentzug (HM) stieg diese zwischen 72h und 96h an, fiel nach 120h allerdings deutlich ab.

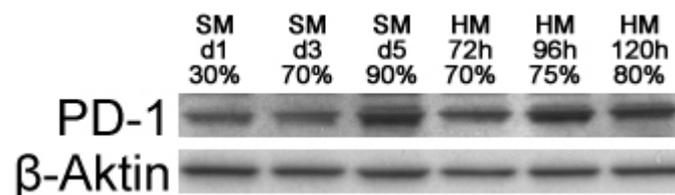
#### 4.1.1.3 HT-29 Kolonkarzinom

In HT-29 Kolonkarzinomzellen konnte an Tag 1 in Standardmedium fluoreszenzzytometrisch ein Anteil von 1,9% PD-1<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4C). An Tag 3 und 5 lag der Wert unterhalb der Nachweisgrenze. Dies war auch bei den Messungen nach 72h und 120h Nährstoffentzug der Fall.

Zwischen diesen beiden Messungen fanden sich nach 96h in Hungermedium 4% PD-1<sup>+</sup>-Zellen in der Probe.

Die relative Genexpression von PD-1-RNA stieg bis Tag 3 auf das Doppelte des Ausgangswertes ( $p < 0,02$ ) und fiel bis Tag 5 wieder auf das 1,2fache ab. Unter Mangelbedingungen war die Genexpression nach 72h erst leicht erhöht und sank danach unter den Referenzwert an Tag 1 (Abb. 5C).

Im Western-Blot ließ sich eine Steigerung der PD-1-Proteinexpression bei zunehmender Konfluenz sowohl in Standard- als auch in serumfreiem Medium erkennen (Abb. 3).



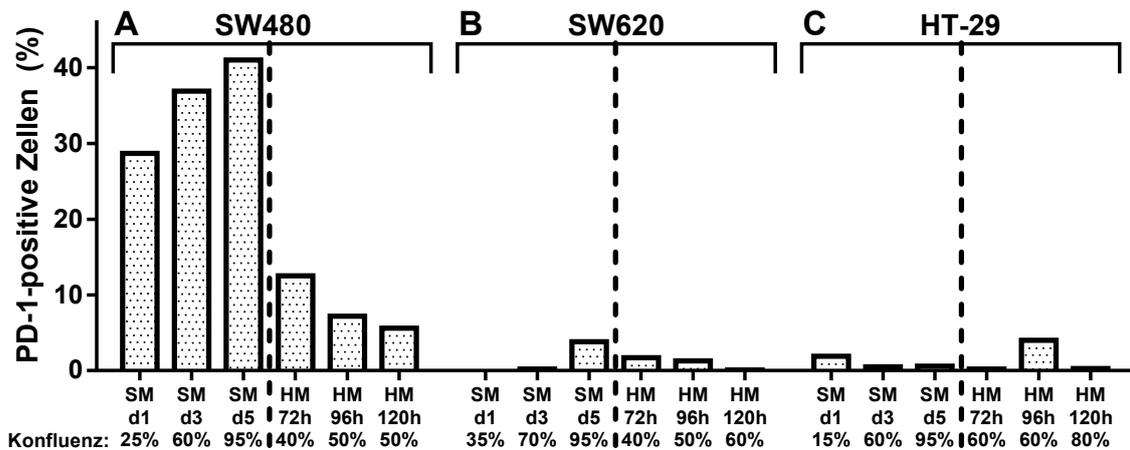
**Abb. 3: Repräsentativer Western-Blot der PD-1-Proteinexpression in HT-29 Kolonkarzinomzellen.**

Bei zunehmender Konfluenz kam es sowohl unter Standardbedingungen (SM) als auch unter Nährstoffentzug (HM) zu einem Anstieg des PD-1-Proteingehaltes.

#### **4.1.1.4 Vergleich der PD-1-Expression innerhalb der verschiedenen Kolonkarzinome**

Die Expression von PD-1 unterschied sich zwischen dem Kolonkarzinom SW480 und den Karzinomen SW620 und HT-29 deutlich. Während SW480 Karzinomzellen in Standardmedium zu  $35,5\% \pm 6,3\%$  PD-1<sup>+</sup> waren, gelang der Nachweis von PD-1 im SW620- und HT-29-Karzinom nur in geringem Maße. Unter Mangelbedingungen kam es zu ähnlichen Messergebnissen, wobei hier auch der Anteil PD-1-positiver SW480 Zellen reduziert war ( $8,4\% \pm 3,6\%$ ).

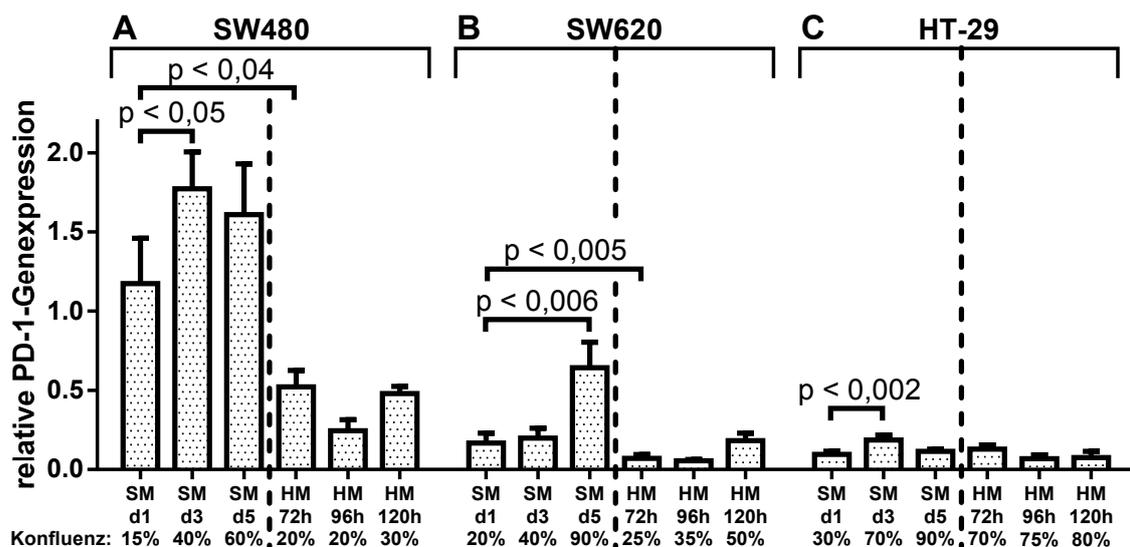
Dies spiegelte sich auch in den Messwerten der RT-qPCR wider: Während die relative Genexpression in Bezug auf fetale Kolon-Standardzellen (FHC) in Standardmedium bei SW480 Karzinomen noch  $1,52 \pm 0,31$  betrug, war diese bei SW620  $0,34 \pm 0,26$  bzw.  $0,13 \pm 0,05$  bei HT-29. Auch unter Mangelbedingungen hatten SW480 Karzinomzellen die höchste relative Genexpression.



**Abb. 4: Darstellung der FACS-Ergebnisse zur PD-1-Expression in SW480, SW620 und HT-29 Kolonkarzinomzellen.**

(A) SW480 Kolonkarzinome erhöhten die Expression von PD-1 bei ansteigender Konfluenz unter Standard-Wachstumsbedingungen (SM). Unter Nährstoffentzug (HM) war der Anteil PD-1<sup>+</sup>-Zellen bereits nach 72h stark reduziert und verringerte sich bei anhaltendem Nährstoffentzug. (B) Unter Standardbedingungen waren unter SW620 Kolonkarzinomzellen erst an Tag 5 bei 95% Konfluenz PD-1<sup>+</sup>-Zellen nachweisbar. Bei anhaltendem Nährstoffentzug sank der Anteil PD-1<sup>+</sup>-Zellen, nach 120h waren keinerlei PD-1-exprimierende Zellen mehr zu detektieren. (C) Außer an Tag 1 lag bei HT-29 Karzinomzellen unter Standardbedingungen der Anteil PD-1<sup>+</sup>-Zellen unterhalb der Nachweisgrenze. Unter Nährstoffentzug konnten nur nach 96h PD-1<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen werden.

Messwerte unterhalb der IgG-Kontrolle wurden als 0 definiert.



**Abb. 5: Darstellung der PD-1-Genexpression in SW480, SW620 und HT-29 Kolonkarzinomzellen.**

(A) Die relative PD-1-Genexpression im SW480 Kolonkarzinom stieg bei zunehmender Konfluenz in Standardmedium (SM) an. Bei Nährstoffentzug (HM) reduzierte sie sich auf das 0,2-0,5fache des Ausgangswertes an Tag 1. (B) Bei SW620 Kolonkarzinomzellen kam es unter Standardbedingungen zu einer Zunahme der relativen PD-1-Genexpression bei steigender Konfluenz. Bei Nährstoffentzug war die Genexpression deutlich niedriger, stieg nach 120h allerdings wieder an. (C) HT-29-Karzinome zeigten eine Zunahme der relativen PD-1-Genexpression unter Standardbedingungen bei steigender Konfluenz, die bei 90% Konfluenz an Tag 5 leicht sank. Bei anhaltendem Nährstoffentzug reduzierte sich die Genexpression. Die relative Genexpression ist als  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  dargestellt. Gezeigt wird der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen. Bezugspunkt ist die PD-1-Expression in fetalen Kolon-Standardzellen (FHC).

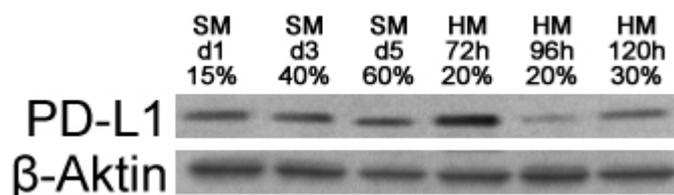
#### 4.1.2 PD-L1-Expression in SW480, SW620 und HT-29 Kolonkarzinomzellen

##### 4.1.2.1 SW480 Kolonkarzinom

SW480 Kolonkarzinomzellen wiesen fluoreszenzzytometrisch bei Wachstum in Standardmedium bei ansteigender Konfluenz einen konstanten Anteil von  $4,67\% \pm 0,59\%$  PD-L1<sup>+</sup>-positiven Zellen auf (Abb. 9A). Unter Nährstoffentzug in serumfreiem Medium war dieser Anteil sehr niedrig, allerdings zeigte sich ein Höchstwert von 7,2% nach 96h Nährstoffentzug.

PD-L1 wurde von SW480 Karzinomen im Vergleich zu fetalen Kolon-Standardzellen (FHC) unter allen gegebenen Bedingungen deutlich verringert exprimiert (maximale relative Genexpression 0,015; Daten nicht gezeigt).

Im Western-Blot blieb die PD-L1-Proteinexpression zwischen Tag 1 und Tag 5 konstant. Unter Nährstoffmangel konnte nach 72h eine erhöhte Expression, danach nur noch eine geringe Expression nachgewiesen werden (Abb. 6).

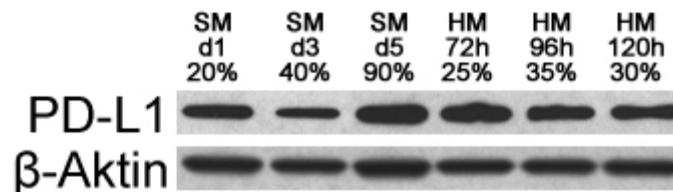


**Abb. 6: Repräsentativer Western-Blot der PD-L1-Proteinexpression in SW480 Kolonkarzinomzellen.**

Bei zunehmender Konfluenz blieb der PD-L1-Proteingehalt unter Standardbedingungen (SM) konstant. Nach 72h Nährstoffentzug (HM) war die PD-L1-Expression erhöht und sank bei anhaltendem Entzug deutlich ab.

#### 4.1.2.2 SW620 Kolonkarzinom

Im SW620 Kolonkarzinom (Abb. 9B) konnten fluoreszenzzytometrisch nur wenige PD-L1<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen werden. Die Messwerte schwankten zwischen 1-3%, wobei der Anteil unter anhaltendem Nährstoffentzug abnahm. In der Probe vom dritten Tag bei Wachstum in Standardmedium konnten keine PD-L1-positiven Zellen detektiert werden. Die relative Genexpression in Bezug auf fetale Kolon-Standardzellen (FHC) war unter allen Bedingungen deutlich reduziert (maximale relative Genexpression 0,014; Daten nicht gezeigt). Im Western-Blot wurde eine vermehrte PD-L1-Gesamtproteinexpression an Tag 5 sichtbar. Unter Nährstoffentzug kam es nur zu geringen Veränderungen im Proteingehalt (Abb. 7).



**Abb. 7: Repräsentativer Western-Blot der PD-L1-Proteinexpression in SW620 Kolonkarzinomzellen.**

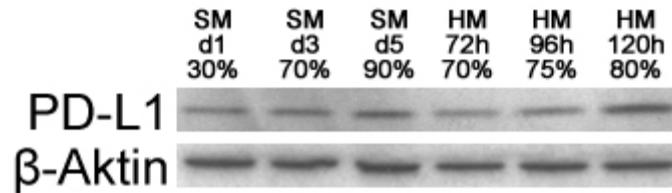
Unter Standardbedingungen (SM) zeigte sich bei 90% Konfluenz eine hohe PD-L1-Proteinexpression. Bei Nährstoffentzug (HM) traten nur geringe Veränderungen im Proteingehalt auf.

#### 4.1.2.3 HT-29 Kolonkarzinom

Ähnlich den Karzinomen SW480 und SW620 konnten fluoreszenzzytometrisch (Abb. 9C) bei den Zellproben aus Standardmedium zwischen 1-3% PD-L1<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen werden. Wie beim SW620-Karzinom kam es in der Probe vom dritten Tag zu einem Abfall des positiven Zellanteils. Während 72h Nährstoffentzug nur zu einer geringfügigen Erhöhung der PD-L1<sup>+</sup>-Zellen führte, ließen sich nach 96h und 120h 10% bzw. 9% PD-L1-positiv Zellen nachweisen.

Unter allen gegebenen Bedingungen fand sich gegenüber fetalen Kolon-Standardzellen (FHC) eine deutlich reduzierte relative PD-L1-Genexpression (Maximum 0,005; Daten nicht gezeigt).

Im Western-Blot (Abb. 8) ergaben sich unter Standardbedingungen nur geringe Veränderungen der Proteinexpression. Während des Zeitraumes des Nährstoffentzugs kam es bis nach 120h zu einer Erhöhung des Proteingehaltes.



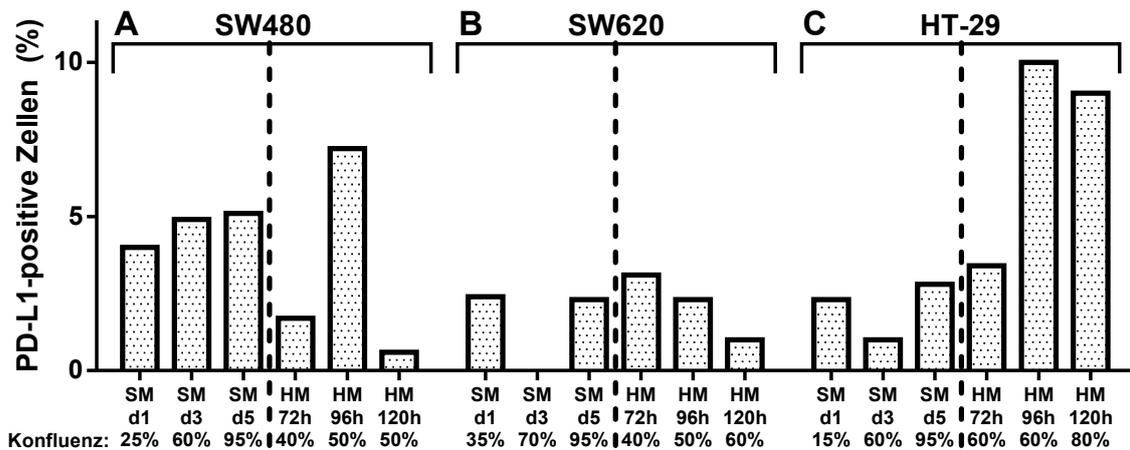
**Abb. 8: Repräsentativer Western-Blot der PD-L1-Proteinexpression in HT-29 Kolonkarzinomzellen.**

Während sich bei zunehmender Konfluenz unter Standardbedingungen (SM) nur geringe Veränderungen der Proteinexpression zeigten, nahm der Proteingehalt im Verlauf des Nährstoffentzugs (HM) deutlich zu.

#### **4.1.2.4 Vergleich der PD-L1-Expression innerhalb der verschiedenen Kolonkarzinome**

Im Vergleich der drei Karzinome untereinander fiel auf, dass der jeweils höchste Anteil PD-L1<sup>+</sup>-Zellen unter Nährstoffentzug gemessen wurde. Unter den SW480 Kolonkarzinomzellen lag dieses Maximum bei 96h und fiel danach deutlich ab, SW620 zeigte ein nur dezentes Maximum bereits nach 72h und in HT-29 Karzinomzellen kam es nach dem Maximum nach 96h zu einem nur geringen Abfall. Sowohl in SW620 als auch HT-29 Karzinomen fiel ein Abfall des Anteils PD-L1<sup>+</sup>-Zellen an Tag 3 der Messung auf.

Die drei Karzinome exprimierten in der PCR unter allen gegebenen Bedingungen PD-L1 im Vergleich zu fetalen Kolon-Standardzellen (FHC) deutlich reduziert.



**Abb. 9: Darstellung der FACS-Ergebnisse zur PD-L1-Expression in SW480, SW620 und HT-29 Kolonkarzinomzellen.**

(A) SW480 Kolonkarzinomzellen exprimierten zunehmend PD-L1 bei ansteigender Konfluenz unter Standard-Wachstumsbedingungen (SM). Unter Nährstoffentzug (HM) war der Anteil PD-L1<sup>+</sup>-Zellen nach 72h stark reduziert, erreichte einen Höchstwert nach 96h und fiel nach 120h erneut stark ab. (B) Unter Standardbedingungen konnten bei SW620 Kolonkarzinomzellen nur wenige PD-L1<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen werden. Bei anhaltendem Nährstoffentzug sank der Anteil PD-L1<sup>+</sup>-Zellen weiter ab. (C) HT-29 Zellen waren in der FACS-Analyse unter Standardbedingungen nur zu einem geringen Anteil PD-L1<sup>+</sup>. Unter Nährstoffentzug war dieser Anteil höher und stieg insbesondere nach 96h Nährstoffentzug deutlich an.

Messwerte unterhalb der IgG-Kontrolle wurden als 0 definiert.

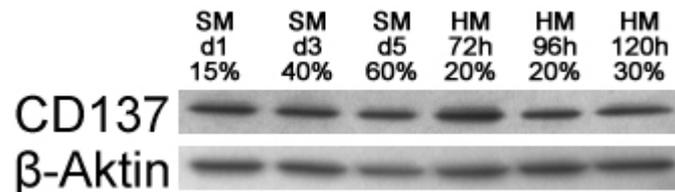
#### 4.1.3 CD137-Expression in SW480, SW620 und HT-29 Kolonkarzinomzellen

##### 4.1.3.1 SW480 Kolonkarzinom

Fluoreszenzzytometrisch betrug der Anteil CD137<sup>+</sup>-Zellen im SW480 Kolonkarzinom bei Wachstum in Standardmedium über alle Messzeitpunkte gemittelt  $3,57\% \pm 0,40\%$  (Abb. 13A). Eine Veränderung mit zunehmender Konfluenz konnte nicht festgestellt werden. Unter Mangelbedingungen unterschied sich der Messwert nach 72h Nährstoffentzug nicht von der IgG-Kontrolle, nach 96h konnte allerdings ein hoher Anteil von 13% CD137-positiven Zellen nachgewiesen werden. In der Messung nach 5 Tagen Nährstoffentzug wurden keine CD137<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen.

Sowohl in Standardmedium als auch unter Mangelbedingungen kam es bei steigender Konfluenz zu einer Hochregulierung der Expression von CD137-RNA (Abb. 14A). Die relative Genexpression steigerte sich bis Tag 5 bei 60%

Konfluenz auf das Dreifache des Ausgangswertes ( $p < 0,002$ ). Unter Nährstoffentzug lag der Wert der relativen Genexpression bereits nach 72h bei dem 2,3fachen des Referenzwertes ( $p < 0,03$ ). Diese Steigerungen der Expression ließen sich allerdings weder fluoreszenzzytometrisch noch im Western-Blot bestätigen (vgl. Abb. 10).



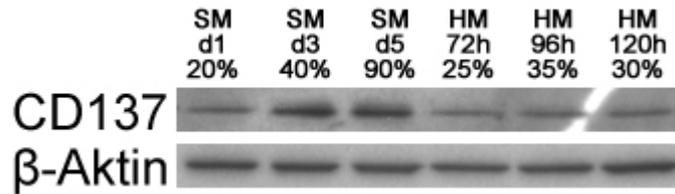
**Abb. 10: Repräsentativer Western-Blot der CD137-Proteinexpression in SW480 Kolonkarzinomzellen.**

Sowohl bei Wachstum in Standardmedium (SM) als auch unter Nährstoffentzug (HM) war keine wesentliche Veränderung der CD137-Expression zu erkennen.

#### 4.1.3.2 SW620 Kolonkarzinom

Bei SW620 Kolonkarzinomzellen konnten sowohl unter Standard- als auch unter Mangelbedingungen fluoreszenzzytometrisch keine CD137<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen werden. Die Messwerte entsprachen den Werten der IgG-Kontrollen (Abb. 13B). Auf RNA-Ebene ließ sich in der RT-qPCR eine Erhöhung der Genexpression bei zunehmender Konfluenz erkennen, an Tag 5 bei Wachstum in Standardmedium betrug diese das 4,3fache des Ausgangswertes an Tag 1 ( $p = 0,012$ ). Außerdem erhöhte sich die Genexpression unter Mangelbedingungen ( $3,26 \pm 1,03$  vs.  $2,19 \pm 1,79$ , gemittelt aus allen Messwerten, vgl. Abb. 14B,  $p = 0,067$ ).

Im Western-Blot fand sich unter Standardbedingungen eine mit Erhöhung der Konfluenz zunehmende CD137-Proteinexpression (Abb. 11). Der Proteingehalt während des Nährstoffentzugs blieb konstant.



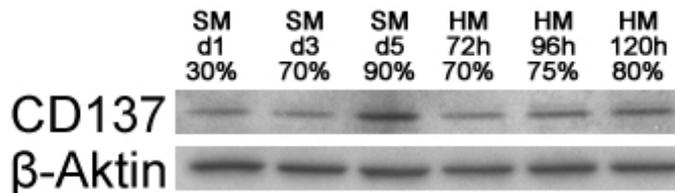
**Abb. 11: Repräsentativer Western-Blot der CD137-Proteinexpression in SW620 Kolonkarzinomzellen.**

SW620 Kolonkarzinomzellen in Standardmedium (SM) zeigten bei zunehmender Konfluenz eine Steigerung der CD137-Proteinexpression. Unter Nährstoffentzug (HM) blieb die Expression konstant auf niedrigem Niveau.

#### 4.1.3.3 HT-29 Kolonkarzinom

Ähnlich den Kolonkarzinomzellen SW620 lagen auch bei HT-29 Zellen der fluoreszenzzytometrisch bestimmte Anteil CD137-positiver Zellen meist auf Höhe der IgG-Kontrolle. Der höchste gemessene Wert betrug 1,2% positive Zellen an Tag 5 in Standardmedium (Abb. 13C). Auf mRNA-Ebene kam es zu einer Zunahme der relativen Genexpression unter Standardbedingungen mit steigender Konfluenz ( $p = 0,004$ ). Nach 72h Nährstoffentzug glich die relative Genexpression den Zellen unter Standardbedingungen bei gleicher Konfluenz und fiel nach längerem Nährstoffentzug ab (Abb. 14C).

Der Proteinnachweis im Western-Blot verdeutlichte einen erhöhten CD137-Proteingehalt bei zunehmender Konfluenz sowohl unter Standard- als auch Mangelbedingungen, der unter Standardbedingungen stärker ausgeprägt war (Abb. 12).

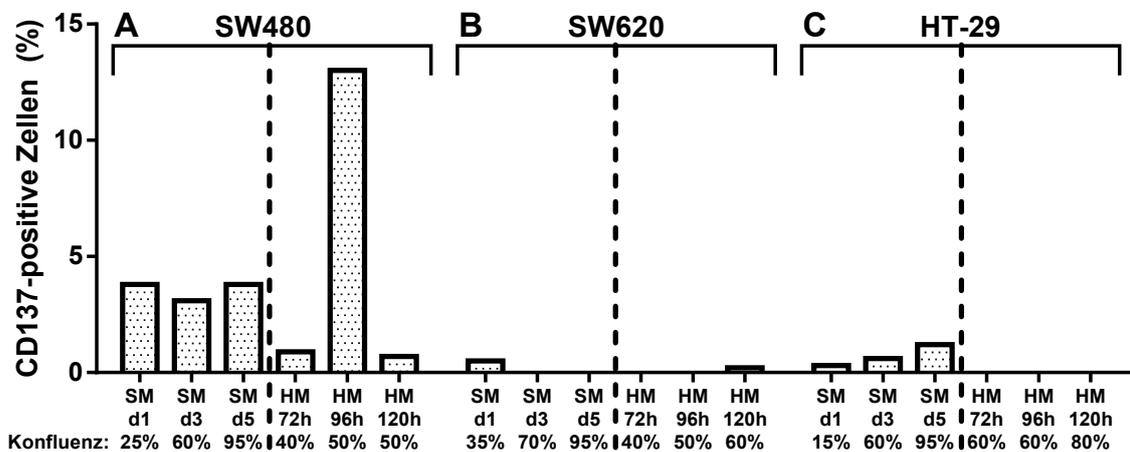


**Abb. 12: Repräsentativer Western-Blot der CD137-Proteinexpression in HT-29 Kolonkarzinomzellen.**

Sowohl bei zunehmender Konfluenz in Standardmedium (SM) als auch unter anhaltendem Nährstoffentzug (HM) kam es zu einer Erhöhung des CD137-Proteingehalts im HT-29 Karzinom.

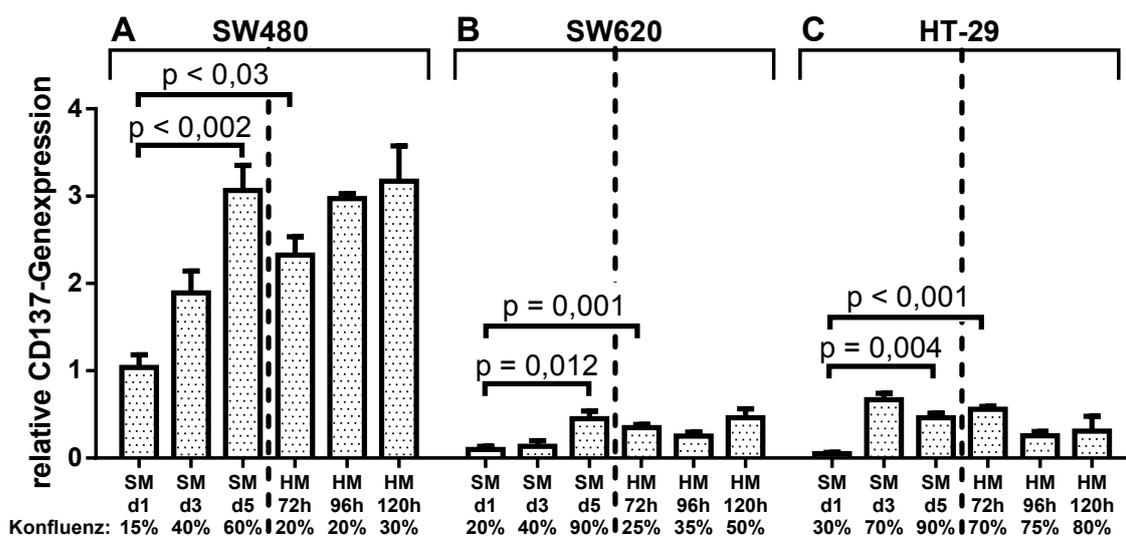
#### 4.1.3.4 Vergleich der CD137-Expression innerhalb der verschiedenen Kolonkarzinome

Fluoreszenzzytometrisch fand sich in den untersuchten Kolonkarzinomen nur ein geringer Anteil CD137-positiver Zellen. In den meisten Proben der Karzinome SW620 und HT-29 konnte sogar gar kein Nachweis von CD137<sup>+</sup>-Zellen erbracht werden (vgl. Abb. 13). Ähnlich diesem Ergebnis fand sich auch in der PCR-Analyse bezogen auf fetale Kolon-Standardzellen (FHC) nur im SW480 Kolonkarzinom eine im Median um  $2,4 \pm 0,83$  erhöhte relative Genexpression, während sie beim SW620 Kolonkarzinom mit  $0,29 \pm 0,16$  und beim HT-29 Kolonkarzinom mit  $0,38 \pm 0,22$  deutlich erniedrigt war.



**Abb. 13: Darstellung der FACS-Ergebnisse zur CD137-Expression in SW480, SW620 und HT-29 Kolonkarzinomzellen.**

(A) SW480 Zellen zeigten eine konstant gleichbleibende Expression von CD137 bei ansteigender Konfluenz unter Standard-Wachstumsbedingungen (SM). Unter Nährstoffentzug (HM) waren nur nach 96h Nährstoffmangel CD137<sup>+</sup>-Zellen nachweisbar. (B) SW620 Karzinome wiesen sowohl unter Standardbedingungen als auch unter Nährstoffentzug keine CD137-Expression auf. (C) HT-29 Kolonkarzinomzellen exprimierten kein CD137 auf ihrer Oberfläche. Messwerte unterhalb der IgG-Kontrolle wurden als 0 definiert.



**Abb. 14: Darstellung der CD137-Genexpression in SW480, SW620 und HT-29 Kolonkarzinomzellen.**

(A) Die relative CD137-Genexpression im Kolonkarzinom SW480 stieg bei zunehmender Konfluenz in Standardmedium (SM) und unter Mangelbedingungen (HM) an. (B) Beim SW620 Karzinom zeigte sich sowohl unter Standard- als auch Mangelbedingungen eine Zunahme der relativen CD137-Genexpression bei steigender Konfluenz. Das Niveau lag bei Nährstoffentzug höher. (C) HT-29 Kolonkarzinomzellen exprimierten unter Standardbedingungen bei steigender Konfluenz zunehmend CD137. Unter Mangelbedingungen entsprach die Genexpression nach 72h dem Wert der Zellen unter Standardbedingungen bei ähnlicher Konfluenz und fiel bei anhaltendem Nährstoffentzug ab.

Die relative Genexpression ist als  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  dargestellt. Gezeigt wird der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen. Bezugspunkt ist die CD137-Expression in fetalen Kolon-Standardzellen (FHC).

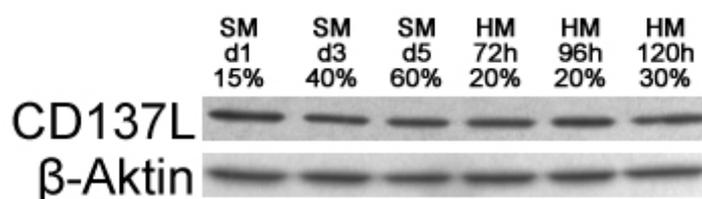
#### 4.1.4 CD137L-Expression in SW480, SW620 und HT-29 Kolonkarzinomzellen

##### 4.1.4.1 SW480 Kolonkarzinom

Im SW480 Kolonkarzinom fand sich unter fünftägiger Inkubation in Standardmedium eine gesteigerte CD137L-Expression (Abb. 18A). Während an Tag 1 bei 25%iger Konfluenz 44% der SW480 Tumorzellen CD137L exprimierten, stieg der Anteil am Tag 5 bei einer Konfluenz von 95% auf 71% CD137L<sup>+</sup>-Zellen. Auch in der PCR-Analyse stieg die relative Genexpression in diesem Zeitraum auf das 1,3fache (Abb. 19A,  $p = 0,091$ ). Mittels Western-Blot

konnte dagegen keine Erhöhung des CD137L-Proteingehaltes festgestellt werden (Abb. 15).

Unter Serumentzug sistierte das Wachstum der SW480-Karzinome bereits früh. Der Anteil der CD137L-positiven Zellen war bei einer Konfluenz von 50% mit 50% positiven Zellen auf ähnlichem Niveau wie in Normalmedium bei entsprechender Konfluenz und nahm bei anhaltendem Nährstoffentzug ab. Die relative Genexpression lag deutlich unter dem Spiegel der Zellen in Normalmedium ( $0,65 \pm 0,12$  vs.  $1,01 \pm 0,26$  in Bezug auf die fetale Kolonzellreihe FHC,  $p < 0,003$ ). Im Western-Blot fand sich entsprechend keine Veränderung der Proteinexpression.



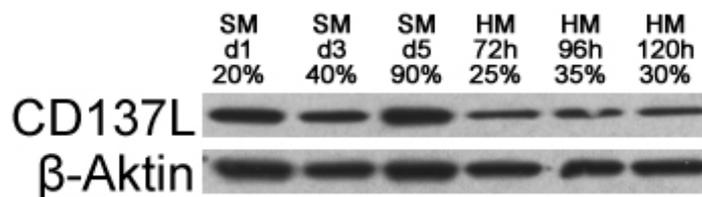
**Abb. 15: Repräsentativer Western-Blot der CD137L-Proteinexpression in SW480 Kolonkarzinomzellen.**

Sowohl bei Wachstum in Standardmedium (SM) als auch unter Nährstoffentzug (HM) war keine wesentliche Veränderung der CD137L-Expression zu erkennen.

#### 4.1.4.2 SW620 Kolonkarzinom

Bei SW620 Kolonkarzinomzellen war unter vergleichsweise hoher Ausgangsexpressionsdichte in Normalmedium sowohl fluoreszenzzytometrisch als auch im Western-Blot kein Anstieg der CD137L-Expression bei zunehmender Konfluenz erkennbar. Nur unter Mangelbedingungen kam es zu einer Erhöhung des Anteils CD137L<sup>+</sup>-Zellen (Abb. 18B), was sich jedoch nicht in der CD137L-Proteinexpression im Western Blot widerspiegelte (Abb. 16).

Parallel zur Konfluenzzunahme unter Standardbedingungen stieg die Genexpression um das 3,4fache innerhalb von fünf Tagen an ( $p < 0,008$ ). Unter Hungerbedingungen war die Expression nach 72h Nährstoffentzug deutlich erhöht ( $p = 0,015$ ) und erreichte nach 5 Tagen knapp das 10fache der Expression an Tag 1 in Standardmedium (Abb. 19B,  $p < 0,003$ ). Die CD137L-Genexpression war im Mittel unter Nährstoffentzug signifikant erhöht ( $p < 0,006$ ).



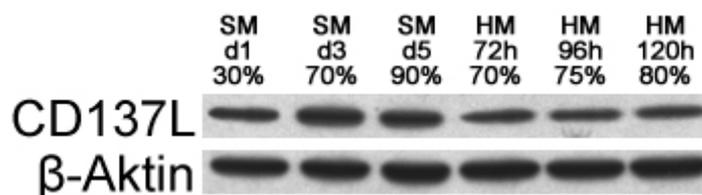
**Abb. 16: Repräsentativer Western-Blot der CD137L-Proteinexpression in SW620 Kolonkarzinomzellen.**

In Standardmedium (SM) kultivierte Tumorzellen zeigten wenig veränderte CD137L-Expression. Unter Nährstoffentzug (HM) kam es zu einer Abnahme des Gesamtproteins.

#### 4.1.4.3 HT-29 Kolonkarzinom

In HT-29 Kolonkarzinomzellen kam es in Standardmedium im Gegensatz zu SW480 und SW620 Tumorzellen bei steigender Konfluenz zu einer deutlichen Abnahme der CD137L-Expression. Dies war sowohl fluoreszenzzytometrisch durch eine Halbierung des Anteils CD137L<sup>+</sup>-Zellen (71,2% an Tag 1 bei 15% Konfluenz vs. 36,6% an Tag 5 bei 95% Konfluenz, Abb. 18C) als auch in der molekularen Analyse zu beobachten. Die Genexpression fiel an Tag 5 auf das 0,35fache des Anfangswertes ab (Abb. 19C,  $p < 0,05$ ). Im Western-Blot spiegelte sich dagegen eine geringe bis mäßige Zunahme der Expression bei zunehmender Konfluenz wider (Abb. 17).

Unter Serumentzug kam es während des Beobachtungszeitraums fluoreszenzzytometrisch bei bereits initial hoher, wenig ansteigender Konfluenz zu einer Zunahme der CD137L<sup>+</sup>-Zellen von 23,6% nach 72h auf 77,3% nach 96h, die auch nach 120h nur geringfügig abfiel. Die relative Genexpression bewegte sich nach 72h Mangelbedingungen auf ungefähr der Hälfte der Ausgangsexpression an Tag 1 unter Standardbedingungen und näherte sich diesem Wert nach 120h wieder an.



**Abb. 17: Repräsentativer Western-Blot der CD137L-Proteinexpression in HT-29 Kolonkarzinomzellen.**

Bei zunehmender Konfluenz kam es bei Wachstum in Standardmedium (SM) zu einer vermehrten Expression von CD137L. Unter Nährstoffentzug (HM) wurde CD137L bei stasierender Konfluenz auf konstantem, niedrigen Niveau exprimiert.

#### 4.1.4.4 Vergleich der CD137L-Expression innerhalb der verschiedenen Kolonkarzinome

Alle untersuchten Kolonkarzinome (SW480, SW620, HT-29) wiesen fluoreszenzzytometrisch einen konstant hohen Anteil an CD137L-positiven-Zellen auf. Ihr Anteil betrug im Mittel 55% (Abb. 18).

Im direkten Vergleich fand sich für SW620 Kolonkarzinomzellen im Vergleich zu den SW480-Tumorzellen ein erhöhter Anteil an CD137L<sup>+</sup>-Zellen (68,3% ± 13,2% vs. 54,5% ± 9,5%, über alle Messwerte gemittelt). Während SW480 Karzinome besonders bei höheren Konfluenzen in Standardmedium CD137L auf ihrer Zelloberfläche exprimierten und die Expression bei Nährstoffentzug abnahm, fand sich in den Kolonkarzinomen SW620 und HT-29 der höchste Anteil CD137L<sup>+</sup>-positiver Zellen unter Mangelbedingungen, welcher noch höher lag als im SW480-Karzinom.

Die relative CD137L-Genexpression in SW480 Karzinomen bewegte sich mit  $0,83 \pm 0,27$  in Bezug auf die fetale Kolonzellreihe FHC auf dem Niveau des Referenzwertes (Abb. 19). SW620 Karzinomzellen exprimierten CD137L-RNA mit  $2,25 \pm 1,77$  und einem Maximum von 5,58 deutlich stärker, während HT-29 Zellen mit  $0,35 \pm 0,14$  deutlich unter diesem Niveau lagen.

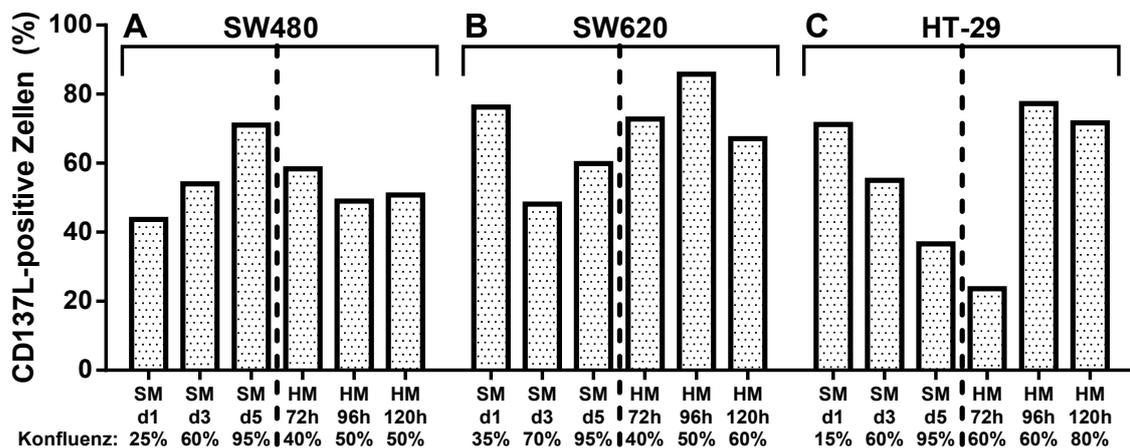
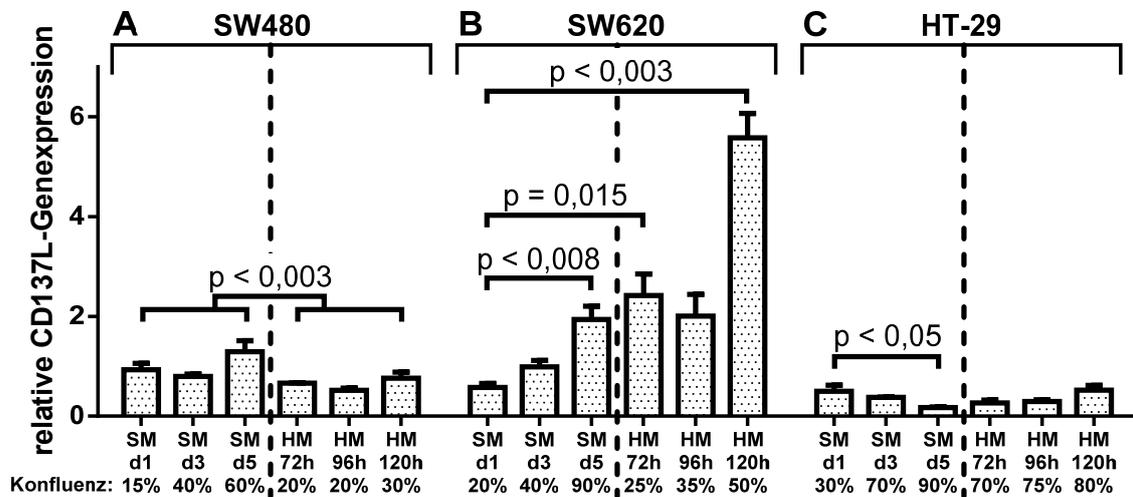


Abb. 18: Darstellung der FACS-Ergebnisse zur CD137L-Expression in SW480, SW620 und HT-29 Kolonkarzinomzellen.

(A) Die Expression von CD137L im SW480 Kolonkarzinom stieg bei zunehmender Konfluenz unter Standardbedingungen an (SM). Unter anhaltendem Nährstoffentzug (HM) kam es zu einem Abfall der Expression. (B) Das SW620 Kolonkarzinom war unter Nährstoffentzug vermehrt CD137L-positiv. (C) HT-29 Karzinomzellen zeigten unter Standardbedingungen eine

Abnahme der CD137L<sup>+</sup>-Zellen. Unter Nährstoffentzug war dieser Anteil nach 72h erst stark verringert und erhöhte sich bei anhaltendem Nährstoffmangel.



**Abb. 19: Darstellung der CD137L-Genexpression in SW480, SW620 und HT-29 Kolonkarzinomzellen.**

(A) SW480 Karzinome exprimierten bei zunehmender Konfluenz in Standardmedium (SM) verstärkt CD137L. Unter Nährstoffentzug (HM) verringerte sich die Genexpression. (B) In SW620 Zellen zeigte sich mit zunehmender Konfluenz sowohl in Standard- als auch unter Nährstoffentzug (HM) eine Zunahme der CD137L-Genexpression. (C) In HT-29 Kolonkarzinomzellen reduzierte sich die CD137L-Genexpression bei steigender Konfluenz in Standardmedium. Unter Nährstoffentzug war die Genexpression nach 72h halbiert in Bezug auf Tag 1 in Standardmedium und näherte sich diesem Bezugswert nach 5 Tagen Nährstoffentzug wieder an.

Die relative Genexpression ist als  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  dargestellt. Gezeigt wird der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen. Bezugspunkt ist die CD137L-Expression in fetalen Kolon-Standardzellen (FHC).

## 4.2 Relative Genexpression von PD-1/PD-L1 und CD137/CD137L im murinen Modell

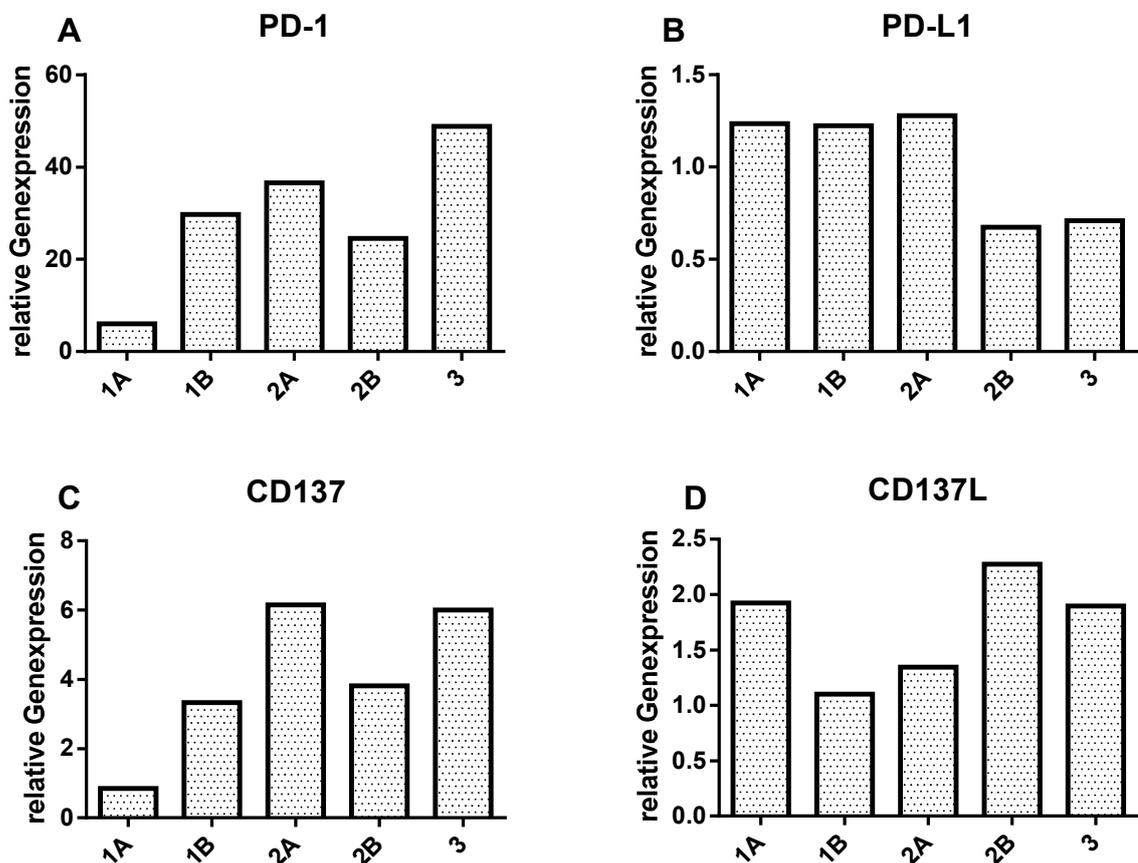
Um die Entwicklung der relativen PD-1/PD-L1- und CD137/CD137L-Genexpression im lebenden Organismus zu klären, wurden subkutane xenogene SW480 und HT-29 Kolonkarzinome in Balb/c-Nacktmäusen untersucht. Als Bezugspunkt der RT-qPCR-Analysen dienten die Messwerte der jeweiligen Kolonkarzinome in vitro mit der kleinsten Konfluenz unter Standardbedingungen.

#### 4.2.1 SW480 Kolonkarzinom

In den SW480 Tumoren fand sich eine massiv erhöhte Expression von PD-1 gegenüber der Expressionsdichte *in vitro*. Die Expression des Rezeptors übertraf den Referenzwert um das bis zu 50fache ( $p = 0,016$ , Abb. 20A). Sein Ligand PD-L1 wurde dagegen ausschließlich auf dem Niveau des Referenzwertes ( $1,02 \pm 0,30$ ) nachgewiesen (vgl. Abb. 20B).

Auch die CD137-Spiegel waren in den xenogenen Tumoren erhöht (Faktor  $4,03 \pm 2,18$ ). Die Expression war signifikant höher als *in vitro* ( $p = 0,036$ , Abb. 20C).

Der CD137-Ligand wurde ebenfalls vermehrt exprimiert (Faktor  $1,71 \pm 0,48$ ,  $p = 0,029$ , vgl. Abb. 20D).

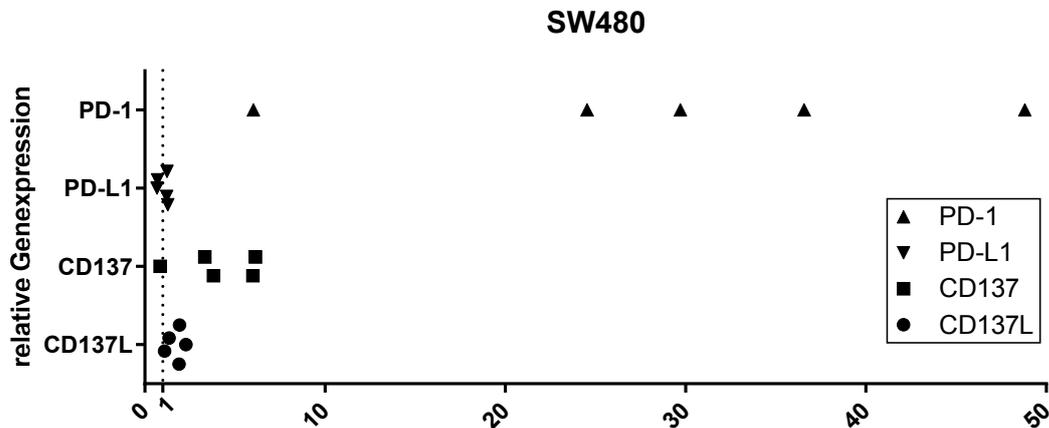


**Abb. 20: PD-1, PD-L1, CD137 und CD137L Genexpression in subkutanen xenogenen SW480-Kolonkarzinomen in Balb/c-Nacktmäusen (n = 5).**

**(A)** Die relative PD-1-Genexpression im xenogenen Kolonkarzinom übertraf den Referenzwert der kleinsten Konfluenz unter Standardbedingungen *in vitro* um das bis zu 50fache ( $p = 0,016$ ).

**(B)** Der Ligand PD-L1 konnte ausschließlich auf Niveau des Referenzwertes ( $1,02 \pm 0,30$ ) nachgewiesen werden. **(C)** Die CD137-Genexpression erhöhte sich gegenüber der kleinsten

Konfluenz unter Standardbedingungen durchschnittlich um den Faktor  $4,03 \pm 2,18$  ( $p = 0,036$ ).  
**(D)** CD137L wurde im xenogenen SW480 Kolonkarzinom in Bezug auf die kleinste Konfluenz unter Standardbedingungen in vitro vermehrt exprimiert (Faktor  $1,71 \pm 0,48$ ,  $p < 0,029$ ).  
 Die relative Genexpression ist als  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  dargestellt. Bezugspunkt ist die Expression in SW480-Kolonkarzinomzellen mit der kleinsten Konfluenz unter Standardbedingungen in vitro.



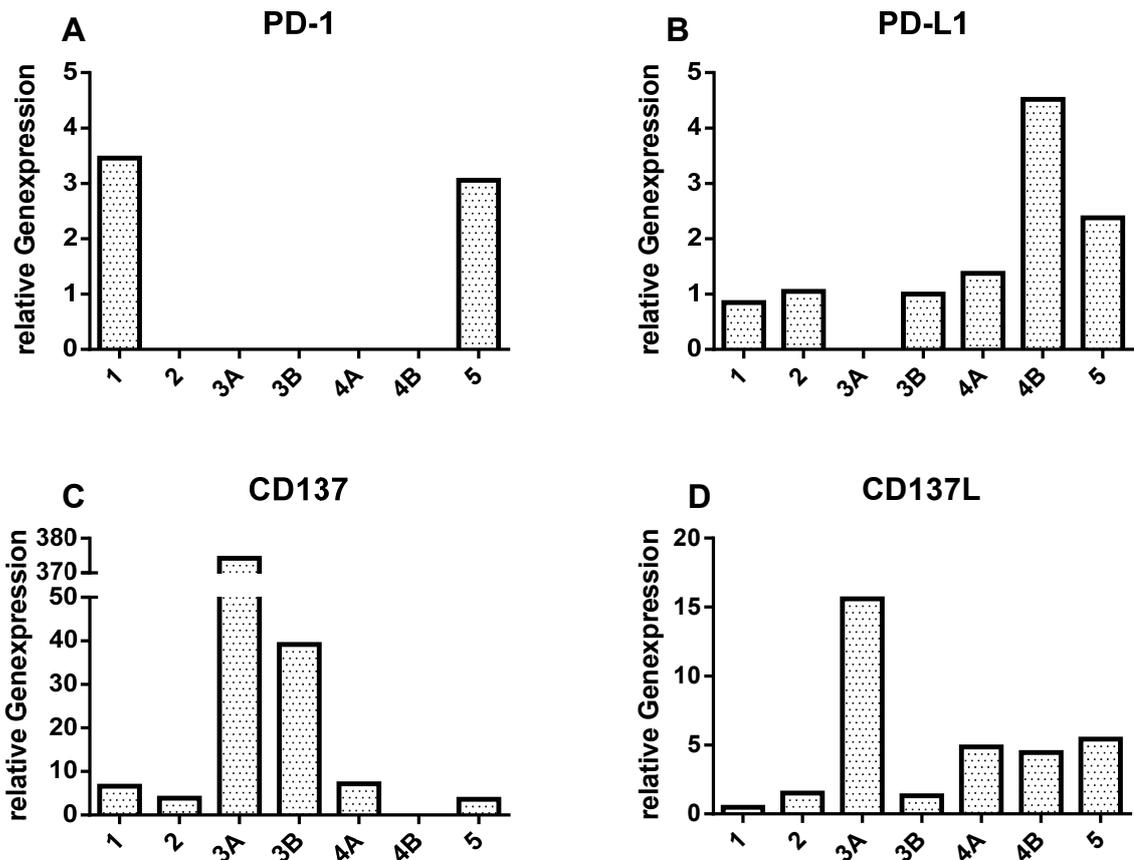
**Abb. 21: PD-1, PD-L1, CD137 und CD137L Genexpression in subkutanen xenogenen SW480-Kolonkarzinomen in Balb/c-Nacktmäusen (n = 5).**

SW480-Tumorzellen exprimierten ausgeprägt PD-1 sowie deutlich verstärkt CD137. Die Liganden wurden auf gleichbleibendem Niveau exprimiert.

Bezugspunkt ist die Expression in SW480-Kolonkarzinomzellen mit der kleinsten Konfluenz unter Standardbedingungen in vitro.

#### 4.2.2 HT-29 Kolonkarzinom

Im Gegensatz zum SW480 Karzinom wiesen die RT-qPCR-Ergebnisse der subkutanen xenogenen HT-29 Kolonkarzinome eine deutliche Streuung auf. PD-1 konnte in 5 von 7 Proben nicht nachgewiesen werden (Abb. 22A). Ähnlich den SW480 Kolonkarzinomzellen entsprach die Expression von PD-L1-RNA zumeist dem Niveau der Referenzprobe (Abb. 22B). In mehreren Proben kam es zur starken Erhöhung der relativen Genexpression von CD137 und CD137L (vgl. Abb. 22C und Abb. 22D).



**Abb. 22: CD137, CD137L, PD-1 und PD-L1 Genexpression in subkutanen xenogenen HT-29 Kolonkarzinomen in Balb/c-Nacktmäusen (n = 7).**

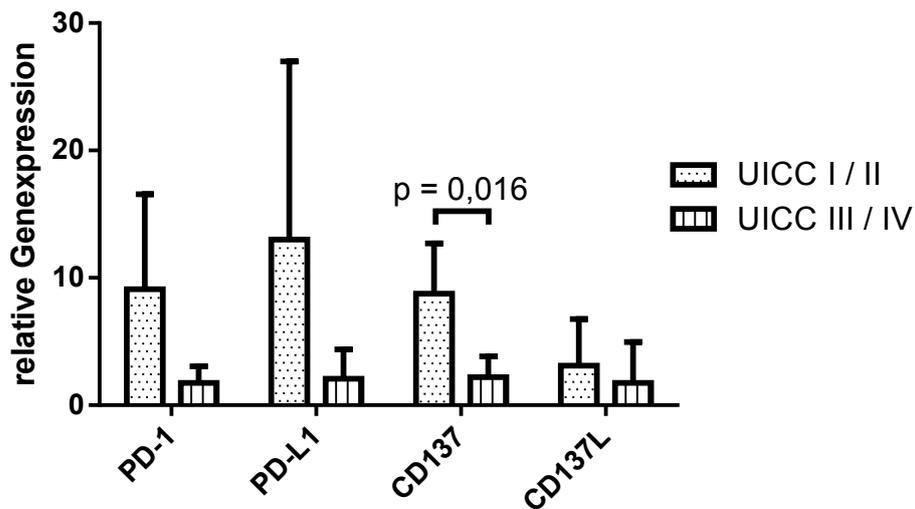
(A) In 5 aus 7 Proben konnte keine Genexpression von PD-1 in HT-29 Kolonkarzinomen nachgewiesen werden. (B) Die PD-L1-Expression befand sich meist auf Niveau des Referenzwertes. (C) HT-29 Kolonkarzinomzellen exprimierten CD137 in deutlich variabler relativer Genexpression. (D) Auch die relative Genexpression von CD137L alternierte von geringer Expression bis zum 15fachen der kleinsten Konfluenz unter Standardbedingungen.

Die relative Genexpression ist als  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  dargestellt. Bezugspunkt ist die Expression in HT-29-Kolonkarzinomzellen mit der kleinsten Konfluenz unter Standardbedingungen in vitro.

#### **4.2.3 Relative Genexpression von PD-1/PD-L1 und CD137/CD137L im humanen Kolonkarzinom**

Um die Genexpression von PD-1, PD-L1, CD137 und CD137L im Kolonkarzinom des Menschen zu untersuchen, wurden chirurgisch gewonnene Patientenproben mittels RT-qPCR analysiert. Anschließend wurden die Proben nach UICC-Stadien sortiert ( $n_{\text{UICCIII}} = 6$ ,  $n_{\text{UICCIII/IV}} = 8$ ). Als Bezugspunkt der Berechnung diente die Expression in fetalen Kolon-Standardzellen (FHC).

Die Expression in den UICC-Stadien I und II unterlag insbesondere für das Rezeptor-Liganden-Paar PD-1/PD-L1 deutlichen Schwankungen (vgl. Abb. 23). Sämtliche untersuchten Proteine zeigten bei Betrachtung des Mittelwertes in niedrigen UICC-Stadien eine höhere Expression gegenüber den höheren Stadien, welche bis auf CD137 statistisch nicht signifikant war (PD-1  $p = 0,1$ , PD-L1  $p = 0,08$ , CD137  $p = 0,016$ , CD137L  $p = 0,55$ ). Die relative Genexpression in den UICC-Stadien III und IV entsprach für alle untersuchten Paare dem Doppelten der Expression in fetalen Kolon-Standardzellen (FHC) ( $1,95 \pm 0,22$ ; PD-1  $p = 0,144$ , PD-L1  $p = 0,151$ , CD137  $p = 0,070$ , CD137L  $p = 0,377$ ), in den Stadien I und II war die Expression noch deutlich höher und für CD137 statistisch signifikant (PD-1  $p = 0,074$ , PD-L1  $p = 0,063$ , CD137  $p = 0,008$ , CD137L  $p = 0,196$ ).



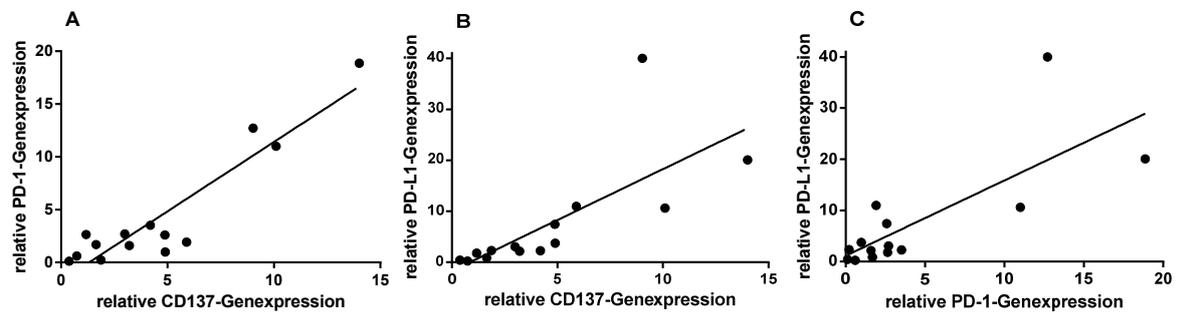
**Abb. 23: PD-1, PD-L1, CD137 und CD137L Genexpression im Kolonkarzinom niedriger und hoher UICC-Stadien, bezogen auf fetale Kolon-Standardzellen (FHC) ( $n_{\text{UICC I/II}} = 6$ ,  $n_{\text{UICC III/IV}} = 8$ ).**

PD-1, PD-L1 und CD137L wurden in Kolonkarzinomen der UICC-Stadien I und II nicht-signifikant höher exprimiert als in den UICC-Stadien III und IV. CD137 wurde in den UICC-Stadien I und II signifikant höher exprimiert.

In den UICC-Stadien III und IV wurden PD-1, PD-L1, CD137 und CD137L von Kolonkarzinomen doppelt so hoch exprimiert als in fetalen Kolon-Standardzellen (FHC) ( $1,95 \pm 0,22$ ). In den Stadien I und II war die Expression noch deutlich höher, CD137 war signifikant erhöht ( $p = 0,008$ ). Die relative Genexpression ist als  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  dargestellt. Als Bezugspunkt der Berechnung diente die Expression in fetalen Kolon-Standardzellen (FHC).

#### **4.2.4 Korrelationsanalyse der relativen Genexpression von PD-1/PD-L1 und CD137/CD137L**

Die relative Genexpression der kostimulatorischen Signalwege PD-1/PD-L1 und CD137/CD137L in chirurgisch gewonnenen Resektaten humaner Kolonkarzinome wurde anschließend mit dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson auf einen linearen Zusammenhang überprüft (vgl. Abb. 24). Dabei ließ sich erkennen, dass die relative CD137-Genexpression stark positiv mit der relativen Genexpression von PD-1 und PD-L1 korrelierte ( $r = .923$ ,  $p < .001$  bzw.  $r = .731$ ,  $p = .003$ ,  $n = 14$ ). Ebenso war eine hohe relative PD-1-Genexpression mit einer hohen Expression von PD-L1 assoziiert ( $r = .767$ ,  $p = .001$ ,  $n = 14$ ).



**Abb. 24: Pearson-Korrelation zwischen CD137 und PD-1/PD-L1 Genexpression im kolorektalen Karzinom, bezogen auf Kolon-Normalgewebe-Zellen (n = 14).**

(A) Die relative Genexpression von CD137 und PD-1 korrelierte stark positiv miteinander ( $r = .923$ ,  $p < .001$ ). (B) Für die relative Genexpression von CD137 und PD-L1 fand sich ebenfalls eine stark positive Korrelation ( $r = .731$ ,  $p = .003$ ). (C) Auch die relative Genexpression von PD-1 und PD-L1 korrelierten signifikant positiv ( $r = .767$ ,  $p = .001$ ).

Die relative Genexpression ist als  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  dargestellt. Als Bezugspunkt der Berechnung diente die Expression in fetalen Kolon-Standardzellen (FHC).

## 5 Beantwortung der Fragen

1. Werden die für das Zustandekommen einer Immunantwort beschriebenen kostimulatorischen Signale PD-1 und CD137 bzw. deren Liganden PD-L1 und CD137L von Zellen humaner Kolonkarzinome exprimiert? Welche Gemeinsamkeiten oder Unterschiede werden dazu beobachtet?

Beide kostimulatorischen Signalwege wurden auf den Zellen dreier verschiedener humaner Kolonkarzinome auf Gen- und Proteinexpressionsebene nachgewiesen. Das Kolonkarzinom SW480 zeigte in den Untersuchungen ohne weitere Stimulation die ausgeprägteste Genexpression. Immunhistochemisch wurden die Rezeptoren PD-1 und CD137 bereits in den Ausgangsmessungen auf der Zelloberfläche des SW480 Karzinoms teils ausgeprägt exprimiert. Dies war bei den Kolonkarzinomen SW620 und HT-29 nicht der Fall: Die Genexpression beider Rezeptoren war hier auf gegenüber fetalen humanen Kolonzellen nur reduziertem Niveau nachweisbar, immunhistochemisch war ein geringer Anteil der Zellen positiv. Der Ligand PD-L1 wurde initial nur von einem geringen Zellanteil der untersuchten Kolonkarzinome immunhistochemisch nachweisbar exprimiert, auch hier insbesondere von dem Kolonkarzinom SW480. Die Genexpression war in der PCR nicht nachweisbar. CD137L fand sich allerdings auf einem Großteil der immunhistochemisch untersuchten Zellen aller Kolonkarzinome und auf Genexpressionsebene.

2. Zeigen sich Unterschiede in der Expression im Laufe des Tumorzellwachstums in vitro?

Im Laufe des Tumorzellwachstums und damit zunehmendem Zellkontakt verstärkte sich die PD-1/PD-L1-Proteinexpression im SW480 Kolonkarzinom und teils im SW620 Kolonkarzinom. Auf die Expression bei Zellen des HT-29 Karzinoms hatte das Tumorzellwachstum keinen Einfluss. Auch CD137-mRNA fand sich vermehrt bei zunehmender Konfluenz in allen drei Karzinomen, wobei

der immunhistochemisch nachweisbare Anteil CD137-positiver Zellen beim SW480 Karzinom konstant und bei SW620 und HT-29 Zellen unterhalb der Nachweisgrenze blieb. Der Ligand CD137L wurde von den Kolonkarzinomen SW480 und SW620 im Laufe des Tumorzellwachstums auf Gen- und Proteinebene vermehrt exprimiert, im HT-29 Karzinom kam es im Gegensatz dazu zu einer Abnahme der CD137L-Expression.

3. Wie wirkt sich eine Reduktion des Nährstoffangebots im Kulturmedium auf die Expression in vitro aus?

Eine Reduktion des Nährstoffangebots im Kulturmedium führte in den Kolonkarzinomen SW480 und SW620 zu einer deutlich verringerten PD-1/PD-L1-Proteinexpression des Signalwegs. Das HT-29 Kolonkarzinom zeigte konträr einen zunehmenden Anteil PD-L1-Protein-exprimierender Zellen.

Auf Genexpressionsebene erhöhte sich der Gehalt an CD137-mRNA beim SW480 und SW620 Kolonkarzinom, beim HT-29 Karzinom fiel er ab. Es gelang kein immunhistochemischer Nachweis in den drei Karzinomen.

Die Gen- und Proteinexpression von CD137L steigerte sich in den Kolonkarzinomen SW620 und HT-29 bei anhaltendem Nährstoffentzug. Im SW480 Kolonkarzinom reduzierte sich die Genexpression dagegen leicht, der immunhistochemisch nachweisbare Anteil positiver Zellen fiel ab.

4. Welches Expressionsverhalten zeigt sich für die kostimulatorischen Signale und deren Liganden bei einem Tumorwachstum in vivo und unterscheidet sich dieses gegenüber dem Wachstum in vitro?

Im xenogenen SW480 Kolonkarzinom wurden die untersuchten Rezeptoren PD-1 und CD137 auf Genexpressionsebene gegenüber einem Tumorwachstum in vitro deutlich vermehrt exprimiert. Auch CD137L fand sich dezent vermehrt, während PD-L1 ausschließlich auf Niveau des in vitro Referenzwertes nachgewiesen werden konnte.

In den meisten subkutanen xenogenen HT-29 Kolonkarzinomen gelang kein Nachweis von PD-1. Die PD-L1-Expression entsprach in den meisten Proben dem Genexpressionsverhalten in vitro. Der Signalweg CD137/CD137L wurde in variabler relativer Genexpression vorgefunden.

In chirurgisch gewonnenen Resektaten des humanen Kolonkarzinoms ließen sich die untersuchten kostimulatorischen Signalwege in deutlich schwankender, aber gegenüber in vitro Bedingungen erhöhter Genexpressionsstärke nachweisen. Dabei fand sich in niedrigen UICC-Stadien eine höhere Expression als in fortgeschrittenen UICC-Stadien.

5. Welche Erkenntnisse leiten sich aus den in vivo und in vitro gewonnenen Ergebnissen für die kostimulatorischen Signalwege PD-1 und CD137 und deren Liganden für die Klinik ab?

Die kostimulatorischen Signalwege wurden von den untersuchten Kolonkarzinomen humaner Zelllinien und in humanen Primärtumoren in unterschiedlichem Ausmaß auf der Zelloberfläche bzw. auf Genexpressionsebene exprimiert. Hieraus lässt sich schließen, dass mit einer Evaluierung des individuellen Expressionsverhaltens des entsprechenden Tumors der Erfolg einer Antikörpertherapie möglicherweise verbessert abgeschätzt werden kann. Auch zeigten sich Unterschiede in der Expression zwischen dem Primärtumor und der (Lymphknoten-)Metastase eines Tumors, so dass das unterschiedliche Expressionsverhalten im Zusammenspiel immunologischer Zellen in oder entnommen aus einem Lymphknoten und dorthin migrierter Tumorzellen hier mit zu berücksichtigen ist. So könnte die Immunevasion bzw. Unterdrückung einer effektiven Tumorimmunantwort auch wesentlich im lymphatischen Abflussgebiet eines Primärtumors entstehen und von dort weiter gesteuert werden. Dabei sollte auch aufgrund der wesentlich stärkeren zellulären Immunität in einem Lymphknoten gegenüber Kolonkarzinomgewebe von einer abweichenden Signalwegsexpression ausgegangen werden.

Auffällig war die positive Korrelation zwischen der CD137-Genexpression und der Expression des PD-1/PD-L1-Signalwegs. Eine Kombination aus PD-1/PD-L1-Antikörpertherapie mit CD137-Antikörpern sollte aus diesem Grund verstärkt angestrebt werden.

Die Genexpression kostimulatorischer Signalwege war in Kolonkarzinomen niedriger UICC-Stadien besonders ausgeprägt. Dies könnte man als Anlass sehen, insbesondere die Tumorpatienten der Risikostadien UICC III und teilweise UICC II mittels einer immunonkologischen Therapie zielgerichtet zu behandeln, bei denen eine verstärkte Expression nachgewiesenermaßen in größeren Kohortenstudien mit einem schlechteren tumorbedingten Überleben assoziiert wurde. Bis jetzt fokussiert sich die Zulassung dieser Therapieart auf metastasierte Tumorstadien, nicht aber auf die Primärtherapie ansprechende Tumore früher Stadien.

## **6 Diskussion**

### **6.1 Expression von PD-1 und CD137 sowie ihrer Liganden in Kolonkarzinomzellen**

#### **6.1.1 Expression von PD-1 im humanen Kolonkarzinom**

Der negativ kostimulatorische Rezeptor PD-1 bremst sowohl die T-Zell-Rezeptor-Transduktion beim Kontakt mit APCs als auch das Angriffsverhalten zytotoxischer T-Zellen und findet sich auf aktivierten T-Zellen sowie anderen Zellen der Immunabwehr (Agata et al. 1996).

Die Expression von PD-1-mRNA in HT-29 Kolonkarzinomzellen wurde bereits beschrieben und interessanterweise wurde dabei darauf verwiesen, dass es unter Einfluss von IFN- $\gamma$  zur Abnahme der Expression kam (Nakazawa et al. 2004). Die hier durchgeführten Untersuchungen bestätigen die konstitutive Genexpression von PD-1 im HT-29 Kolonkarzinom .

Diese Arbeit erweitert die Ergebnisse dahingehend, dass auch die humanen Kolonkarzinome SW480 sowie die Metastase SW620 PD-1 exprimieren. Bemerkenswert ist, dass sich die Expression innerhalb der Kolonkarzinome unterscheidet. Die in vitro Untersuchungen an den humanen Kolonkarzinomen wurden ohne inflammatorischen Einfluss wie in den humanen Primärtumoren durchgeführt. Aufgrund dieser artifiziellen Zellkulturbedingungen kam es in HT-29 und SW620 Kolonkarzinomen nur zu einer geringen Gen- und Proteinexpression. Ganz gegensätzlich fand sich im SW480 Kolonkarzinom mit 30% positiver Zellen eine vergleichsweise hohe PD-1 Proteinexpression, die sich auch molekulargenetisch widerspiegelte. Dieses Kolonkarzinom zeigte also bereits unter Standardbedingungen eine wesentlich höhere PD1-Expression.

Die Proteinexpression erhöhte sich bei zunehmender Konfluenz der SW480 und SW620 Kolonkarzinome und war sensibel auf Nährstoffmangel und sehr hohe Konfluenzen. Erstmals zeigte sich so, dass die Expression von PD-1 auf Kolonkarzinomzellen von der Proliferation der Zellen sowie von gegenseitigem Zellkontakt abhängig ist. Eine metabolische Unterversorgung wie bei Nährstoffentzug oder hohe Konfluenzen und damit Zellkontakt führt zur

Reduktion der PD-1-Expression. Beim HT-29 Kolonkarzinom zeigten sich keine klaren Tendenzen. Hieraus lässt sich folgern, dass die Kolonkarzinome SW480 und SW620 in Abhängigkeit vom Tumorwachstum und dem Nährstoffangebot PD-1 exprimieren, während das HT-29 Karzinom PD-1 Protein konstitutiv exprimiert und nur durch externe Stimulation durch Faktoren des Tumor-Microenviroments modifiziert. In vivo waren die untersuchten HT-29 Kolonkarzinome PD-1-negativ, was darauf hindeutet, dass es zumindest unter artifiziellen subkutanen in vivo Wachstumsbedingungen und bei xenogener, d.h. immunkompromittierter Ausgangssituation in der Maus in diesem Kolonkarzinom zu keiner relevanten Expression dieses Signalwegs kommt. Ganz gegensätzlich exprimierten xenogene subkutane SW480 Tumore PD-1 in deutlich erhöhtem Maße. Diese Beobachtung kann die Basis für weitere Forschungen, welche Faktoren zur Immunevasion über den PD-1-Signalweg führen, bilden.

Die Proteinexpression bei SW480 Tumorzellen in vivo ist der in vitro durchaus sehr ähnlich und zeigt, dass Tumorzellen auch in vivo PD-1 deutlich exprimieren. Der Anteil an PD-1-Expression durch tumorinfiltrierende Immunzellen ist in diesem Modell vergleichsweise gering ausgeprägt.

Bestätigt wurde durch diese Arbeit die Erkenntnis, dass primäre Kolonkarzinome PD-1 in unterschiedlichem Ausmaß exprimieren (Gatalica et al. 2014). SW480 und SW620 Kolonkarzinomzellen, welche dem Primarius und der Metastase eines Kolonkarzinoms entstammen, sind auf Gen- und Proteinebene als PD-1-positiv anzusehen. Darüber hinaus wiesen SW480 Tumore eine signifikant höhere Proteinexpression gegenüber den SW620 Tumoren als bekannte metastatische Abkömmlinge auf. So konnte diese Arbeit erstmals beschreiben, dass die Eigenschaft zur PD-1 Expression von Primarius zur Metastase möglicherweise weitergegeben wird, aber diese in unterschiedlichem Maß ausgeprägt ist. Mit dem Hintergrund, dass insbesondere bei der initialen Manifestation einer Neoplasie bei noch guter Nährstoffversorgung und hoher Immunogenität die Manipulation des PD-1-Signalwegs für das Tumorwachstum vorteilhaft sein kann, ist es schlüssig, dass der Primärtumor verstärkt PD-1 exprimiert als seine (Lymphknoten-)Metastase.

Es ist denkbar, dass insbesondere der Primarius von der durch PD-1 vermittelten Abnahme der T-Zell-Aktivität profitiert und hiermit die Immunreaktion verringert.

Während sich die aktuelle Forschung auf die Expression von PD-1 auf Immunzellen und ihre T-Zell-hemmende Interaktion mit PD-L1-exprimierenden Neoplasien fokussiert, hat auch die PD-1-Expression auf dem Tumor selbst Auswirkung auf die Immunreaktion. Über die Expression von PD-1 auf ihrer Oberfläche sind Zellen in der Lage, den induzierbaren T-Zell-Kostimulator (ICOS) zu aktivieren und damit die T-Zell-Proliferation und Zytokinsekretion zu fördern (Hutloff et al. 1999; Zhang et al. 2016). Die Expression von PD-1 auf humanen Kolonkarzinomen konnte diese Arbeit systematisch weiter darlegen. Der Großteil der untersuchten Patiententumorproben wies erhöhte PD-1-Expressionen auf. Während die Datenlage für kolorektale Karzinome schwach ist, wurde in 63% der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome eine PD-1-Expression nachgewiesen. Dabei war die Genexpression mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert (Yin et al. 2017). Hierfür sind zwei Erklärungen denkbar: Da die PD-1-Expression invers mit dem IFN- $\gamma$ -Spiegel korreliert, deuten hohe PD-1-Spiegel auf eine geringe Begleitinfektion im Tumorumfeld hin (Nakazawa et al. 2004). Dies erklärt auch die hohen Konzentrationen von PD-1 in den subkutan implantierten Kolonkarzinomen der immuninkompetenten Balb/c-Nacktmäuse. Zweitens weisen hohe PD-1-Spiegel auf eine gute Nährstoffversorgung, hohes Wachstums- und hohes Metastasierungspotenzial und damit auf ein aggressives Fortschreiten der Erkrankung hin (Gatalica et al. 2014).

### **6.1.2 Expression von PD-L1 im humanen Kolonkarzinom**

Der Ligand PD-L1 des negativ kostimulatorischen Rezeptors wurde auf APCs, nicht-lymphoiden Gewebeproben und auch Neoplasien nachgewiesen. Auf Monozyten wird der Ligand beständig exprimiert und durch IFN- $\gamma$  und Lipopolysaccharide hochreguliert. Er gilt daher bei Tumoren als Marker für ein immun-aktives Mikromilieu (Droeser et al. 2013). Gesundes Darmepithel weist üblicherweise wenig bis kein PD-L1 auf (Inaguma et al. 2017). Diese Arbeit

zeigt, dass die humanen Kolonkarzinome SW480, SW620 und HT-29 den immuninhibierenden Liganden PD-L1 bereits in vitro ohne externe Stimulation in geringer Menge konstitutiv auf Proteinebene exprimieren. Subkutan in immuninkompetente Balb/c-Nacktmäuse implantierte Kolonkarzinome wiesen eine ähnlich niedrige, konstitutive Genexpression auf. Dies ist bei der geringen Begleitinfektion aufgrund des subkutanen Implantationsortes und der Immuninkompetenz der Mäuse stimmig.

Vorangehende Untersuchungen hatten beschrieben, dass PD-L1 auf HT-29 Kolonkarzinomzellen nur in sehr geringem Ausmaß exprimiert wird. Erst durch Stimulation mittels IFN- $\gamma$  von T-Helferzellen wird die Expression von PD-L1 in peripherem Gewebe bei Inflammation induziert (Nakazawa et al. 2004; Freeman et al. 2000a; Prado-Garcia et al. 2017). In sämtlichen untersuchten Resektaten humaner Kolonkarzinome dieser Arbeit, die verständlicherweise von einem stimulierenden immunologischen und inflammatorischen Umfeld umgeben waren, fanden sich daher hohe Spiegel an PD-L1. Diese Ergebnisse stützen die Vermutung, dass es sich bei der Expression von PD-L1 auf Tumorzellen um die Reaktion auf eine endogene Inflammation im Mikromilieu des Tumors handelt, mit der die Anti-Tumor-Immunreaktion des Immunsystems abgeschwächt werden soll. Durch die Expression von PD-L1 können Tumorzellen den PD-1-Rezeptor auf Immunzellen binden und dadurch die T-Zell-Aktivität im Tumorumfeld herabsetzen (Hebeisen 2013).

Dementsprechend war die PD-L1-Expression nicht allein vom Tumorzellwachstum und Zellkontakt, wohl aber von der Nährstoffversorgung mit abhängig. Analog zu den Erkenntnissen zur PD-1-Expression reagierten die Kolonkarzinome SW480 und SW620 auf Nährstoffentzug mit einer weiteren Reduktion der Proteinexpression von PD-L1. Dies ist auf das reduzierte Risiko einer adäquaten Immunreaktion im schlecht versorgten Tumorgebiet zu übertragen.

Erneut fand sich beim HT-29 Kolonkarzinom ein gegensätzliches Verhalten. Durch die Erkenntnisse dieser Arbeit muss man davon ausgehen, dass dieses Kolonkarzinom das immunevasive Potenzial des PD-1/PD-L1-Signalwegs eher

nicht zu seinem Vorteil ausschöpft oder andere Mechanismen zu Grunde liegen.

Die Auswirkung der PD-L1-Expression auf das Gesamtüberleben ist weiterhin umstritten. Ähnlich wie in dieser Arbeit konnte eine vermehrte Expression in frühen Tumorstadien beobachtet werden (Droeser et al. 2013). Andere Arbeitsgruppen sprechen von einer schlechteren Prognose bei PD-L1-Positivität. Dabei scheint die Immunogenität des Tumors großen Einfluss auf die PD-L1-Expression zu haben. Faktoren hierfür sind z.B. eine hohe Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) und eine geringe Differenzierung, wodurch sich die Begleitinfektion verstärkt und PD-L1-Expression auf den Tumorzellen stimuliert wird (Inaguma et al. 2017; Gatalica et al. 2014). Beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom ist kein signifikanter Zusammenhang zwischen PD-L1-Expression und verschlechtertem Gesamtüberleben erkennbar (Yang et al. 2017).

### **6.1.3 Expression von CD137 im humanen Kolonkarzinom**

Der Rezeptor CD137 übt eine wichtige Rolle in der Regulation inflammatorischer und anti-inflammatorischer Reaktionen von T-Zellen aus, indem er ihre Proliferation und zytolytische Aktivität erhöht (Sun et al. 2004). Das Protein konnte hauptsächlich auf aktivierten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nachgewiesen werden, wenngleich CD137-mRNA in allen aktivierten hämatopoetischen Zelltypen detektiert werden konnte (Schwarz et al. 1995). In malignen Tumoren wurde CD137-Protein auf Endothel- und Gefäßmuskelzellen im Tumorgebiet immunhistochemisch nachgewiesen (Broll et al. 2001; Wang et al. 2008).

Diese Arbeit trägt als eine der ersten strukturierten Untersuchungen zum weiteren Erkenntnisgewinn der CD137-Expression im humanen Kolonkarzinom bei. Das Protein konnte in relevantem Ausmaß auf der Zelloberfläche des SW480 Kolonkarzinoms nachgewiesen werden. In den Karzinomen SW620 und HT-29 fand sich CD137-mRNA im Vergleich zu SW480 Tumoren in deutlich geringerer Ausprägung. Sowohl zunehmender Zellkontakt als auch erhöhter Stress durch ein nährstoffarmes Kulturmedium führten zur signifikanten Zunahme der CD137-Expression in allen untersuchten Kolonkarzinomen.

Ebenso exprimierten die Kolonkarzinome SW480 und HT-29 in vivo CD137 signifikant höher als in vitro.

Durch die Expression des Rezeptors werden in Immunzellen über den NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktor die antiapoptotischen Gene bcl-x<sub>L</sub> und bfl-1 aktiviert (Lee et al. 2002). Es ist denkbar, dass sich Tumorzellen diesen Signalweg zu Nutze machen und so das Überleben bei Nährstoff- und Platzmangel gewährleisten. Darüber hinaus kann auf der Zelloberfläche exprimiertes CD137-Protein den immunstimulierenden Liganden CD137L im Tumorgebiet binden. Der CD137/CD137L-Komplex wird anschließend internalisiert und CD137L steht nicht mehr zur T-Zell-Kostimulation zur Verfügung (Pang et al. 2013).

In der Tat konnte in dieser Arbeit die Expression von CD137 beim Kolonkarzinom nachgewiesen werden. Dabei ließ sich die Expression auf mRNA-Ebene in allen in vitro untersuchten Karzinomen durch hohe Konfluenzen und durch Nährstoffentzug stimulieren. Für aktivierte T-Lymphozyten ist eine ähnliche Stimulation der CD137-Gen- und Proteinexpression durch Hypoxie und durch den Prolyl-Hydroxylase-Inhibitor Dimethylalloylglycine (DMOG) bekannt (Palazón et al. 2012). Gleichzeitig exprimierte die aus einer Metastase gewonnene Kolonkarzinomzelllinie SW620 verglichen mit ihrem Primarius CD137-Protein wesentlich geringer. Denkbar ist, dass sie aufgrund der besseren Nährstoffversorgung einer Metastase von diesem antiapoptotischen Signalweg weniger Gebrauch machen muss.

Die untersuchten in vivo Proben aus Balb/c-Nacktmäusen sowie aus primären humanen Kolonkarzinomen der eigenen Arbeit wiesen signifikant höhere CD137-Genexpression auf, was sich mit dem höheren apoptotischen Stress durch schlechte Versorgung bei subkutaner Tumorage oder zentraler Tumorage beim Menschen durchaus erklären lässt.

Eine erhöhte Expression des CD137-Rezeptors auf Tumorgewebe könnte einen Schutzmechanismus gegenüber der körpereigenen Immunabwehr im Tumor bedeuten, indem antiapoptotische Signalwege aktiviert werden. Gleichzeitig könnte die signifikante Erhöhung der CD137-Expression in der Mikroumgebung des Tumors auch von einwandernden Immunzellen verursacht werden. Betrachtet man die erhöhte relative CD137-Genexpression in niedrigen UICC-

Stadien, spräche dies für eine stärkere Immunreaktion in diesen frühen Tumorstadien.

Hierdurch ergänzt diese Arbeit die bereits veröffentlichten Ergebnisse, in denen zumindest beim Rektumkarzinom eine signifikant höhere CD137-Expression im Vergleich zu gesundem Gewebe nachgewiesen werden konnte. Im Kolonkarzinom zeigten sich dazu nicht signifikante Ergebnisse (Dimberg et al. 2006). Durch das Nachweisen von CD137-mRNA und teils CD137-Protein in den Kolonkarzinomzellen SW480, SW620 und HT-29 konnte belegt werden, dass das Auftreten von CD137 in Malignomen nicht ausschließlich durch infiltrierende APCs und Blutgefäße innerhalb des Tumors bedingt ist, sondern der Rezeptor auch von den Tumorzellen selbst konstitutiv exprimiert wird.

Die genauen Auswirkungen der aktivierten CD137-Signalkaskade in Tumorzellen sind weitestgehend unerforscht und können nur von der Wirkung in Immunzellen abgeleitet werden. Falls CD137 auch in Tumorzellen eine antiapoptotische und wachstumsfördernde Wirkung erzielt, hätte dies große Konsequenzen auf die CD137-aktivierende Antikörpertherapie, mit der eigentlich tumorinfiltrierende Immunzellen stimuliert werden sollen. Ein ähnliches Dilemma wurde bereits für das folliculäre Lymphom beschrieben (Anderson et al. 2012). Auf der anderen Seite könnte anti-CD137 das Internalisieren von CD137L-Protein durch die Tumorzellen unterbinden und somit den Mechanismus der Immunevasion stoppen.

#### **6.1.4 Expression von CD137L im humanen Kolonkarzinom**

CD137L wirkt über Bindung von CD137 auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen immunstimulierend bzw. -modulierend, auf der anderen Seite inhibiert er über negative Rückkopplung die Proliferation und induziert die Apoptose der Zelle (Qian et al. 2015). Seine Expression in Anwesenheit von aktivierten T-Zellen oder dem Rezeptor CD137 ist somit primär nachteilig für Karzinomzellen. Der Ligand konnte bereits in Gewebeproben des kolorektalen Karzinoms sowie auf gesunder Darmschleimhaut nachgewiesen werden. Ob CD137L auf Neoplasien verstärkt oder vermindert exprimiert wird, ist umstritten (Dimberg et al. 2006; Wang et al. 2008).

In vitro ist die Expression ohne immunologische Konsequenz und diese Arbeit konnte zeigen, dass alle untersuchten Kolonkarzinome CD137L auf Gen- und Proteinebene in hohem Maße exprimieren. Für HT-29 Kolonkarzinomzellen war die starke mRNA- und Proteinexpression bereits vorbeschrieben (Wang et al. 2008; Salih et al. 2000).

Zu Zeitpunkten starker in vitro Zellproliferation erhöhte sich in den SW620 und HT-29 Kolonkarzinomen der CD137L-Proteingehalt. Unter Nährstoffentzug, bei dem nur eine geringe Konfluenzveränderung und damit veränderter Zellkontakt stattfand, blieb die Proteinexpression unverändert, wobei sich der Anteil CD137L-positiver Zellen sowie die relative Genexpression erhöhten. Daraus lässt sich folgern, dass die Menge an CD137L-Protein pro Zelle bei starkem Wachstum zu-, und unter Mangelbedingungen abnimmt. Dies lässt wiederum darauf schließen, dass die Expression von CD137L in vivo einen wachstumshemmenden Effekt haben könnte. Andere Arbeitsgruppen folgerten aus der nachgewiesenen Expression von CD137L in den spontan immortalisierten Endothelzellen ECV304 ebenfalls, dass das Protein mit starkem Wachstum assoziiert sein könnte (Wang et al. 2008).

Es fiel auf, dass das SW480 Kolonkarzinom im Vergleich zu dem metastatisch gewonnenen SW620 Karzinom das Protein CD137L in geringerem Maß exprimiert. Unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe konnten in Proliferations-Assay-Untersuchungen zeigen, dass die Zelllinie SW480 verglichen mit SW620 und HT-29 zwar eine deutlich längere Zellverdopplungszeit aufweist, allerdings auch wesentlich unempfindlicher gegenüber Nährstoffentzug ist. Dies scheint schlüssig, wenn man bedenkt, dass der Primarius eines Kolonkarzinoms einer langsameren Zellverdopplungszeit unterliegt, dafür aber im Gegensatz zu Metastasen oftmals schlechte Nährstoffbedingungen aufweist.

Die gewonnenen Ergebnisse mit einigen unstimulierten Tendenzen im Wechselspiel zwischen auf der Zelloberfläche exprimiertem CD137L, dem Gesamtprotein im Western Blot und der relativen Genexpression weisen darauf hin, dass die Expression von CD137L im humanen Kolonkarzinom umfassend reguliert wird. Zunächst ist hier die durch CD137 vermittelte Endozytose des

Liganden zu nennen, womit sich die geringere Expression von CD137L auf der Zelloberfläche des SW480 Kolonkarzinoms erklären ließe (Ho et al. 2013). Als weiterer Faktor ist die wichtige Rolle des Liganden bei grundsätzlichem Zellstress im Rahmen von Inflammation zu beachten (Kwon 2012). Sowohl die niedrigere Expression im tendenziell Zellstress-resistenteren SW480 Kolonkarzinom als auch die erhöhte in vivo Expression verdeutlichen diesen Ansatz. Dies wäre vereinbar mit dem Nährstoffmangel, den Tumorzellkonglomerate insbesondere im Tumorzentrum stärker erleiden müssen, als dies in Zellkulturflaschen der Fall ist. Auch in vitro reagierten HT-29 Kolonkarzinome auf diesen Stress mit deutlich erhöhter CD137L-Expression, mehr als SW480 Karzinome.

Vor dem Hintergrund der starken Hochregulierung der CD137L-Expression und dem hohen Anteil an CD137L-positiven Kolonkarzinomzellen in vitro ist die Expression des Liganden im primären Kolonkarzinom bemerkenswert: In den Resektaten dieser Arbeit fand sich CD137L in niedrigen UICC-Stadien nur leicht erhöht, in hohen UICC-Stadien eher unterhalb der Genexpression von gesundem Kolongewebe. Üblicherweise ist bei dem schnellen Wachstum und tendenziell schlechter Nährstoffversorgung primärer Karzinome von einer Zunahme des Zellstress und damit auch von einer Verstärkung der inflammatorisch modulierenden Signalwege wie z.B. CD137/CD137L auszugehen. Da das Exprimieren von CD137L eine höhere Immunogenität und die Gefahr der Zellapoptose mit sich bringt, entspricht eine geringere Expression einem immunevasiven Mechanismus. Dies erklärt, warum das immunstimulierende Protein in der Zellkultur vermehrt und bei Konfrontation mit Immunzellen vermindert exprimiert wird, wie in den eigenen Untersuchungen festgestellt. Diese Beobachtung ist im Einklang mit früheren Untersuchungen, welche ebenfalls eine gegenüber dem Normalgewebe reduzierte CD137L-Expression beschrieben (Dimberg et al. 2006).

Für das NSCLC konnte eine Korrelation zwischen hoher CD137L-Expression und guter Tumordifferenzierung, frühem Stadium und verbessertem Gesamtüberleben gezeigt werden (Qian et al. 2015). Diese Arbeit weist darauf hin, dass ein ähnlicher Zusammenhang für das kolorektale Karzinom besteht.

## **6.2 Korrelation der PD1/PD-L1- und CD137/CD137L-Expression im humanen Kolonkarzinom**

Die relative Genexpression beider kostimulatorischen Signale und ihrer Liganden war mit Ausnahme von CD137L in den humanen Karzinomen aller Stadien gegenüber der Expression in fetalen Kolon-Standardzellen erhöht. Ebenso zeigte sich, dass die Expression in niedrigen UICC-Stadien teils deutlich höher war als in Tumoren höherer Stadien. Aufgrund der starken Streuung in der Expression und der begrenzten Anzahl untersuchter Karzinome war dies bis auf CD137 allerdings statistisch nicht signifikant.

Daraus lässt sich folgern, dass die immunmodulierenden Funktionen der kostimulatorischen Signalwege von Zellen des kolorektalen Karzinoms ausgiebig genutzt werden und vom Differenzierungsgrad und der Ausbreitung des Tumors abhängig sind. Allerdings gestaltet es sich weiterhin schwierig, anhand der Expressionsstärke der Signalwege prognostische Aussagen zum Verlauf der Tumorerkrankung oder dem Ansprechen auf die Antikörpertherapie zu treffen (Taube et al. 2014).

Erstmals zeigte diese Arbeit eine stark positive Korrelation zwischen der Expression von CD137 und PD-1/PD-L1. Unter der Berücksichtigung der kleinen Stichprobe und der Tatsache, dass eine Verfälschung der Messwerte durch tumorinfiltrierende Immunzellen nicht ausgeschlossen werden kann, kann zumindest von einer starken Verknüpfung der beiden kostimulatorischen Signalwege gesprochen werden. Dies verdeutlicht die Relevanz einer Kombination der Antikörpertherapie beider Signalwege. Die Untersuchung der Wechselwirkungen der Immunmodulatoren muss Gegenstand weiterer Forschung sein.

## **6.3 Klinische Bedeutung und Ausblick**

Mit der Zulassung des CTLA-4-Antikörpers Ipilimumab zur Therapie des malignen Melanoms im Jahr 2011 wurde erstmals ein Checkpoint-Inhibitor therapeutisch eingesetzt. Der PD-1-Antikörper Nivolumab (Opvido®, Bristol-Myers-Squibb), welcher ebenfalls zur Monotherapie des fortgeschrittenen, nicht-resezierbaren oder metastasierten Melanoms bei Erwachsenen verwendet

wird, wurde im März 2015 vorzeitig zur Therapie des fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms mit plattenepithelialer Histologie zugelassen. Es zeigten sich im Vergleich zur Docetaxel-Behandlung bessere und anhaltende klinische Ergebnisse. Ein Fünftel der Patienten mit Bronchialkarzinom blieben unter Nivolumab-Therapie progressionsfrei, im Vergleich zu 8% mit Docetaxel-Therapie (Borghaei et al. 2015). Ähnliche Ergebnisse ergab eine PD-1-Antikörpertherapie beim Nierenzellkarzinom und hepatozellulären Karzinom (Motzer et al. 2015). Der PD-1-Antikörper Pembrolizumab (Keytruda®, Merck & Co.) wurde im Mai 2017 aufgrund der hohen Ansprechrate in den KEYNOTE-Studien im beschleunigten Verfahren von der amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde FDA als erstes Krebsmedikament für solide Tumore zugelassen, bei denen eine hohe Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) nachgewiesen werden kann.

Darüber hinaus befinden sich auch PD-L1-Antikörper (Avelumab, Atezolizumab, Durvalumab, BMS-936559) in klinischen Studien. Avelumab (Bavencio®, Merck KgaA) erhielt im Frühjahr 2017 die beschleunigte Zulassung zur Therapie des metastasierten Merkelzellkarzinoms als Erstlinientherapie nach einer erfolgreichen Phase-2-Studie (Kaufman et al. 2016). Darüber hinaus wurde die Behandlung von Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Blasenkarzinom zugelassen, falls sich der Tumor unter einer platinhaltigen Chemotherapie progredient zeigte. Grundlage der Zulassung war die gute Wirksamkeit im Rahmen der JAVELIN-Solid-Tumor-Studie (Heery et al. 2017). Die Kombination von PD-1- und PD-L1-Antikörpern in der Therapie könnte die Blockade des kostimulatorischen Signalwegs noch effektiver machen. Anti-PD-1-mAb ist in der Lage, die Interaktion der T-Zelle mit PD-L1 und PD-L2 auf der Tumorzelle zu unterbinden und somit die immunsuppressive Wirkung zu stoppen. PD-L2 zeigt eine höhere Affinität zum Rezeptor, wird nicht konstitutiv exprimiert und verstärkt selektiv die Immunantwort von T-Helfer- und zytotoxischen T-Zellen (Shin et al. 2005). Anti-PD-L1-mAb verhindert die Bindung von PD-L1 zum PD-1-Rezeptor und zusätzlich zum Lymphozyten-Aktivierungsantigen CD80 und blockiert damit einen weiteren immuninhibitorischen Signalweg (Keir et al. 2007).

Mit Urelumab (Bristol-Myers Squibb) und Utomilumab (Pfizer) befinden sich auch humanisierte anti-CD137-Antikörper (IgG4 bzw. IgG2 mAb) in klinischen Studien bei soliden Tumoren wie dem malignen Melanom, Nierenzellkarzinom und Ovarialkarzinom. Nach der Behandlung zeigten sich erhöhte Spiegel CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen und eine erhöhte Expression IFN-induzierbarer Gene im peripheren Blut (Sznol et al. 2008). Insbesondere in Kombination mit anderen immunonkologischen Medikamenten oder Radiotherapie ließen sich synergistische Effekte nachweisen (Uno et al. 2006; Shi und Siemann 2006).

Eine Kombination der PD-1/PD-L1-Antikörpertherapie mit anti-CD137-Antikörpern ist vielversprechend. PD-1/PD-L1-Checkpoint-Inhibitoren sind in der Lage, die Unterdrückung der Immunantwort in der Umgebung des Tumors zu neutralisieren. Gleichzeitig gelingt mit der Stimulation durch CD137 eine verstärkte Immunantwort mittels T- und NK-Zellen. Dies kann bildlich als gleichzeitiges „die Bremse loslassen“ und „das Gaspedal drücken“ beschrieben werden (Chester et al. 2016). Versuche in ersten präklinischen Modellen konnten bereits eine synergistische Wirkung der beiden Ansätze zeigen. In Mäuse injizierte CT26-Kolonkarzinomzellen wurden durch die Therapiekombination von Antikörpern gegen PD-1 und CD137 bei allen Tieren abgestoßen und die Zahl tumorinfiltrierender T-Zellen war signifikant erhöht gegenüber der Monotherapie (Shindo et al. 2015). Eine Kombinationstherapie mit anti-PD-L1 und anti-CD137 führte bei ID-8-Ovarialkarzinomen zum verlängerten Überleben und verstärkter T-Zellantwort (Duraiswamy et al. 2013).

Im Rahmen der Zulassungsstudien von Nivolumab beim kleinzelligen Bronchialkarzinom wurde initial ein Zusammenhang zwischen höherer PD-L1-Expression des Tumors und dem Erfolg der Therapie konstatiert (Borghaei et al. 2015). Die neueren Ergebnisse der CheckMate-026-Zulassungsstudie zeigten jedoch, dass die Dauer des progressionsfreien Überlebens nach Therapie mit dem PD-1-Antikörper Nivolumab nicht von der PD-L1-Expression abhängt. Stattdessen korrelierte eine hohe Mutationsrate des Tumors mit besseren Ergebnissen der Therapie. Die Ansprech- (*Response*-) Rate lag in dieser Subgruppe bei 47%, im Gegensatz zu 28% nach einer platin-basierten Chemotherapie (Carbone et al. 2017). Mit einer hohen Mutationsrate steigt

auch die Anzahl der auf der Tumoroberfläche exprimierten Neoantigene, was die Immunogenität und damit das Ansprechen des Tumors auf die Immunmodulationstherapie steigert. In früheren Studien fiel bereits ein besseres Ansprechen bei Rauchern gegenüber Nicht-Rauchern auf. Die Forscher führten dies auf die mutagene Wirkung des Tabakrauchs, eine dadurch erhöhte Mutationszahl des Tumors und damit wiederum eine erhöhte Antigenität der Zellen gegenüber dem Immunsystem zurück (Imielinski et al. 2012). Interessant ist, dass die Tumorzellen von Nicht-Rauchern PD-L1 signifikant höher exprimierten (Azuma et al. 2014).

Da der Darm ähnlich wie die Lunge durch die Nahrungsbestandteile intensiv Mutagenen ausgesetzt ist und damit Darmkrebszellen stärkeren DNA-Veränderungen unterliegen als andere Krebsarten, ist eine Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren auch beim kolorektalen Karzinom vielversprechend. Es konnte gezeigt werden, dass sich ein Mangel an DNA-Mismatch-Reparaturproteinen (MMR-Proteine), welcher die Anzahl an Mutationen in einem Tumor drastisch erhöht, als Prädiktor für den Erfolg einer Pembrolizumab-Therapie beim kolorektalen Karzinom nutzen lässt. Während 62% der Patienten mit MMR-defizienten Tumoren auf die Therapie ansprachen und bei 92% eine *Stable Disease* erreicht werden konnte, zeigte sich bei MMR-stabilen Tumoren kein Ansprechen und nur bei wenigen eine *Stable Disease* (Lee und Le 2016). Ein MMR-Mangel findet sich bei 15-20% der sporadischen Kolonkarzinome und bei fast allen hereditären nichtpolypösen kolorektalen Karzinomen (HNPCC, ca. 5% aller Kolonkarzinome) (Hampel et al. 2005).

Die klinische Bedeutung dieser neuartigen Therapiemöglichkeit von Karzinomen ist erheblich. Neben der Herausforderung, die meist autoimmun bedingten unerwünschten Arzneimittelnebenwirkungen dieser neuen Medikamentenklasse in der klinischen Praxis zu bewältigen, ist es wichtig, ein genaueres Verständnis über die Immunevasionsmechanismen von Tumorzellen zu erlangen. Sollte es gelingen, auf diese Weise Krebserkrankungen dem körpereigenen Immunsystem besser zugänglich zu machen, wäre ein großer Schritt in der onkologischen Therapie gelungen.

## 7 Zusammenfassung

Kostimulatorische Signale spielen beim Zustandekommen einer T-Zell-gebundenen Effektor-Immunantwort eine entscheidende Rolle. Insbesondere in der Onkologie haben sich dazu in jüngerer Zeit wichtige und derzeit noch überwiegend unbeantwortete Fragen aufgetan. Für eine effektive Tumorummunantwort zur Zerstörung von Krebszellen ist es erforderlich, die Zusammenhänge zwischen dem Expressionsverhalten dieser Signalstrukturen auf T-Zellen und Tumorzellen und dessen Auswirkung im Kontext von proliferierenden Tumorzellen und tumorinfiltrierenden Immunzellen in Tumoren wie dem kolorektalen Karzinom genauer aufzuklären. Bislang gibt es für die Signale PD-1 und CD137 in diesem Karzinom nur wenig schlüssige Ergebnisse. Diese Arbeit analysierte ihre Expression sowohl in Primärtumoren des Kolonkarzinoms als auch in drei verschiedenen etablierten humanen Kolonkarzinomen (SW480, SW620 und HT-29) sowohl in vitro als auch in einem xenogenen Tumormodell mit einem humanen Kolonkarzinom in vivo. Dazu wurden zusätzlich unterschiedliche Wachstumsbedingungen in vitro verwendet, die eine nutritive Mangelversorgung im lebenden Organismus widerspiegeln sollten.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass PD-1 und CD137 sowie deren Rezeptoren PD-L1 und CD137L im Kolonkarzinom auf Gen- und Proteinebene exprimiert werden. Zunehmendes Tumorzellwachstum sowie mangelnde Nährstoffversorgung führten zu deutlichen Veränderungen im Expressionsmuster, wobei sich zwischen den Kolonkarzinomen SW480/SW620 und dem Kolonkarzinom HT-29 individuelle Unterschiede aufzeigen ließen. Die Rezeptoren PD-1 und CD137, die im Hinblick auf T-Zell-Kostimulation bis jetzt vorwiegend auf ihr Vorkommen bei tumorinfiltrierenden Lymphozyten untersucht wurden, stehen durch ihren Nachweis auch auf Tumorzellen des humanen Kolonkarzinoms in einem neuen Licht. Die in dieser Arbeit dargestellten Expressionsergebnisse für PD-L1 untermauern bislang vermutete Mechanismen einer Immunevasion. Indem Tumorzellen, in primären Kolontumoren verschiedener UICC-Stadien als auch in mehreren etablierten

humanen Kolonkarzinomen in vitro und in vivo hier nachgewiesen, PD-L1 exprimieren, sind sie in der Lage PD-1-exprimierende T-Lymphozyten in einem Tumorgewebe durch die unterdrückende Signalgebung zu inhibieren. Der immunstimulierende Ligand CD137L wurde dagegen, anders als PD-L1 und abhängig von einer vermuteten Immunreaktion im Tumor versus fehlender Antwort unter artifiziellen Kulturbedingungen, in Tumorsektaten reduziert exprimiert vorgefunden, wohingegen CD137-Protein in den Primärtumoren signifikant verstärkt war. Hierdurch können Karzinome eine CD137L-vermittelte Inflammation und Immunantwort mittels Bindung unterdrücken sowie antiapoptotische und wachstumsfördernde Signalkaskaden zu ihrem Vorteil ausnutzen.

Interessanterweise korrelierten die Expressionsmuster von CD137 und PD-1/PD-L1 stark miteinander, so dass mögliche synergistische Therapieansätze für die Klinik denkbar erscheinen.

Durch die Untersuchungen für diese Arbeit konnten wertvolle Informationen über das Expressionsverhalten der untersuchten kostimulatorischen Signalwege gewonnen werden. Sowohl eine inhibierende PD-1/PD-L1- als auch eine CD137/CD137L-Tumorzell-vermittelte Therapie könnte möglicherweise die Tumorimmunantwort gegen das kolorektale Karzinom stärken und damit das Überleben betroffener Patienten verbessern.

## 8 Literaturverzeichnis

Agata, Y.; Kawasaki, A.; Nishimura, H.; Ishida, Y.; Tsubata, T.; Yagita, H.; Honjo, T. (1996): Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. In: *Int. Immunol.* 8 (5), S. 765–772.

Anderson, Matthew W.; Zhao, Shuchun; Freud, Aharon G.; Czerwinski, Debra K.; Kohrt, Holbrook; Alizadeh, Ash A. et al. (2012): CD137 Is Expressed in Follicular Dendritic Cell Tumors and in Classical Hodgkin and T-Cell Lymphomas. In: *The American Journal of Pathology* 181 (3), S. 795–803. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.05.015.

Antoniou, Anthony; Lovegrove, Richard E.; Tilney, Henry S.; Heriot, Alexander G.; John, Timothy G.; Rees, Myrddin et al. (2007): Meta-analysis of clinical outcome after first and second liver resection for colorectal metastases. In: *Surgery* 141 (1), S. 9–18. DOI: 10.1016/j.surg.2006.07.045.

Azuma, K.; Ota, K.; Kawahara, A.; Hattori, S.; Iwama, E.; Harada, T. et al. (2014): Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected nonsmall-cell lung cancer. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 25 (10), S. 1935–1940. DOI: 10.1093/annonc/mdu242.

Borghaei, Hossein; Paz-Ares, Luis; Horn, Leora; Spigel, David R.; Steins, Martin; Ready, Neal E. et al. (2015): Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. In: *The New England journal of medicine* 373 (17), S. 1627–1639. DOI: 10.1056/NEJMoa1507643.

Broll, K.; Richter, G.; Pauly, S.; Hofstaedter, F.; Schwarz, H. (2001): CD137 expression in tumor vessel walls. High correlation with malignant tumors. In: *Am. J. Clin. Pathol.* 115 (4), S. 543–549. DOI: 10.1309/6U88-357U-UKJ5-YPT3.

Burt, R. W.; DiSario, J. A.; Cannon-Albright, L. (1995): Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk. In: *Annual review of medicine* 46, S. 371–379. DOI: 10.1146/annurev.med.46.1.371.

Carbognin, Luisa; Pilotto, Sara; Milella, Michele; Vaccaro, Vanja; Brunelli, Matteo; Calì, Anna et al. (2015): Differential Activity of Nivolumab, Pembrolizumab and MPDL3280A according to the Tumor Expression of Programmed Death-Ligand-1 (PD-L1): Sensitivity Analysis of Trials in Melanoma, Lung and Genitourinary Cancers. In: *PloS one* 10 (6). DOI: 10.1371/journal.pone.0130142.

Carbone, David P.; Reck, Martin; Paz-Ares, Luis; Creelan, Benjamin; Horn, Leora; Steins, Martin et al. (2017): First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer. In: *The New England journal of medicine* 376 (25), S. 2415–2426. DOI: 10.1056/NEJMoa1613493.

Chen, S. (2000): Rejection of Disseminated Metastases of Colon Carcinoma by Synergism of IL-12 Gene Therapy and 4-1BB Costimulation. In: *Molecular Therapy* 2 (1), S. 39–46. DOI: 10.1006/mthe.2000.0086.

Chester, Cariad; Ambulkar, Siddhant; Kohrt, Holbrook E. (2016): 4-1BB agonism: adding the accelerator to cancer immunotherapy. In: *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 65 (10), S. 1243–1248. DOI: 10.1007/s00262-016-1829-2.

Curran, Michael A.; Geiger, Theresa L.; Montalvo, Welby; Kim, Myoungjoo; Reiner, Steven L.; Al-Shamkhani, Aymen et al. (2013): Systemic 4-1BB activation induces a novel T cell phenotype driven by high expression of Eomesodermin. In: *The Journal of experimental medicine* 210 (4), S. 743–755. DOI: 10.1084/jem.20121190.

Dimberg, Jan; Hugander, Anders; Wågsäter, Dick (2006): Expression of CD137 and CD137 ligand in colorectal cancer patients. In: *Oncol. Rep.* 15 (5), S. 1197–1200.

Driessens, Gregory; Kline, Justin; Gajewski, Thomas F. (2009): Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. In: *Immunological Reviews* 229 (1), S. 126–144. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2009.00771.x.

Droeser, Raoul A.; Hirt, Christian; Viehl, Carsten T.; Frey, Daniel M.; Nebiker, Christian; Huber, Xaver et al. (2013): Clinical impact of programmed cell death

ligand 1 expression in colorectal cancer. In: *European Journal of Cancer* 49 (9), S. 2233–2242. DOI: 10.1016/j.ejca.2013.02.015.

Duraiswamy, Jaikumar; Freeman, Gordon J.; Coukos, George (2013): Therapeutic PD-1 pathway blockade augments with other modalities of immunotherapy T-cell function to prevent immune decline in ovarian cancer. In: *Cancer Research* 73 (23), S. 6900–6912. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1550.

European Medicines Agency (2015a): EMEA/H/C/003820. Summary of the European public assessment report (EPAR) for Keytruda. Online verfügbar unter [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/003820/human\\_med\\_001886.jsp](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/003820/human_med_001886.jsp), zuletzt aktualisiert am 30.07.2015, zuletzt geprüft am 15.02.2016.

European Medicines Agency (2015b): EMEA/H/C/003985. Summary of the European public assessment report (EPAR) for Opdivo. Online verfügbar unter [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/003985/human\\_med\\_001876.jsp](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/003985/human_med_001876.jsp), zuletzt aktualisiert am 02.12.2015, zuletzt geprüft am 15.02.2016.

Freeman, G. J.; Long, A. J.; Iwai, Y.; Bourque, K.; Chernova, T.; Nishimura, H. et al. (2000a): Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. In: *The Journal of experimental medicine* 192 (7), S. 1027–1034.

Freeman, G. J.; Long, A. J.; Iwai, Y.; Bourque, K.; Chernova, T.; Nishimura, H. et al. (2000b): Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. In: *J. Exp. Med.* 192 (7), S. 1027–1034.

Galon, Jérôme; Costes, Anne; Sanchez-Cabo, Fatima; Kirilovsky, Amos; Mlecnik, Bernhard; Lagorce-Pagès, Christine et al. (2006): Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. In: *Science (New York, N.Y.)* 313 (5795), S. 1960–1964. DOI: 10.1126/science.1129139.

Gatalica, Zoran; Snyder, Carrie; Maney, Todd; Ghazalpour, Anatole; Holterman, Daniel A.; Xiao, Nianqing et al. (2014): Programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) in common cancers and their correlation with molecular cancer type. In: *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 23 (12), S. 2965–2970. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0654.

Ghebeh, Hazem; Mohammed, Shamayel; Al-Omair, Abeer; Qattan, Amal; Lehe, Cynthia; Al-Qudaihi, Ghofran et al. (2006): The B7-H1 (PD-L1) T lymphocyte-inhibitory molecule is expressed in breast cancer patients with infiltrating ductal carcinoma: correlation with important high-risk prognostic factors. In: *Neoplasia (New York, N.Y.)* 8 (3), S. 190–198. DOI: 10.1593/neo.05733.

Gordon, Sydney R.; Maute, Roy L.; Dulken, Ben W.; Hutter, Gregor; George, Benson M.; McCracken, Melissa N. et al. (2017): PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. In: *Nature* 545 (7655), S. 495–499. DOI: 10.1038/nature22396.

Hampel, Heather; Frankel, Wendy L.; Martin, Edward; Arnold, Mark; Khanduja, Karamjit; Kuebler, Philip et al. (2005): Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). In: *The New England journal of medicine* 352 (18), S. 1851–1860. DOI: 10.1056/NEJMoa043146.

Harao, Michiko; Forget, Marie-Andrée; Roszik, Jason; Gao, Hui; Babiera, Gildy V.; Krishnamurthy, Savitri et al. (2017): 4-1BB-Enhanced Expansion of CD8(+) TIL from Triple-Negative Breast Cancer Unveils Mutation-Specific CD8(+) T Cells. In: *Cancer immunology research* 5 (6), S. 439–445. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0364.

Hebeisen, Michael (2013): Signaling Mechanisms that Balance Anti-viral, Auto-reactive, and Antitumor Potential of Low Affinity T Cells. In: *J Clin Cell Immunol* 01 (S12). DOI: 10.4172/2155-9899.S12-006.

Heery, Christopher R.; O'Sullivan-Coyne, Geraldine; Madan, Ravi A.; Cordes, Lisa; Rajan, Arun; Rauckhorst, Myrna et al. (2017): Avelumab for metastatic or locally advanced previously treated solid tumours (JAVELIN Solid Tumor). A

phase 1a, multicohort, dose-escalation trial. In: *The Lancet Oncology* 18 (5), S. 587–598. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30239-5.

Hirano, Fumiya; Kaneko, Katsumi; Tamura, Hideto; Dong, Haidong; Wang, Shengdian; Ichikawa, Masao et al. (2005): Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. In: *Cancer Res.* 65 (3), S. 1089–1096.

Ho, Weng Tong; Pang, Wan Lu; Chong, Siew Meng; Castella, Antonio; Al-Salam, Suhail; Tan, Teng Ee et al. (2013): Expression of CD137 on Hodgkin and Reed-Sternberg cells inhibits T-cell activation by eliminating CD137 ligand expression. In: *Cancer Research* 73 (2), S. 652–661. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3849.

Hua, Dong (2012): B7-H1 expression is associated with expansion of regulatory T cells in colorectal carcinoma. In: *WJG* 18 (9), S. 971. DOI: 10.3748/wjg.v18.i9.971.

Hua, Dong; Sun, Jing; Mao, Yong; Chen, Lu-Jun; Wu, Yu-Yu; Zhang, Xue-Guang (2012): B7-H1 expression is associated with expansion of regulatory T cells in colorectal carcinoma. In: *World journal of gastroenterology* 18 (9), S. 971–978. DOI: 10.3748/wjg.v18.i9.971.

Hutloff, A.; Dittrich, A. M.; Beier, K. C.; Eljaschewitsch, B.; Kraft, R.; Anagnostopoulos, I.; Kroczek, R. A. (1999): ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. In: *Nature* 397 (6716), S. 263–266. DOI: 10.1038/16717.

Imielinski, Marcin; Berger, Alice H.; Hammerman, Peter S.; Hernandez, Bryan; Pugh, Trevor J.; Hodis, Eran et al. (2012): Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. In: *Cell* 150 (6), S. 1107–1120. DOI: 10.1016/j.cell.2012.08.029.

Inaguma, Shingo; Lasota, Jerzy; Wang, Zengfeng; Felisiak-Golabek, Anna; Ikeda, Hiroshi; Miettinen, Markku (2017): Clinicopathologic profile, immunophenotype, and genotype of CD274 (PD-L1)-positive colorectal carcinomas. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and*

*Canadian Academy of Pathology, Inc* 30 (2), S. 278–285. DOI: 10.1038/modpathol.2016.185.

Jarnicki, A. G.; Lysaght, J.; Todryk, S.; Mills, K. H. G. (2006): Suppression of Antitumor Immunity by IL-10 and TGF- $\beta$ -Producing T Cells Infiltrating the Growing Tumor: Influence of Tumor Environment on the Induction of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> Regulatory T Cells. In: *The Journal of Immunology* 177 (2), S. 896–904. DOI: 10.4049/jimmunol.177.2.896.

Kaufman, Howard L.; Russell, Jeffery; Hamid, Omid; Bhatia, Shailender; Terheyden, Patrick; D'Angelo, Sandra P. et al. (2016): Avelumab in patients with chemotherapy-refractory metastatic Merkel cell carcinoma. A multicentre, single-group, open-label, phase 2 trial. In: *The Lancet Oncology* 17 (10), S. 1374–1385. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30364-3.

Keir, Mary E.; Francisco, Loise M.; Sharpe, Arlene H. (2007): PD-1 and its ligands in T-cell immunity. In: *Current Opinion in Immunology* 19 (3), S. 309–314. DOI: 10.1016/j.coi.2007.04.012.

Kwon, Byungsuk (2012): Regulation of Inflammation by Bidirectional Signaling through CD137 and Its Ligand. In: *Immune network* 12 (5), S. 176–180. DOI: 10.4110/in.2012.12.5.176.

Lee, Hyeon-Woo; Park, Su-Jung; Choi, Beom K.; Kim, Hyun Hwa; Nam, Kyung-Ok; Kwon, Byoung S. (2002): 4-1BB promotes the survival of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169 (9), S. 4882–4888.

Lee, Valerie; Le, Dung T. (2016): Efficacy of PD-1 blockade in tumors with MMR deficiency. In: *Immunotherapy* 8 (1), S. 1–3. DOI: 10.2217/imt.15.97.

Leitlinienprogramm Onkologie AWMF (2014): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.1.

Ling, V.; Wu, P. W.; Finnerty, H. F.; Bean, K. M.; Spaulding, V.; Fouser, L. A. et al. (2000): Cutting Edge. Identification of GL50, a Novel B7-Like Protein That Functionally Binds to ICOS Receptor. In: *The Journal of Immunology* 164 (4), S. 1653–1657. DOI: 10.4049/jimmunol.164.4.1653.

Lynch, Henry T.; Smyrk, Thomas C.; Watson, Patrice; Lanspa, Stephen J.; Lynch, Jane F.; Lynch, Patrick M. et al. (1993): Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. An updated review. In: *Gastroenterology* 104 (5), S. 1535–1549. DOI: 10.1016/0016-5085(93)90368-M.

Martinet, O. (2000): Immunomodulatory Gene Therapy With Interleukin 12 and 4-1BB Ligand. Long- Term Remission of Liver Metastases in a Mouse Model. In: *Journal of the National Cancer Institute* 92 (11), S. 931–936. DOI: 10.1093/jnci/92.11.931.

Mazzolini, Guillermo; Murillo, Oihana; Atorrasagasti, Catalina; Dubrot, Juan; Tirapu, Iñigo; Rizzo, Miguel et al. (2007): Immunotherapy and immunoescape in colorectal cancer. In: *World J. Gastroenterol.* 13 (44), S. 5822–5831.

Mlecnik, Bernhard; Bindea, Gabriela; Pagès, Franck; Galon, Jérôme (2011a): Tumor immunosurveillance in human cancers. In: *Cancer metastasis reviews* 30 (1), S. 5–12. DOI: 10.1007/s10555-011-9270-7.

Mlecnik, Bernhard; Tosolini, Marie; Kirilovsky, Amos; Berger, Anne; Bindea, Gabriela; Meatchi, Tcho et al. (2011b): Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (6), S. 610–618. DOI: 10.1200/JCO.2010.30.5425.

Motzer, Robert J.; Escudier, Bernard; McDermott, David F.; George, Saby; Hammers, Hans J.; Srinivas, Sandhya et al. (2015): Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. In: *The New England journal of medicine* 373 (19), S. 1803–1813. DOI: 10.1056/NEJMoa1510665.

Nakazawa, Atsushi; Dotan, Iris; Brimnes, Jens; Allez, Matthieu; Shao, Ling; Tsushima, Fumihiko et al. (2004): The expression and function of costimulatory molecules B7H and B7-H1 on colonic epithelial cells. In: *Gastroenterology* 126 (5), S. 1347–1357. DOI: 10.1053/j.gastro.2004.02.004.

Narazaki, Hidehiko; Zhu, Yuwen; Luo, Liqun; Zhu, Gefeng; Chen, Lieping (2010): CD137 agonist antibody prevents cancer recurrence: contribution of

CD137 on both hematopoietic and nonhematopoietic cells. In: *Blood* 115 (10), S. 1941–1948. DOI: 10.1182/blood-2008-12-192591.

Nowossadeck, E.; Haberland, J.; Kraywinkel, K. (2014): Die künftige Entwicklung der Erkrankungszahlen von Darmkrebs und Lungenkrebs. Ergebnisse der Berechnung verschiedener Szenarien für das Jahr 2020. In: *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 57 (1), S. 103–110. DOI: 10.1007/s00103-013-1873-4.

Ohigashi, Yuichiro; Sho, Masayuki; Yamada, Yukishige; Tsurui, Yoshikazu; Hamada, Kaoru; Ikeda, Naoya et al. (2005): Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. In: *Clin. Cancer Res.* 11 (8), S. 2947–2953. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1469.

Pagès, Franck; Kirilovsky, Amos; Mlecnik, Bernhard; Asslaber, Martin; Tosolini, Marie; Bindea, Gabriela et al. (2009): In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (35), S. 5944–5951. DOI: 10.1200/JCO.2008.19.6147.

Palazón, Asís; Martínez-Forero, Iván; Teijeira, Alvaro; Morales-Kastresana, Aizea; Alfaro, Carlos; Sanmamed, Miguel F. et al. (2012): The HIF-1 $\alpha$  hypoxia response in tumor-infiltrating T lymphocytes induces functional CD137 (4-1BB) for immunotherapy. In: *Cancer discovery* 2 (7), S. 608–623. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-11-0314.

Pang, Wan Lu; Ho, Weng Tong; Schwarz, Herbert (2013): Ectopic CD137 expression facilitates the escape of Hodgkin and Reed-Sternberg cells from immunosurveillance. In: *Oncoimmunology* 2 (4), e23441. DOI: 10.4161/onci.23441.

Prado-Garcia, Heriberto; Romero-Garcia, Susana; Puerto-Aquino, Alejandra; Rumbo-Nava, Uriel (2017): The PD-L1/PD-1 pathway promotes dysfunction, but not "exhaustion", in tumor-responding T cells from pleural effusions in lung cancer patients. In: *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 66 (6), S. 765–776. DOI: 10.1007/s00262-017-1979-x.

Qian, Yingying; Pei, Dong; Cheng, Ting; Wu, Changling; Pu, Xiaolin; Chen, Xiaofeng et al. (2015): CD137 ligand-mediated reverse signaling inhibits proliferation and induces apoptosis in non-small cell lung cancer. In: *Medical oncology (Northwood, London, England)* 32 (3), S. 44. DOI: 10.1007/s12032-015-0499-9.

Robert Koch-Institut (2015): Krebs in Deutschland 2011/2012.

Salih, H. R.; Kosowski, S. G.; Haluska, V. F.; Starling, G. C.; Loo, D. T.; Lee, F. et al. (2000): Constitutive expression of functional 4-1BB (CD137) ligand on carcinoma cells. In: *J. Immunol.* 165 (5), S. 2903–2910.

Schubert, Desirée; Bode, Claudia; Kenefeck, Rupert; Hou, Tie Zheng; Wing, James B.; Kennedy, Alan et al. (2014): Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. In: *Nature medicine* 20 (12), S. 1410–1416. DOI: 10.1038/nm.3746.

Schwarz, H.; Blanco, F. J.; Kempis, J. von; Valbracht, J.; Lotz, M. (1996): ILA, a member of the human nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor family, regulates T-lymphocyte proliferation and survival. In: *Blood* 87 (7), S. 2839–2845.

Schwarz, H.; Valbracht, J.; Tuckwell, J.; Kempis, J. von; Lotz, M. (1995): ILA, the human 4-1BB homologue, is inducible in lymphoid and other cell lineages. In: *Blood* 85 (4), S. 1043–1052.

Shi, Wenyin; Siemann, Dietmar W. (2006): Augmented antitumor effects of radiation therapy by 4-1BB antibody (BMS-469492) treatment. In: *Anticancer research* 26 (5A), S. 3445–3453.

Shin, Su M.; Kim, Young H.; Choi, Beom K.; Kwon, Patrick M.; Lee, Hyeon-Woo; Kwon, Byoung S. (2007): 4-1BB triggers IL-13 production from T cells to limit the polarized, Th1-mediated inflammation. In: *Journal of Leukocyte Biology* 81 (6), S. 1455–1465. DOI: 10.1189/jlb.1006619.

Shin, Tahiro; Yoshimura, Kiyoshi; Shin, Takako; Crafton, Emily B.; Tsuchiya, Haruo; Housseau, Franck et al. (2005): In vivo costimulatory role of B7-DC in

tuning T helper cell 1 and cytotoxic T lymphocyte responses. In: *The Journal of experimental medicine* 201 (10), S. 1531–1541. DOI: 10.1084/jem.20050072.

Shindo, Yoshitaro; Yoshimura, Kiyoshi; Kuramasu, Atsuo; Watanabe, Yusaku; Ito, Hideaki; Kondo, Tomoko et al. (2015): Combination immunotherapy with 4-1BB activation and PD-1 blockade enhances antitumor efficacy in a mouse model of subcutaneous tumor. In: *Anticancer research* 35 (1), S. 129–136.

Statistisches Bundesamt (2014): Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2014.

Sun, Yonglian; Chen, Jonathan H.; Fu, Yangxin (2004): Immunotherapy with agonistic anti-CD137: two sides of a coin. In: *Cell. Mol. Immunol.* 1 (1), S. 31–36.

Sznol, M.; F. S. Hodi; K. Margolin; D. F. McDermott; M. S. Ernstoff; J. M. Kirkwood et al. (2008): Phase I study of BMS-663513, a fully human anti-CD137 agonist monoclonal antibody, in patients (pts) with advanced cancer (CA). In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (15), S. 3007.

Taube, Janis M.; Klein, Alison; Brahmer, Julie R.; Xu, Haiying; Pan, Xiaoyu; Kim, Jung H. et al. (2014): Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 20 (19), S. 5064–5074. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3271.

Thompson, R. Houston; Kuntz, Susan M.; Leibovich, Bradley C.; Dong, Haidong; Lohse, Christine M.; Webster, W. Scott et al. (2006): Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. In: *Cancer Research* 66 (7), S. 3381–3385. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4303.

Topalian, Suzanne L.; Drake, Charles G.; Pardoll, Drew M. (2012): Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. In: *Current Opinion in Immunology* 24 (2), S. 207–212. DOI: 10.1016/j.coi.2011.12.009.

Uno, Tomoyasu; Takeda, Kazuyoshi; Kojima, Yuko; Yoshizawa, Hirohisa; Akiba, Hisaya; Mittler, Robert S. et al. (2006): Eradication of established tumors in mice by a combination antibody-based therapy. In: *Nature medicine* 12 (6), S. 693–698. DOI: 10.1038/nm1405.

van der Merwe; Bodian, D. L.; Daenke, S.; Linsley, P.; Davis, S. J. (1997): CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. In: *The Journal of experimental medicine* 185 (3), S. 393–403.

Wang, A.; Wang, H. Y.; Liu, Y.; Zhao, M. C.; Zhang, H. J.; Lu, Z. Y. et al. (2015): The prognostic value of PD-L1 expression for non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis. In: *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 41 (4), S. 450–456. DOI: 10.1016/j.ejso.2015.01.020.

Wang, Qun; Zhang, Pin; Zhang, Qixia; Wang, Xiaoyan; Li, Jianfeng; Ma, Chunhong et al. (2008): Analysis of CD137 and CD137L Expression in Human Primary Tumor Tissues. In: *Croat Med J* 49 (2), S. 192–200. DOI: 10.3325/cmj.2008.2.192.

Wittekind, Christian (2010): TNM. Klassifikation maligner Tumoren. 7. Aufl. Somerset: Wiley-Blackwell.

Wu, Changping; Zhu, Yibei; Jiang, Jingting; Zhao, Jiemin; Zhang, Xue-Guang; Xu, Ning (2006): Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. In: *Acta histochemica* 108 (1), S. 19–24. DOI: 10.1016/j.acthis.2006.01.003.

Wu, Pin; Wu, Dang; Li, Lijun; Chai, Ying; Huang, Jian (2015): PD-L1 and Survival in Solid Tumors: A Meta-Analysis. In: *PloS one* 10 (6), S. e0131403. DOI: 10.1371/journal.pone.0131403.

Yang, Haitao; Chen, Huijuan; Luo, Shuimei; Li, Lina; Zhou, Sijing; Shen, Ruifen et al. (2017): The correlation between programmed death-ligand 1 expression and driver gene mutations in NSCLC. In: *Oncotarget* 8 (14), S. 23517–23528. DOI: 10.18632/oncotarget.15627.

Ye, Qunrui; Song, De-Gang; Poussin, Mathilde; Yamamoto, Tori; Best, Andrew; Li, Chunsheng et al. (2014): CD137 accurately identifies and enriches for naturally occurring tumor-reactive T cells in tumor. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 20 (1), S. 44–55. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0945.

Yin, H.; Liao, C. G.; Wang, Y. Q.; Li, Z.; Fan, L. L.; Qian, M. L.; Lu, N. (2017): The expression of programmed death receptor 1 in non-small cell lung cancer and its clinicopathological features and prognosis showed a connection with epidermal growth factor receptor gene mutations. In: *Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]* 39 (6), S. 419–423. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2017.06.004.

Yurgelun, Matthew B.; Kulke, Matthew H.; Fuchs, Charles S.; Allen, Brian A.; Uno, Hajime; Hornick, Jason L. et al. (2017): Cancer Susceptibility Gene Mutations in Individuals With Colorectal Cancer. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 35 (10), S. 1086–1095. DOI: 10.1200/JCO.2016.71.0012.

Zhang, Yan; Luo, Yang; Qin, Shao-Lan; Mu, Yi-Fei; Qi, Yang; Yu, Min-Hao; Zhong, Ming (2016): The clinical impact of ICOS signal in colorectal cancer patients. In: *Oncoimmunology* 5 (5), e1141857. DOI: 10.1080/2162402X.2016.1141857.

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Repräsentativer Western-Blot der PD-1-Proteinexpression in SW480 Kolonkarzinomzellen.....	21
Abb. 2: Repräsentativer Western-Blot der PD-1-Proteinexpression in SW620 Kolonkarzinomzellen.....	22
Abb. 3: Repräsentativer Western-Blot der PD-1-Proteinexpression in HT-29 Kolonkarzinomzellen.....	23
Abb. 4: Darstellung der FACS-Ergebnisse zur PD-1-Expression in SW480, SW620 und HT-29 Kolonkarzinomzellen .....	24
Abb. 5: Darstellung der PD-1-Genexpression in SW480, SW620 und HT-29 Kolonkarzinomzellen .....	24
Abb. 6: Repräsentativer Western-Blot der PD-L1-Proteinexpression in SW480 Kolonkarzinomzellen.....	25
Abb. 7: Repräsentativer Western-Blot der PD-L1-Proteinexpression in SW620 Kolonkarzinomzellen.....	26
Abb. 8: Repräsentativer Western-Blot der PD-L1-Proteinexpression in HT-29 Kolonkarzinomzellen.....	27
Abb. 9: Darstellung der FACS-Ergebnisse zur PD-L1-Expression in SW480, SW620 und HT-29 Kolonkarzinomzellen .....	28
Abb. 10: Repräsentativer Western-Blot der CD137-Proteinexpression in SW480 Kolonkarzinomzellen.....	29
Abb. 11: Repräsentativer Western-Blot der CD137-Proteinexpression in SW620 Kolonkarzinomzellen.....	30
Abb. 12: Repräsentativer Western-Blot der CD137-Proteinexpression in HT-29 Kolonkarzinomzellen.....	30
Abb. 13: Darstellung der FACS-Ergebnisse zur CD137-Expression in SW480, SW620 und HT-29 Kolonkarzinomzellen .....	31
Abb. 14: Darstellung der CD137-Genexpression in SW480, SW620 und HT-29-Kolonkarzinomzellen .....	32
Abb. 15: Repräsentativer Western-Blot der CD137L-Proteinexpression in SW480 Kolonkarzinomzellen.....	33

Abb. 16: Repräsentativer Western-Blot der CD137L-Proteinexpression in SW620 Kolonkarzinomzellen.....	34
Abb. 17: Repräsentativer Western-Blot der CD137L-Proteinexpression in HT-29 Kolonkarzinomzellen.....	34
Abb. 18: Darstellung der FACS-Ergebnisse zur CD137L-Expression in SW480, SW620 und HT-29 Kolonkarzinomzellen .....	35
Abb. 19: Darstellung der CD137L-Genexpression in SW480, SW620 und HT-29 Kolonkarzinomzellen .....	36
Abb. 20: PD-1, PD-L1, CD137 und CD137L Genexpression in subkutanen xenogenen SW480-Kolonkarzinomen in Balb/c-Nacktmäusen (n = 5).....	37
Abb. 21: PD-1, PD-L1, CD137 und CD137L Genexpression in subkutanen xenogenen SW480-Kolonkarzinomen in Balb/c-Nacktmäusen (n = 5).....	38
Abb. 22: CD137, CD137L, PD-1 und PD-L1 Genexpression in subkutanen xenogenen HT-29 Kolonkarzinomen in Balb/c-Nacktmäusen (n = 7).....	39
Abb. 23: PD-1, PD-L1, CD137 und CD137L Genexpression im Kolonkarzinom, bezogen auf fetale Kolon-Standardzellen (FHC) (n <sub>UICC III</sub> = 6, n <sub>UICC III/IV</sub> = 8). ....	41
Abb. 24: Pearson-Korrelation zwischen CD137 und PD-1/PD-L1 Genexpression im kolorektalen Karzinom, bezogen auf Kolon-Normalgewebe-Zellen (n = 14).	42

## 10 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms (Wittekind 2010) .....	3
Tab. 2: Verwendete Sonden für die TaqMan-RT-qPCR .....	12
Tab. 3: Verwendete Antikörper für die Western-Blot-Analyse .....	13
Tab. 4: Verwendete Antikörper für die FACS-Analyse .....	13
Tab. 5: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen .....	14
Tab. 6: Inkubationsmedien .....	15

## Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Professor Dr. C.-T. Germer, Direktor der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Ohne seine bereitwillige Unterstützung und Zurverfügungstellung wäre es nicht möglich gewesen, diese Arbeit zu erstellen.

Außerdem gilt mein ausdrücklichster Dank Frau Professor Dr. A. M. Waaga-Gasser und Herrn Professor Dr. M. Gasser für die wissenschaftliche und auch persönliche Begleitung während der experimentellen Arbeit sowie der Auswertung der Daten. Sehr dankbar bin ich für die hilfreichen Hinweise zur wissenschaftlichen Arbeit und die Korrekturen der Promotionsarbeit.

Ebenfalls danke ich Frau Dr. T. Grimmig für die Anleitung in der Laborarbeit, der Analyse der Daten und letztendlich dem Verfassen der Promotionsarbeit. Sie trägt einen großen Anteil daran, dass die Experimente strukturiert und erfolgreich durchgeführt werden konnten.

Ich danke weiterhin Frau Dr. R. Mönch und Frau Rhodes für die geduldige Anleitung und Mithilfe bei der Laborarbeit sowie dem gesamten Team der molekularen Onkoimmunologie für die sehr angenehme Zusammenarbeit.