

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Prof. h.c. A. Thiede
Abteilung für Molekulare Onkoimmunologie
Leiterin: Frau Professor Dr. rer. nat. A. M. Waaga-Gasser

**Untersuchungen zur Anti-Tumor-Immunantwort unter Berücksichtigung der
Bedeutung regulatorischer T-Zellen bei Patienten mit kolorektalem Karzinom**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Nicolai Alexander Schramm
aus Petersberg

Würzburg, Juli 2006

Referentin: Frau Prof. Dr. rer. nat. A. M. Waaga-Gasser

Koreferent: Prof. Dr. med. M. Böck

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 5. März 2007

Der Promovend ist Arzt.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Fragestellung	10
3. Material und Methoden	11
3.1 Patienten	11
3.2 Cytospins	12
3.2.1 Allgemeines	
3.2.2 Immunzytochemische Einfachfärbung der Cytospins	
3.2.3 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung der Cytospins	
3.3 Immunhistochemische Färbung von Tumorgewebe	15
3.4 Stimulation von Lymphozyten aus dem peripher-venösen Blut von Karzinompatienten mit synthetischen p53-Peptiden	15
3.4.1 Synthetische p53-Peptide	
3.4.2 ELISPOT Assay (IL-10)	
3.4.3 IFN- γ -ELISA	
3.5 ELISA zum Nachweis von zirkulierenden Anti-p53-Antikörpern	19
3.6 RNA-Extraktion	19
3.7 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) zur Detektion von p53-Mutationen	20
3.8 Real-Time-PCR zum Nachweis Th2-spezifischer Gene im Tumorgewebe	21
3.9 Statistik	22
4. Ergebnisse	23
4.1 Immunhistochemische Färbung gegen p53 im Tumorgewebe	23
4.2 Immunzytochemische Färbung von Cytospins zum Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinom	24

4.3	Humorale Immunantwort bei Patienten mit kolorektalem Karzinom	28
4.3.1	Cytospins	
4.3.2	Spezifische humorale Immunantwort gegen p53	
4.3.3	Zusammenhang zwischen der Akkumulation von p53-Protein im Tumor und dem Nachweis von Antikörpern gegen p53 im Serum	
4.4	Zelluläre Immunantwort bei Patienten mit kolorektalem Karzinom	30
4.4.1	Cytospins	
4.4.2	Nachweis von CD ⁺ CD25 ⁺ Lymphozyten aus dem peripher- venösen Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinom (Cytospins)	
4.5	p53-spezifische T-Helfer-Zell-Reaktivität nach Stimulierung von Patienten-Lymphozyten mit synthetischen p53-Peptiden	35
4.6	Mutationen von p53 und ihre Relation zur p53-spezifischen Immunantwort	37
4.7	Nachweis Th2-spezifischer Genexpression bei tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL)	38
4.8	Zusammenfassung der Ergebnisse	40
	5. Beantwortung der Fragen	41
	6. Diskussion	43
6.1	Akkumulation von p53 im Tumorgewebe	43
6.2	Zirkulierende p53-positive Zellen im Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinom	43
6.3.	Allgemeine und spezifisch gegen p53 gerichtete humorale Immunantwort	44
6.4	Zelluläre Immunantwort bei Patienten mit kolorektalem Karzinom	45
6.4.1	Zelluläre Immunantwort im peripheren Blut	
6.4.2	Nachweis von CD4 ⁺ CD25 ⁺ Zellen im peripheren Blut	
6.4.3	p53-spezifische T-Helfer-Zell-Immunität	
6.5	Zusammenhang zwischen Mutationen im p53-Gen und der Immunantwort gegen p53	48

6.6 Expression Th2-spezifischer Gene durch tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL)	48
6.7 Kritik	49
6.8 Schlussfolgerung	49
6.9 Zukünftige therapeutische Optionen/Ausblick	51
7. Zusammenfassung	52
8. Literaturverzeichnis	54
9. Anhang	61
Abkürzungsverzeichnis	61
Danksagung	
Lebenslauf	

1. Einleitung

Das kolorektale Karzinom ist der häufigste maligne Tumor des Gastrointestinaltraktes und das dritthäufigste Karzinom bei Männern sowie das zweithäufigste bei Frauen in den Industrienationen (1). Die Pathogenese dieses Malignoms wird mit der Adenom-Karzinom-Sequenz erklärt (2-5). Dabei entsteht durch Akkumulation genetischer Veränderungen aus Normalgewebe zunächst ein Adenom und schließlich ein Karzinom. Bei diesen Mutationen handelt es sich entweder um Inaktivierungen von Tumorsuppressorgenen oder Aktivierungen von Onkogenen. Die einzelnen Mutationen treten an bestimmten Stellen im Verlauf der Tumorprogression auf; so führt die Mutation des Tumorsuppressorgenes p53 zum Übergang vom späten Adenom zum Karzinom (Abb. 1).

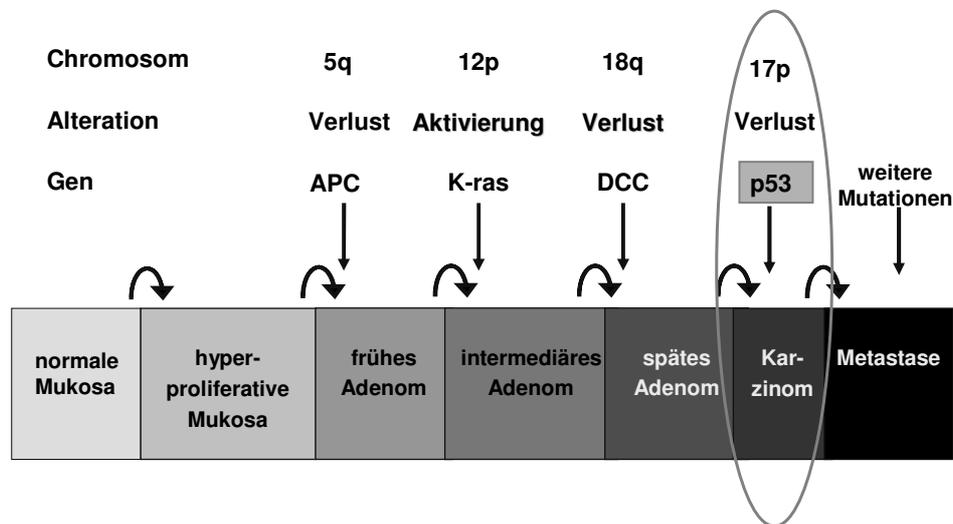


Abb. 1: Pathogenese des kolorektalen Karzinoms durch die Adenom-Karzinom-Sequenz. Die Tumorprogression kommt durch Akkumulation von Mutationen zustande. Bei diesen Veränderungen handelt es sich um Aktivierungen von Onkogenen wie K-ras oder um Inaktivierungen von Tumorsuppressorgenen wie p53. Durch Mutation von p53 kommt es zum Übergang in ein invasives Karzinom.

Die vollständige chirurgische Resektion (R0-Resektion) des Primärtumors ist unverändert die Basis der Therapie des kolorektalen Karzinoms. Weitere Säulen der klassischen Therapie sind neoadjuvante oder adjuvante Chemotherapien, z. B. mit 5-FU und Folinsäure, und die Strahlentherapie, welche prä-, intra- oder postoperativ erfolgen kann.

Trotz radikaler chirurgischer Tumorresektion treten häufig Karzinomrezidive auf. In dem von uns untersuchten Patientenkollektiv (n=51) erlitten in einem Beobachtungszeitraum von drei Jahren 18% der Patienten trotz anfänglicher R0-Resektion des Primärtumors ein Tumorrezidiv. Dies könnte zumindest teilweise durch eine Suppression der körpereigenen Anti-Tumor-Immunantwort erklärt werden. Wenn es gelänge, die Mechanismen aufzuklären, die der ineffektiven Anti-Tumor-Immunantwort bei Patienten mit kolorektalem Karzinom zu Grunde liegen, wäre dies hilfreich für die Entwicklung neuer spezifischer Immuntherapien, die zukünftig neben den klassischen Therapien des kolorektalen Karzinoms eine wichtige Rolle spielen könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde p53 als tumorassoziiertes Antigen (TAA) gewählt und die p53-spezifische Immunantwort bei Patienten mit kolorektalem Karzinom näher analysiert.

Mutationen im p53-Gen gehören zu den am häufigsten in der Literatur genannten somatischen Genveränderungen bei humanen Malignomen. Diese lassen sich insgesamt bei mehr als 50% aller Malignome nachweisen. Die Frequenz von Mutationen des p53-Genes ist gesteigert bei Darm-, Magen-, Bronchial-, und Brustkrebs, aber auch bei Leukämien, Osteosarkomen, Ovarialkarzinomen und Hirntumoren. Bei kolorektalen Karzinomen finden sich p53-Mutationen sogar in etwa 60% der Fälle (6). Die Mutationen führen zur Überexpression und Akkumulation von p53-Protein im Cytosol. Daher gilt p53 als vielversprechender Angriffspunkt für Immuntherapien gegen Krebs (6, 7).

p53 ist ein Tumorsuppressorgen und wird häufig als „Wächter des Genoms“ bezeichnet. Wild-type-p53-Protein (wt-p53-Protein) reguliert normalerweise den Zellzyklus (8). Wenn es zu einem DNA-Schaden kommt, akkumuliert es im Zellkern und verursacht einen Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase. Die aufgetretenen Schäden werden dann

repariert. Ist dies nicht möglich, kann p53 Apoptose (programmierter physiologischer Zelltod) induzieren. So wird normalerweise die Expansion von abnormalen, tumorigenen Zellen verhindert (9, 10). In Tumorzellen ist das p53-Gen selbst häufig mutiert und funktionslos. In der Folge kommt es rasch zur Anhäufung von genetischen Veränderungen und dadurch zur malignen Entartung.

In normalen Zellen wird p53-Protein in extrem niedriger Konzentration nur im Zellkern exprimiert. Dies ist darauf zurückzuführen, dass neu synthetisiertes wt-p53-Protein Ubiquitin/Proteasom-vermittelt hochsensitiv dem Abbau im MDM2-Stoffwechselweg unterliegt (11).

Während der Entwicklung wird p53-Antigen im Thymus exprimiert und kann dort die negative Selektion von Anti-p53-reaktiven CD8⁺ T-Lymphozyten bewirken. Allerdings kommt es nicht zu einer vollständigen Depletion p53-spezifischer T-Zellen, wie in einigen Studien gezeigt wurde (12, 13). Daher behält der Körper prinzipiell das Potential, eine gegen p53-Protein gerichtete Immunantwort zu induzieren. Voraussetzung hierfür wäre, dass p53 als Autoantigen präsentiert werden kann. In gesunden erwachsenen Individuen bleibt p53-Protein allerdings für das Immunsystem unsichtbar oder „kryptisch“, weil es nicht im Zytosol vorliegt und folglich nicht auf der Oberfläche parenchymaler Zellen präsentiert wird (14, 15).

In Tumorzellen finden sich dagegen hohe Spiegel von p53 im Zytosol, das nach Prozessierung im Proteasom auf der Oberfläche dieser malignen Zellen präsentiert werden kann. Dort könnten die präsentierten p53-Epitope MHC-(*Major-Histocompatibility-Complex*)-Klasse-I-restringiert von zytotoxischen CD8⁺ T-Lymphozyten (CTL) erkannt werden (Abb.2).

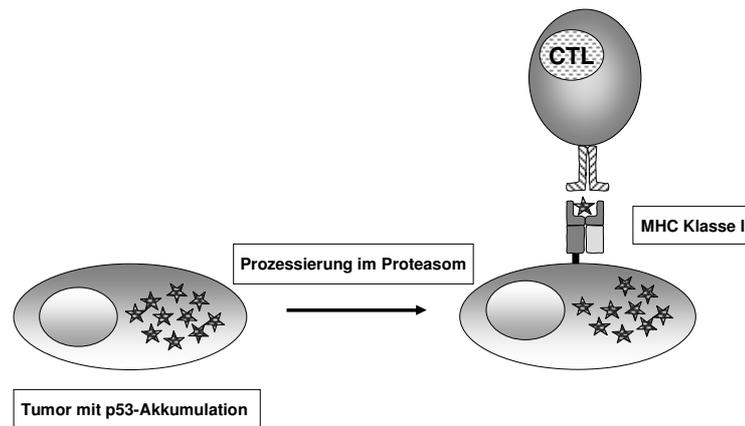


Abb.2: MHC-Klasse-I-restringierte Erkennung von durch Tumorzellen präsentierten p53-Epitopen durch zytotoxische T-Lymphozyten (CTL).

Weiterhin werden große Mengen an mutiertem p53-Protein durch nekrotische Anteile des wachsenden Tumors freigesetzt. Das freigesetzte Protein kann von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie B-Lymphozyten, Makrophagen oder dendritischen Zellen (DC) aufgenommen, prozessiert und schließlich präsentiert werden. Diese Vorgänge sind MHC-Klasse-II- und MHC-Klasse-I-restringiert.

MHC-Klasse-II-restringierte $CD4^+$ T-Zell-Immunantworten auf wt- und mutiertes p53 wurden von Fedoseyeva et al. am Beispiel von gesunden und tumortragenden Mäusen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass auch in der Peripherie des adulten Immunsystems T-Lymphozyten vorhanden waren, die gegen bestimmte wt-p53-Determinanten gerichtet waren. Durch Immunisierung mit p53-Peptiden gelang es, diese Zellen spezifisch zu aktivieren. Die genauere Analyse ergab, dass die T-Lymphozyten entweder mutierte Abschnitte von p53 oder ehemals kryptische selbst-p53-Determinanten erkannten. Welche p53-Peptide erkannt wurden, hing auch vom Stadium der Tumorgenese ab (16). Folglich kann eine durch T-Lymphozyten vermittelte Immunantwort gegen p53 induziert werden, wenn in Tumorzellen neue p53-

Determinanten nach Prozessierung von mutiertem p53-Protein entstehen, obwohl wt-p53-Protein in gesunden Zellen normalerweise vom Immunsystem ignoriert wird.

Auch andere Studien an Nagern konnten die Immunogenität von p53 während der Tumorgenese und die dadurch bedingte Induktion von CD4⁺ (T-Helfer-Zellen) und CD8⁺ (zytotoxische und Suppressor-T-Zellen) T-Zell-Immunantworten belegen. Obwohl eine Immunantwort gegen p53 aus Tumorzellen induziert wird, ist diese offensichtlich nicht ausreichend genug, um Tumoren zu eradizieren. In Mausmodellen wurden bemerkenswerterweise nach Immunisierung mit wt-p53 p53-spezifische T-Helfer (Th)-Zellen und zytotoxischen T-Zellen (CTL) gebildet, die eine Abstoßung des Tumorgewebes bewirken konnten (17, 18). Diese Ergebnisse stützen die Vermutung, dass gegen p53 gerichtete T-Lymphozyten, die prinzipiell zur Tumorerstörung fähig wären, ohne Impfung entweder nie aktiviert werden oder aber von anderen Th-Zellen supprimiert werden.

CD4⁺ Th-Zellen können in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden: Th-Zellen vom Typ 1 (Th1) sezernieren nach Antigenstimulation Zytokine wie Interleukin-2 (IL-2) oder Interferon- γ (IFN- γ); dagegen sezernieren Th-Zellen vom Typ 2 (Th2) nach Antigenstimulation Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-10 (19, 20). Weiterhin unterscheiden sich die beiden Zelltypen in ihrer Suszeptibilität für Antigenstimulation, in ihrer Abhängigkeit für kostimulatorische Signale durch APC und in ihrer Spezifität für Peptid-Determinanten (21). Die Th1-Antwort ist inflammatorisch und dient der Bekämpfung von fremden Komponenten wie Bakterien, Pilzen oder Viren. Außerdem führt sie zur Abstoßung von transplantiertem Gewebe. Die Th2-Immunantwort bewirkt dagegen eher Immuntoleranz gegenüber Selbst-Komponenten. Die beiden Typen der Th-Immunantworten verhalten sich antagonistisch. Durch die von Th1-Zellen ausgeschütteten Zytokine wird der Th2-Typ inhibiert und umgekehrt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Bipolarität eine wichtige Rolle in der Regulation von Immunantworten *in vivo* spielt (22).

Auf die Tumorummunologie übertragen würde ein Überwiegen der Th1-Antwort zu einer Zerstörung oder zumindest Bekämpfung des Malignoms führen, ein Überwiegen der Th2-Antwort dagegen eher die Toleranz des Tumors durch das Immunsystem bewirken.

Regulatorische T(T_{reg})-Zellen stellen eine Subpopulation der Th2-Zellen dar, die u.a. durch die konstitutive Expression der α -Untereinheit des IL-2-Rezeptors (CD25) und den Transkriptionsregulator Foxp3 näher charakterisiert sind. Die Funktion dieser Zellen ist die Suppression von immunologischen Reaktionen. Sie scheinen die Entstehung von Autoimmunerkrankungen und Entzündungen verhindern zu können. Im Bereich der Tumorummunologie wird vermutet, dass die T_{reg} -Lymphozyten für die Unterdrückung einer effektiven Anti-Tumor-Immunantwort mitverantwortlich sind.

Wie oben ausgeführt stützen einige Daten die Hypothese, dass gegen p53 gerichtete T-Lymphozyten bei Tumorpatienten nicht aktiviert werden oder durch bestimmte Subpopulationen von T-Zellen wie T_{reg} -Zellen supprimiert werden. So publizierten Fedoseyeva et al. die Ergebnisse von Untersuchungen an Mäusen mit J774-Sarkomen: Die große Mehrheit von p53-spezifischen T-Zellen der Mäuse sezernierte die Th2-Zytokine IL-4, IL-5 sowie IL-10 (16). Diese Beobachtungen legen nahe, dass bei den an einem Sarkom erkrankten Mäusen p53 zwar immunogen ist und spezifisch gegen p53 gerichtete T-Zellen gebildet werden. Allerdings führen die präsentierten p53-Determinanten in diesem Modell zur Polarisierung in Richtung einer Th2-Immunantwort, was erklären könnte, dass der Tumor toleriert wird und nicht durch andere T-Zell-Populationen attackiert wird. Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob die bevorzugte Aktivierung von Th2-Zellen durch p53 ein allgemeines Prinzip darstellt, d.h., auch auf andere Tumoren übertragbar ist und vor allem auch für humane Malignome gilt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die p53-spezifische Immunantwort bei Patienten mit kolorektalem Karzinom untersucht. Auch bei diesem Karzinom konnten Mutationen des p53-Genes sehr häufig nachgewiesen werden (23). In der Vergangenheit konzentrierten sich die Untersuchungen vor allem auf die Identifizierung von mit MHC-Klasse-I präsentierten p53-Peptiden, die durch $CD8^+$ CTL erkannt werden können (24).

Erst seit einigen Jahren häuft sich die Evidenz für die zentrale Rolle der $CD4^+$ Th-Zellen in der Tumorummunologie (25). In Untersuchungen an Mäusen konnte gezeigt werden, dass p53-spezifische Th-Zellen p53-spezifische CTL unterstützen und dadurch das Wachstum von p53-überexprimierenden Tumoren verzögern können (26).

Normalerweise exprimieren solide Tumoren wie das kolorektale Karzinom keine MHC-Klasse-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Daher können sie von CD4⁺ Th-Lymphozyten nicht direkt erkannt und bekämpft werden (25). Vielmehr werden vom Karzinom freigesetzte TAA von professionellen APC (DC, Makrophagen, B-Lymphozyten) aufgenommen, prozessiert und den CD4⁺ Zellen MHC-Klasse-II-vermittelt präsentiert. Die CD4⁺ Zellen können in der Folge B-Lymphozyten zur Produktion von Antikörpern anregen, spezifisch gegen den Tumor gerichtete CTL aktivieren und auch Effektorzellen des angeborenen, unspezifischen Immunsystems aktivieren. Dazu gehören natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Eosinophile sowie Makrophagen (27-30).

Die bei Patienten mit primärem kolorektalem Karzinom detektierten p53-spezifischen Th-Immunantworten reichen offensichtlich nicht aus, um das Tumorwachstum zu kontrollieren bzw. den Tumor komplett zu eradizieren. Sonst wären keine aufwendigen chirurgischen Interventionen nötig und es würde weniger häufig zu Karzinomrezidiven kommen. In der Literatur wurden zahlreiche sogenannte Tumor-*Escape*-Mechanismen beschrieben, die das Scheitern der Anti-Tumor-Immunantwort erklären könnten. Zu diesen Mechanismen zählen u.a. der Verlust von Tumorantigenen (31, 32), der Verlust oder die Herunterregulierung von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche der Tumorzellen, wodurch sich keine suffiziente CTL-Immunität ausbilden kann (33-35), und der Mangel an Kostimulation, der eine Anergie der T-Zellen zur Folge haben kann (36, 37).

Möglicherweise induzieren von Tumorzellen freigesetzte TAA wie p53 bevorzugt die Produktion von Th2-Zytokinen wie IL-10 durch Th2-Zellen und regulatorische T(T_{reg})-Lymphozyten (Abb. 3). Es konnte gezeigt werden, dass dadurch eine effektive Tumorabwehr in vielfältiger Weise behindert wird. So führen erhöhte IL-10-Spiegel zu mangelhafter Differenzierung und Funktion von DC (38, 39).

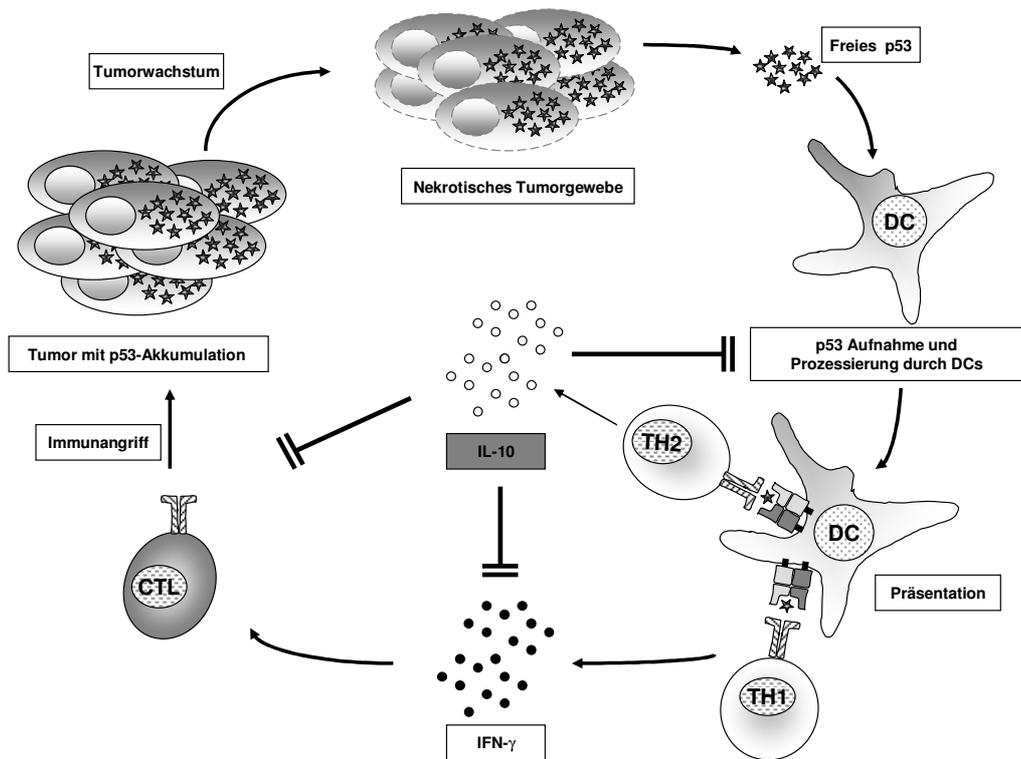


Abb. 3: Möglichkeiten der Differenzierung von p53-spezifischen T-Helfer-(Th)-Zellen. Nach maligner Transformation kommt es zur p53-Akkumulation im Zytosol der Tumorzellen. Durch nekrotischen Zerfall von Anteilen des expandierenden Tumors wird p53-Protein freigesetzt. Dieses wird von antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie dendritischen Zellen (DC) aufgenommen, prozessiert und zusammen mit MHC-Klasse-II-Molekülen CD4⁺ Th-Zellen präsentiert. Prinzipiell können sich die Th-Zellen in zwei Richtungen differenzieren. Th1-Zellen produzieren inflammatorische Zytokine wie IFN- γ und führen u.a. durch Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen (CTL) zum Immunangriff mit eventueller Zerstörung des Tumors. Th2-Zellen produzieren dagegen inhibitorische Zytokine wie IL-10. Dies hat eine Toleranz des Tumors zur Folge. IL-10 bewirkt eine Hemmung des Th1-Typs der Immunantwort, behindert die Differenzierung und Funktion von DC und verhindert so den Immunangriff. Die dieser Arbeit zu Grunde liegende Hypothese besagt, dass p53-Determinanten, die eine IL-10-Produktion bewirken, bei Patienten mit kolorektalem Karzinom jene, die zur IFN- γ -Produktion führen, überwiegen.

Um die oben genannte Hypothese genauer zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die p53-spezifische Th-Zell-Immunität bei 51 Patienten mit primärem kolorektalem Karzinom in verschiedenen UICC-Stadien analysiert. Zunächst wurde immunhistochemisch untersucht, wie stark p53 im Tumorgewebe exprimiert wird und ob sich p53-positive Zellen im peripheren Blut der Patienten detektieren lassen. Zur Analyse der humoralen Immunität wurden zum einen PBL aus dem peripheren Blut

immunzytochemisch gefärbt, zum anderen die p53-Antikörperproduktion im Serum der Patienten gemessen. Die zelluläre Immunität im Blut wurde ebenfalls mittels Immunzytochemie untersucht. Zum Nachweis von CD4⁺CD25⁺ Zellen, welche auf eine Th2-Antwort hindeuten, wurden Cytospins für die Immunfluoreszenz angefertigt.

Wir maßen die p53-spezifische IFN- γ -(Th1-Zytokin) und IL-10-Produktion (Th2-Zytokin) von T-Zellen, die mit synthetischen wt-p53-Peptiden stimuliert worden waren. Außerdem analysierten wir, welche p53-Determinanten zur Differenzierung in die Th1- oder Th2-Richtung führten. Wenn sich eine Dominanz der IL-10-Produktion nachweisen ließe, so spräche dies dafür, dass T_{reg}-Zellen direkt an der Modulation der Anti-Tumor-Immunantwort teilnehmen. Weiterhin wurde die Expression von Th2-spezifischen Genen im Tumorgewebe gemessen, weil Studien belegen, dass eine Infiltration des Tumors mit Th2-Zellen mit einer höheren Rate an Tumorrezidiven und einer Reduktion des krankheitsfreien Überlebens assoziiert ist (40). Schließlich wurde Tumorgewebe molekularbiologisch auf das Vorliegen von p53-Mutationen untersucht. Alle Ergebnisse wurden in Bezug zu den UICC-Stadien der Patienten gesetzt.

2. Fragestellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Sind p53-positive Zellen im peripheren Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinom nachweisbar?
- 2) Finden sich bei den Patienten Antikörper gegen p53 im Serum? Besteht eine Korrelation zwischen Antikörperproduktion und UICC-Stadium?
- 3) Besteht eine Korrelation zwischen der Zahl der CD4⁺CD25⁺ Zellen im peripheren Blut und dem UICC-Stadium der Patienten?
- 4) Induziert Stimulation mit synthetischen p53-Peptidfragmenten bei peripheren Blutlymphozyten (PBL) der Patienten eher eine Th1-Antwort (IFN- γ -Produktion) oder eine Th2-Antwort (IL-10-Produktion)?
- 5) Korreliert die Expression von T_{reg}-spezifischen Genen im Tumor mit dem UICC-Stadium der Patienten?

3. Material und Methoden

3.1 Patienten

In dieser Arbeit wurden insgesamt 51 Patienten, bei denen ein primäres kolorektales Karzinom diagnostiziert wurde, untersucht. Es wurde die Zustimmung des lokalen Ethik-Komitees eingeholt. Alle Patienten gaben nach ausführlicher Aufklärung ihr Einverständnis im Sinne eines *informed consent*.

Den Patienten wurde präoperativ peripher-venöses Blut entnommen; perioperativ wurde Tumorgewebe zur immunhistologischen Aufarbeitung gewonnen.

Periphere Blutlymphozyten (PBL) wurden entsprechend der Vorgaben des Herstellers (Nycomed Pharma, Oslo, Norwegen) mit „Lymphoprep“ isoliert.

PBL, Sera oder Tumorgewebe wurden sofort weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

Die Karzinome wurden nach Lokalisation, UICC-Stadium (Staging) und Differenzierung (Grading) beurteilt (Tab. 1). Außerdem wurden Angaben zu Alter und Geschlecht der Patienten in einer Datenbank gespeichert.

Tab. 1. UICC-Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms (überarbeitete Version von 2002)

	M0			M1
	pN0	pN1	pN2	
pT1	St. I	St. III A	St. III C	St. IV
pT2				
pT3	St. II A	St. III B		
pT4				

3.2 Cytospins

3.2.1 Allgemeines

Von 14 Patienten mit primärem kolorektalem Karzinom und von drei gesunden Kontrollpersonen wurde präoperativ peripher-venöses Blut entnommen, um daraus Cytospins anzufertigen. Die PBL wurden wie oben beschrieben isoliert. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80°C. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in GIBCO™-RPMI-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) gelöst.

Die gelösten Zellen wurden mit einer Shandon Cytospin 2 Zellzentrifuge (Thermo Shandon, Pittsburgh, USA) auf Adhäsionsobjektträger (Marienfeld, Lauda-Königshofen) aufgebracht.

Die Zentrifuge besteht aus zwölf Trichtern, die jeweils mit einem Objektträger verbunden sind. Zwischen dem Trichter und dem Objektträger befindet sich ein Filterpapier mit einer zentralen Öffnung. 100µl der Zellsuspension wurden in jeden Trichter pipettiert und für eine Minute bei 550 rpm zentrifugiert.

Um die Dichte der Zellen auf den Objektträgern besser abschätzen zu können, wurden die ersten Cytospins von jedem Patienten direkt nach dem Zentrifugieren nativ unter dem Mikroskop begutachtet. Falls die Zellen sich überlappten, wurden sie weiter verdünnt; lagen sie nicht dicht genug, wurde die Suspension stärker konzentriert.

Die Cytospins trockneten über Nacht bei Raumtemperatur. Danach wurden sie in Alufolie eingewickelt und bei -20°C im Kühlschrank gelagert.

3.2.2 Immunzytochemische Einfachfärbung der Cytospins

Die Cytospins wurden in Aceton bei +4°C fixiert. Um die endogene Peroxidase-Aktivität zu blocken, wurde ein „Peroxidase Block“ (DakoCytomation, Hamburg) benutzt.

Die Primärantikörper waren monoklonale mouse-anti-human-Antikörper gegen CD45, CD45RA, CD45R0, CD8, CD56, IgG, Pancytokeratin (Klone AE1/AE3), CK20, p53, EMA, CEA (DakoCytomation), CD4 (Immunotech, Marseille, France) und CD25 (BD

Pharmingen, Heidelberg, Deutschland). Zur Darstellung von IgM und Her-2/neu wurden polyklonale rabbit-anti-human-Antikörper verwendet (DakoCytomation).

Als Sekundär- bzw. Tertiärantikörper wurde ein Streptavidin-Biotin-System eingesetzt (DakoCytomation). Die Peroxidase-konjugierten Antikörper wurden mit DAB gefärbt (DakoCytomation). Die Kerngegenfärbung erfolgte mit Mayr's Hämatoxylin; schließlich wurden die Cytospins mit GycergelTM (DakoCytomation) wässrig eingedeckt (DakoCytomation) (Tab. 2).

Tab.2: Übersicht über die für die Cytospins verwendeten Primärantikörper. * Bei dem Antikörper gegen Pancytokeratin handelt es sich um eine Mischung von zwei monoklonalen Antikörpern, Klon AE1 und AE3 im Verhältnis 4:1. Es werden die Cytokeratine 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 14, 15, 16 und 19 erkannt.

Antikörper	Vorkommen/Funktion	Hersteller	Verdünnung	Typ
CD45	fast alle Leukozyten	DakoCytomation	1:200	monoklonal, mouse-anti-human
CD45RA	B-Zellen	DakoCytomation	1:100	monoklonal, mouse-anti-human
CD45RO	reife, aktivierte T-Zellen	DakoCytomation	1:100	monoklonal, mouse-anti-human
CD8	zytotoxische und Suppressor-T-Zellen	DakoCytomation	1:200	monoklonal, mouse-anti-human
CD4	Th-Zellen, Makrophagen	Immunotech	1:25	monoklonal, mouse-anti-human
CD25	aktivierte T-Lymphozyten	BDPharmingen	1:10	monoklonal, mouse-anti-human
CD56	NK-Zellen	DakoCytomation	1:25	monoklonal, mouse-anti-human
IgG	B-Zellen	DakoCytomation	1:50	monoklonal, mouse-anti-human
IgM	B-Zellen	DakoCytomation	1:20000	polyklonal, rabbit-anti-human
p53	Tumorsuppressorgen	DakoCytomation	1:50	monoklonal, mouse-anti-human
Pancytokeratin	Epithelzellen	DakoCytomation	1:50	monoklonal, mouse-anti-human *
CK20	kolorektales Karzinom u.a. Tumoren	DakoCytomation	1:20	monoklonal, mouse-anti-human
Her-2/neu	Membranrezeptor-Tyrosinkinase	DakoCytomation	1:100	polyklonal, rabbit-anti-human
EMA	normales und neoplastisches Epithel	DakoCytomation	1:500	monoklonal, mouse-anti-human
CEA	Adenokarzinome (v.a. GI-Trakt)	DakoCytomation	1:100	monoklonal, mouse-anti-human

Die Einfachfärbungen wurden mit einem Mikroskop (Zeiss, Göttingen) ausgewertet, in dessen Okular ein Zellraster eingesetzt werden konnte.

Um einen Überblick zu bekommen und repräsentative Abschnitte des Präparates auszumachen, wurde jeder Cytospin zunächst bei 100-facher Vergrößerung mikroskopiert. Danach wurden alle Zellen innerhalb eines Rasters bei 400-facher Vergrößerung gezählt. In einem zweiten Schritt wurden nur die DAB-positiven Zellen

innerhalb desselben Rasters gezählt. Falls eine Gesamtzellzahl von 200 bis 250 Zellen innerhalb eines Rasters erreicht wurde, wurde das Auszählen beendet, ansonsten wurden - bedingt durch die unterschiedliche Zelldichte der Cytospins - so viele weitere Raster ausgezählt, bis eine Gesamtzellzahl von 200 bis 250 erreicht war.

Die Ergebnisse wurden als „positive Zellen in Prozent“ angegeben (= Anzahl der positiven Zellen dividiert durch Anzahl aller gezählten Zellen). Weiterhin wurde die Intensität der Immunfärbung in drei Stufen bewertet (+ = schwach, ++ = mittel, +++ = stark). Dem Untersucher war nicht bekannt, von welchem Patienten das untersuchte Präparat stammte.

3.2.3 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung der Cytospins

Die Herstellung der Cytospins und deren Fixierung erfolgten wie oben beschrieben. Zum Blocken von endogenen Enzymaktivitäten wurde Antibody Diluent verwendet (DakoCytomation).

Der Primärantikörper gegen CD25 war ein monoklonaler mouse-anti-human-Antikörper. Als Sekundärantikörper wurde ein Cy3-markierter donkey-anti-mouse-Antikörper verwendet (Jackson Immuno Research, Soham, Cambridgeshire, UK)

Ein CD4-FITC-markierter mouse-anti-human-Primärantikörper (DakoCytomation) wurde danach zur Darstellung von CD4 aufgetragen. Die fertigen Präparate wurden mit Fluoromount-G (Biozol, Eching) eingedeckt.

Die Immunfluoreszenz-Färbungen wurden mit einem FluoView FV1000 Confocal Mikroskop und Software der Firma Olympus (Hamburg) ausgewertet. Repräsentative Abschnitte eines Präparats wurden mit 100-facher und 400-facher Vergrößerung fotografiert und gespeichert. Die Darstellung erfolgte in Cy3-Markierung, FITC-Markierung und als FITC-Cy3-Doppelmarkierung. Die Färbungsintensität (gering, mittel, stark) und der Prozentsatz an doppelt positiven Zellen im Präparat wurde nach Auswertung von jeweils 20 Gesichtsfeldern bei 400-facher Vergrößerung abgeschätzt. Dem Untersucher war nicht bekannt, von welchem Patienten das untersuchte Präparat stammte.

3.3 Immunhistochemische Färbung von Tumorgewebe

Für die histologische Untersuchung wurden repräsentative Abschnitte des entnommenen Tumorgewebes (n=51) in zehnprozentigem gepufferten Formalin fixiert. Die Paraffin-Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin-Färbungen untersucht. Kryostat-Schnitte wurden mit Paraformaldehyd-Lysin-Periodat fixiert, um mit der folgenden Färbung Zelloberflächenantigene darzustellen. Zur Kontrolle wurden Färbungen von sechs Patienten ohne pathologischen Tumorbefund der Darmschleimhaut angefertigt.

Der verwendete monoklonale Antikörper DO-7 war gegen die Aminosäuren 35-45 des menschlichen p53-Proteins gerichtet (DakoCytomation, Heidelberg, Deutschland). Sekundär- und Kontrollantikörper wurden von BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

Gereinigtes IgG1 oder *Isotype-matched*-monoklonale Antikörper wurden in jedem Experiment zur Kontrolle verwendet. Außerdem wurden Kontrollen angefertigt, um verbliebene endogene Peroxidase-Aktivität zu erfassen.

Der Prozentsatz an p53-positiven Tumorzellen im Präparat wurde nach Auswertung von jeweils 20 Gesichtsfeldern bei 400-facher Vergrößerung abgeschätzt.

3.4 Stimulation von Lymphozyten aus dem peripher-venösen Blut von Karzinompatienten mit synthetischen p53-Peptiden

3.4.1 Synthetische p53-Peptide

95 Peptide, die die Sequenz des wt-p53-Proteins umfassten, wurden auf „Polyethylen-Pins“ oder „Polystyren-Resins“ synthetisiert. Dabei wurden die Standardbedingungen für Aktivierung, Fmoc-Deprotektion, Seitenketten-Deprotektion und Spaltung der Peptide beachtet (Mimotopes, Clayton Victoria, Australien).

Die p53-Peptide wurden als 14-mere synthetisiert, wobei sich jeweils 4 Aminosäuren (AS) überlappten (Tab. 3). Die fertigen Peptide wurden in 10 Peptidpools aufgeteilt (Pool 1: Peptide 1-10, AS 1-50; Pool 2: Peptide 11-20, AS 51-90; usw.). Die Peptide wurden von der Firma ProImmune Limited (Oxford, UK) bezogen.

Tab. 3: Auflistung der Aminosäuresequenz der verwendeten synthetischen p53-Peptide. Die p53-Peptide (n=95) umfassten die gesamte humane wild-type(wt)-p53-Sequenz. Die Peptide bestanden aus jeweils 14 Aminosäuren (AS) mit 4 überlappenden AS. Dies wird in der Tabelle für die ersten 5 Peptide durch die graue Schattierung verdeutlicht. Die p53-Peptide wurden in 10 Peptidpools aufgeteilt (Pool 1: Peptide 1-10, AS 1-50;...;Pool 10: Peptide 91-94, AS 371-393).

1	MEEPQSDPSVEPPL	33	ALNKMFCQLAKTCP	65	LEDSSGNLLGRNSF
2	QSDPSVEPPLSQET	34	MFCQLAKTCPVQLW	66	SGNLLGRNSFEVVRV
3	SVEPPLSQETFSDL	35	LAKTCPVQLWVDST	67	LGRNSFEVRCACPC
4	PLSQETFSDLWKLL	36	CPVQLWVDSTPPPG	68	SFEVRCACPCGRDR
5	ETFSDLWKLLPENN	37	LWVDSTPPPGTRVR	69	RVCACPCGRDRRTEE
6	DLWKLLPENNVLSP	38	STPPPGTRVRAMAI	70	CPGRDRRTEENLR
7	LLPENNVLSPLSQ	39	PGTRVRAMAIYKQS	71	DRRTEENLRKKGE
8	NNVLSPLSQAMDD	40	VRAMAIYKQSQHMT	72	EEENLRKKGEPHHE
9	SPLSQAMDDLMLS	41	AIYKQSQHMTEVVR	73	LRKKGEPHHELPPG
10	SQAMDDLMLSPDDI	42	QSQHMTEVVRRCPH	74	GEPHHELPPGSTKR
11	DDLMLSPDDIEQWF	43	MTEVVRRCPHHERC	75	HELPPGSTKRALPN
12	LSPDDIEQWFTEDP	44	VRCPHHERCSDSD	76	PGSTKRALPNNTSS
13	DIEQWFTEDPGPDE	45	PHHERCSDSDGLAP	77	KRALPNNTSSSQP
14	WFTEDPGPDEAPRM	46	RCSDSDGLAPPQHL	78	PNNTSSSQPKKKP
15	DPGPDEAPRMPEAA	47	SDGLAPPQHLIRVE	79	SSSQPKKKPLDGE
16	DEAPRMPEAAPVA	48	APPQHLIRVEGNLR	80	QPKKKPLDGEYFTL
17	RMPEAAPVAPAPA	49	HLIRVEGNLRVEYL	81	KPLDGEYFTLQIRG
18	AAPPVAPAAPAAPT	50	VEGNLRVEYLDDRN	82	GEYFTLQIRGRERF
19	VAPAAPAPTAAPA	51	LRVEYLDDRNTRFH	83	TLQIRGRERFEMFR
20	PAAPTAAPAPAPS	52	YLDDRNTRFHSVVV	84	RGRERFEMFRELNE
21	TPAAPAPAPSWPLS	53	RNTFRHSVVVPYEP	85	RFEMFRELNEALEL
22	PAPAPSWPLSSSVP	54	RHSVVVPYEPPEVG	86	FRELNEALELKDAQ
23	PSWPLSSSVPKQKT	55	VVPYEPPEVGSDDCT	87	NEALELKDAQAGKE
24	LSSSVPKQKTYQGS	56	EPPEVGSDDCTTIHY	88	ELKDAQAGKEPGGS
25	VPSKQKTYQGSYGFR	57	VGSDCTTIHYNYMC	89	AQAGKEPGGSRAHS
26	KTYQGSYGFRGLGFL	58	CTTIHYNYMCNSSC	90	KEPGGSRAHSSHLK
27	GSYGFRGLGFLHSGT	59	HYNYMCNSSCMGGM	91	GSAHSSHLKSKKG
28	FRLGFLHSGTAKSV	60	MCNSSCMGGMNRRP	92	HSSHLKSKKGQSTS
29	FLHSGTAKSVTCTY	61	SCMGGMNRRPILTI	93	LKSKKGQSTSRRHKK
30	GTAHSVCTYSPAL	62	GMNRRPILTIITLE	94	KGQSTSRRHKKLMFK
31	SVTCTYSPALNKMF	63	RPILTIITLEDSSG	95	TSRRHKKLMFKTEGP
32	TYSPALNKMFQCLA	64	TIITLEDSSGNLLG		

3.4.2 ELISPOT Assay (IL-10)

Um die Frequenz der p53-reaktiven Th2-Zellen, die das Cytokin IL-10 produzieren, zu bestimmen, wurde der ELISPOT Assay angewendet. Dabei wurden zunächst ELISPOT 96-Well-Platten (Millipore, Molsheim) mit in PBS-Puffer gelösten *Capture*-Antikörpern gegen IL-10 (BD Bioscience, Heidelberg) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platten wurden mit einprozentigem PBS-BSA für zwei Stunden geblockt und dann mit PBS gewaschen.

Danach wurde eine Gesamtmenge von mindestens 1×10^5 PBL gelöst in 100 µl eines kompletten RPMI-Mediums (RPMI 1640 Medium (Invitrogen, Karlsruhe) mit 10%

normalem Humanserum (PAA, Coelbe), 100 U/ml Penicillin (Biochrom, Berlin), 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom), 5 mM HEPES (Biochrom) 1% nicht-essentielle Aminosäuren (Biochrom), 1 mM Natrium-Pyruvat (Biochrom) und 2×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol (Invitrogen)) und der jeweils relevante p53-Peptidpool (Konzentration des einzelnen Peptides: 50µg/ml) in jedes Well pipettiert. Kontroll-Wells enthielten Zellen und Medium alleine als Negativkontrolle oder PHA (Konzentration: 5µg/ml/well) ohne Peptide als stimulierende Substanz und somit als Positivkontrolle. Nach 24 Stunden wurden die Platten erneut gewaschen. Danach wurde ein biotinylierter Detektionsantikörper (BD Bioscience, Heidelberg) hinzugefügt und die Platten zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde *Horseradish-Peroxidase*(HRP)-Konjugat (BD Bioscience, Heidelberg) hinzugegeben und eine weitere Stunde bei Dunkelheit inkubiert. Frisch zubereitetes AEC (Aminoethyl-Carbazol; Pierre Pharmaceuticals, Rockland, IL, USA; 10 mg/ml in N-, N-Dimethylformamid gelöst), das in 0,1 M Natriumacetat-Puffer (pH 5,0) gelöst und mit H₂O₂ 30% (Wasserstoffperoxid; 200µl/Well) gemischt wurde, diente zur Entwicklung. Die resultierenden Spots wurden mit einem Computer-assistierten *ELISA Spot Image Analyzer* (CTL, Cleveland, Ohio) gezählt. Die Versuche wurden insgesamt vier Mal wiederholt. Die Ergebnisse wurden als Frequenz der IL-10 produzierenden Zellen pro Million Zellen angegeben (Abb. 4).

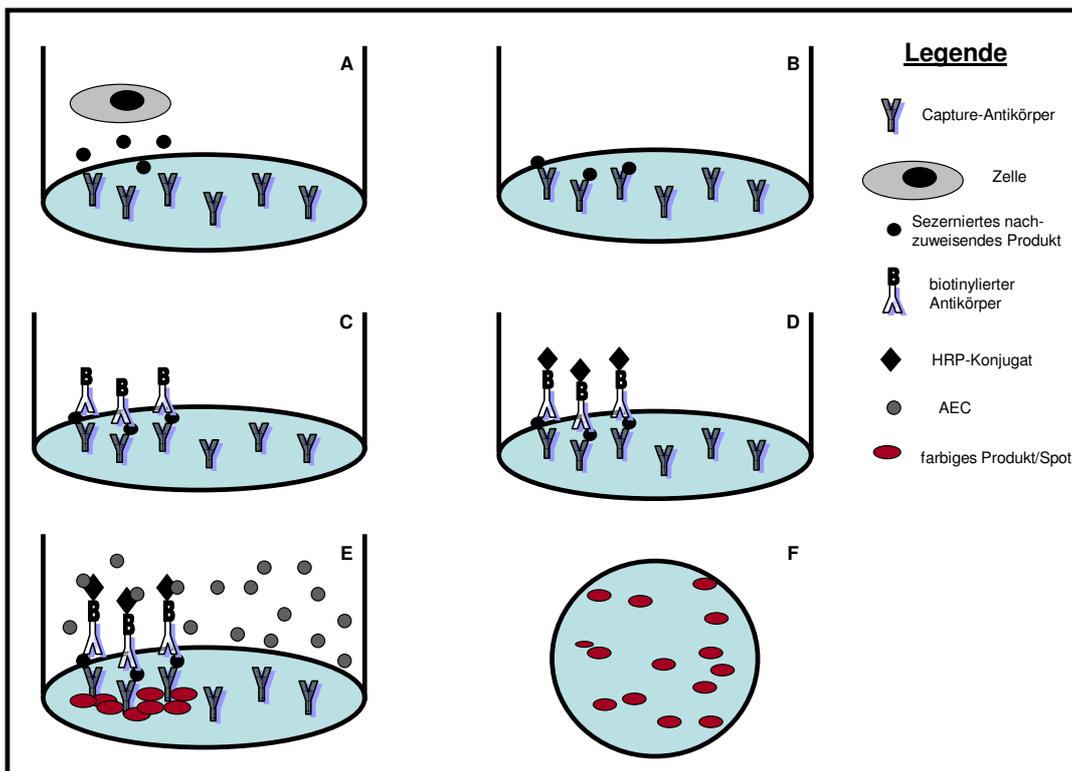


Abb. 4: Prinzip des ELISPOT Assays. Die das zu untersuchende Antigen (hier IL-10) sezernierenden Zellen werden in Wells inkubiert, die mit *Capture*-Antikörpern beschichtet sind (A). Nach 24 Stunden werden die Zellen durch mehrere Waschschrte entfernt. Das sezernierte Antigen bleibt an den immobilen Antikörpern gebunden (B). Die Wells werden danach mit biotinylierten Antikörpern inkubiert (C). Nach weiteren 2 Stunden wird *Horseradish-Peroxidase*(HRP)-Konjugat bei Dunkelheit hinzugefügt (D). Zur Entwicklung dient AEC (E). Dort, wo Lymphozyten das gesuchte Antigen sezerniert haben, bilden sich rote „Spots“, die Computer-assistiert ausgezählt werden. (F) zeigt die Aufsicht auf ein Well mit mehreren Spots.

3.4.3 IFN- γ ELISA

Um die Produktion des Th1-Cytokins IFN- γ zu messen, wurde ein ELISA durchgeführt, wobei die Überstände aus den ELISPOT-Experimenten als Proben dienten.

Es wurde das BIOSOURCE Cytoscreen Kit (BIOSOURCE, Camarillo, CA, USA) benutzt und nach den Herstelleranleitungen verfahren. Dazu wurden 96-Well-Platten verwendet, die mit Antikörpern gegen IFN- γ beschichtet waren. In die Wells wurden zunächst 50 μ l Standards, Kontrollen und Proben pipettiert. Dann wurde der zweite Antikörper gegen IFN- γ (50 μ l Biotin-Konjugat) hinzugegeben. Die Platten wurden im

Folgenden für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, danach ausgeschüttet und vier Mal gewaschen.

Anschließend wurde 100µl Streptavidin-HRP Working Solution in jedes Well pipettiert. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur von 45 Minuten und weiteren Waschschrritten wurde 100µl Stabilized Chromogen hinzugefügt. Die Platten inkubierten weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur. Schließlich wurde je 100µl Stop Solution hinzugefügt. Die Auswertung erfolgte am ELISA-Reader bei 450nm (Dynatech Laboratories, Sullyfield, USA).

3.5 ELISA zum Nachweis von zirkulierenden Anti-p53-Antikörpern

Die p53-spezifischen IgG-Titer wurden quantitativ mit einem kommerziell erhältlichen p53-ELISA Kit von Oncogene (Boston, MA, USA) untersucht. Für jede Serumprobe wurde zunächst entsprechend der Beschreibung des Herstellers der relative p53-Autoimmunindex berechnet (*cut-off*-Wert: 0,035). Der Anti-p53-Titer (U/ml) der positiven Serumproben wurde bei 50-facher Verdünnung berechnet, indem eine lineare Regressionskurve verwendet wurde. In dieser wurden Standardkonzentrationen gegen die Absorption aufgetragen.

Von jedem Patienten wurden zwei Serumproben getestet (n=40). Die Experimente wurden drei Mal wiederholt. Sera von Gesunden dienten als Kontrollen (n=11).

3.6 RNA-Extraktion

Das RNA Extraction Kit (Qiagen Kit, Hilden) wurde entsprechend der Herstellerangaben verwendet, um RNA aus jeweils mindestens 10 mg homogenisiertem Tumorgewebe zu extrahieren. Das Tumorgewebe wurde zuvor in DEPC-75% Ethanol gewaschen, danach in DEPC-Wasser gelöst und bei -70°C gelagert. Alle benutzten Glasgefäße wurden mit DEPC-Wasser gespült und autoklaviert. Alle Lösungen wurden mit DEPC-Wasser zubereitet. Die Menge an Gesamt-RNA wurde festgelegt, indem die Absorption der Proben spektrophotometrisch bei 260nm gemessen wurde. Die Reinheit

der Gesamt-RNA, also das Fehlen von Kontaminationen der Proben durch Proteine, wurde dadurch sichergestellt, dass die 260nm/280nm-Ratio im Bereich 1,8-2,0 lag.

3.7 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) zur Detektion von p53-Mutationen

Um Copy(c)-DNA aus ungefähr 2µg Gesamt-RNA zu gewinnen, wurde das Promega AccessQuick™ RT-PCR System verwendet (Promega, WI, USA). Das Verfahren wurde entsprechend dem Standard RT-PCR Protokoll durchgeführt, wobei AMV-Reverse Transkriptase benutzt wurde. Es kamen 2 Paare von Primern zum Einsatz, welche die für p53 kodierende Region zwischen den Exons 4 und 9 umfassten. Die Primer-Sequenzen waren: Exons 4-6, Sense-Primer TGT CCC CGG ACG ATA TTG AAC und Antisense-Primer TTC CTT CCA CTC GGA TAA GAT GC (Amplikon-Größe: 465 Basenpaare (bp)); und Exons 5-9, Sense-Primer GCT CAG ATA GCG ATG GTC TGG C und Antisense-Primer TCT CGG AAC ATC TCG AAG CG (Amplikon-Größe: 484 bp).

Die Bedingungen für die PCR lauteten: 48°C für 45 Minuten für die erste Reaktion, gefolgt von 95°C für 2 Minuten zur Inaktivierung, danach 40 Zyklen von 94°C für 30 Sekunden, 60°C für 60 Sekunden und 68°C für 20 Sekunden. Der letzte Extentions-Schritt wurde bei 68°C für 5 Minuten durchgeführt. Vor der Sequenzierung wurden alle PCR-Produkte gereinigt. Dabei wurde nach dem Protokoll des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) vorgegangen.

Die PCR-Produkte wurden mit dem „ABI Prism 373 fluorescent dye terminator“ (PE/Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) analysiert. Um eine hohe Genauigkeit sicherzustellen, waren die PCR-Produkte auf eine Größe von <500 Basenpaaren restringiert, was dem Sequenzierungsspektrum des ABI Prism 373 entspricht.

3.8 Real-Time-PCR zum Nachweis Th2-spezifischer Gene im Tumorgewebe

Es wurde die Genexpression von repräsentativen Zytokinen und Oberflächenmolekülen (CD4, CD25, CTLA-4, Foxp3, GATA-3, GITR, IL-10, IFN- γ) aus Tumorgewebeproben von 21 Patienten mit kolorektalem Karzinom mittels Real-Time-PCR analysiert. Die genannten Gene sind typisch für Th2-Zellen. Dabei spielt Foxp3 (*forkhead box P3*) als Transkriptionsregulator eine entscheidende Rolle für Entwicklung und Funktion von T_{reg}-Lymphozyten. GATA-3 und GITR fungieren ebenfalls als Transkriptionsfaktoren. CTLA-4 spielt bei der Kostimulation von Lymphozyten eine große Rolle und hat einen inhibitorischen Effekt.

Die RNA-Extraktion erfolgte wie oben beschrieben. cDNA wurde mit 2 μ g von durch Hitze denaturierter RNA zubereitet. Die der Tabelle 4 zu entnehmenden Primersequenzen wurden verwendet (Sigma Genosys, Woodlands, TX, USA).

Tab. 4: Verwendete Primersequenzen (Sigma Genosys, Woodlands, TX, USA) für die Real-Time-PCR zum Nachweis Th2-spezifischer Gene im Tumorgewebe. Es wurde die Genexpression von CD4, CD25, Foxp3, GATA-3, CTLA-4, GITR, IL-10 und IFN- γ analysiert. GAPDH diente als *housekeeping gene*.

Gen	Primersequenzen
GAPDH	5'-ATC CCA TCA CCA TCT TCC AGG-3' und 5'-CGC CCC ACT TGA TTT TGG-3'
CD4	5'-TCC GTG TCT CAG CTG GAG C-3' und 5'-GAC AGT GCA TGT CCA GGT GC-3'
CD25	5'-AAG TCC AAT GCA GCC AGT GG-3' und 5'-TCC CTG CAG TGA CCT GGA AG-3'
Foxp3	5'-GAG AAG CTG AGT GCC ATG CA-3' und 5'-GGT CAG TGC CAT TTT CCC AG-3'
GATA-3	5'-ACT ACC TGT GCA ACG CCT GC-3' und 5'-GGT TCT GTC CGT TCA TTT TGT GA-3'
CTLA-4	5'-ATC GCC AGC TTT GTG TGT GA-3' und 5'-GAC CTC AGT GGC TTT GCC TG-3'
GITR	5'-CGA GGA GTG CTG TTC CGA G-3' und 5'-TGG AAT TCA GGC TGG ACA CAC-3'
IL-10	5'-CTA CGG CGC TGT CAT CGA TT-3' und 5'-CAC GGC CTT GCT CTT GTT TT-3'
IFN- γ	5'-TGT TGA ACT GCA CTG GCC A-3' und 5'-CAC CCA GGG CAG CTG GT-3'

Die Primer wurden mit der „Primer Express Software for primer design“ hergestellt. Dabei wurden kurze Segmente von 50-150 bp Target-cDNA amplifiziert. Die optimale Primer-Konzentration wurde durch Titration bestimmt.

Die quantitative Real-Time-PCR wurde als 2-Schritt-RT-PCR durchgeführt, wobei der SYBR Green PCR Master Mix (PE Biosystems, Foster City, CA, USA) mit 100 ng cDNA und 300 nM Primer in einem totalen Reaktionsvolumen von 50µl verwendet wurde. Für die Durchführung der PCR galten die folgenden Bedingungen: Erhitzen auf 95°C für 10 Minuten, danach 40 Zyklen Erhitzen auf 95°C für 15 Sekunden und Abkühlen auf 60°C für 60 Sekunden.

Die genspezifischen Produkte wurden kontinuierlich mit dem ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) gemessen. Die relative Quantifizierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Von jedem Patienten wurden zwei Proben untersucht und während der Datenanalyse durch einen passiven Referenzfarbstoff, der im SYBR Green PCR Master Mix enthalten war, normalisiert, um die Well-to-Well Fluoreszenzvariationen zu korrigieren.

Der durchschnittliche *threshold cycle* (Ct) Wert wurde als Zyklusnummer berechnet, an dem die Fluoreszenz des *Reporters* einen fixierten Schwellenwert erreichte. Die Differenz (Δ Ct) zwischen den durchschnittlichen Ct-Werten der Proben in den *target wells* und denen des *housekeeping genes* GAPDH wurde bestimmt. Darauf folgte die Berechnung der Differenz zwischen den durchschnittlichen Ct-Werten für jedes Target und dem Δ Ct-Wert der Kontrollprobe für dieses Target ($\Delta\Delta$ Ct). Der relative Quantifizierungswert, *fold change*, wurde ausgedrückt als $2^{-\Delta\Delta$ Ct}.

3.9 Statistik

Die Ergebnisse wurden in arithmetischen Mitteln (Mittel \pm SEM) ausgedrückt. Der Mann-Whitney-U-Test wurde verwendet, um die Signifikanz von Differenzen zwischen den Gruppen zu vergleichen. Signifikanz wurde angenommen, wenn $p < 0,05$ betrug.

4. Ergebnisse

4.1 Immunhistochemische Färbung gegen p53 im Tumorgewebe

Die immunhistochemische Untersuchung der p53-Expression im Tumorgewebe zeigte, dass Karzinome fortgeschrittener Stadien (Abb. 5) sich signifikant stärker gegen p53 anfärben, als solche der UICC-Stadien I und II. Bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung fanden sich in 57,1% der untersuchten Fälle positive Zellen im Tumorgewebe, bei Patienten im frühen Erkrankungsstadium dagegen nur in 37,1% der untersuchten Fälle ($p < 0,05$) (Abb. 6).

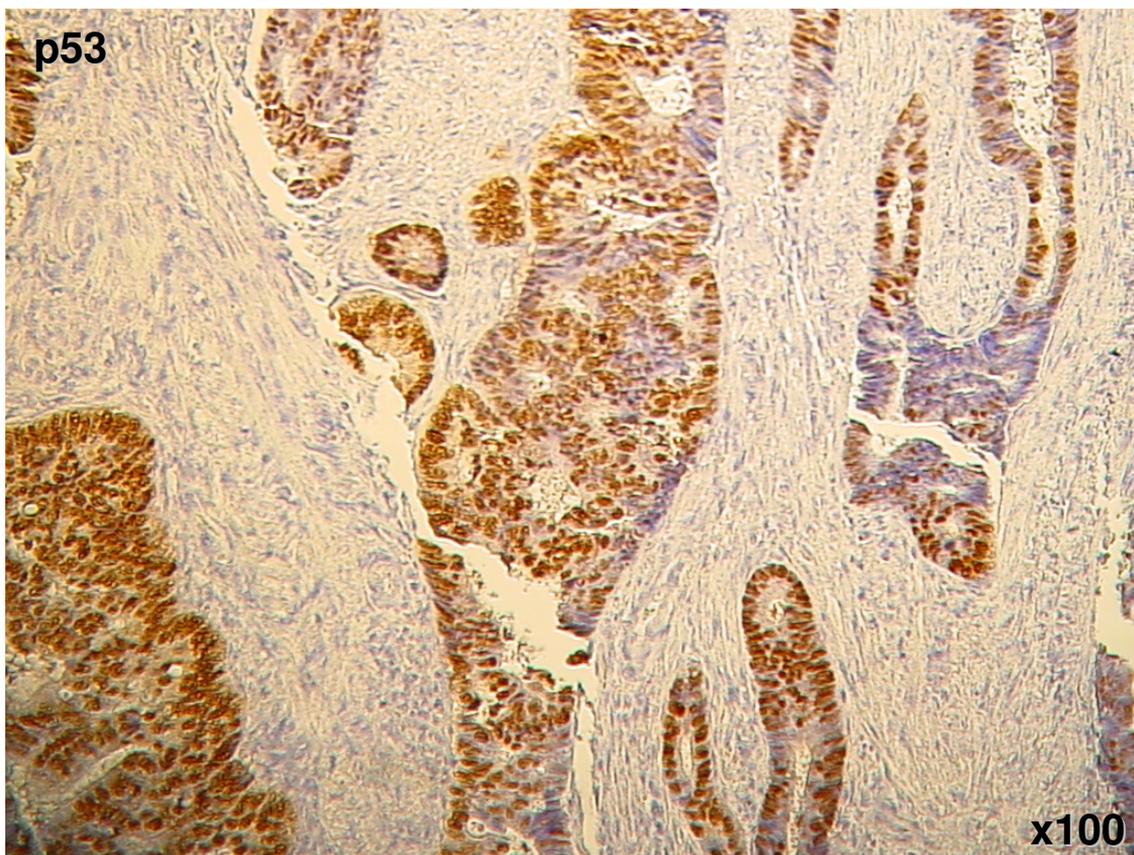


Abb. 5: Immunhistochemische p53-Färbung des Tumorgewebes von Patienten mit kolorektalem Karzinom. Gezeigt ist ein repräsentatives Präparat eines Patienten im UICC-Stadium III B bei 100-facher Vergrößerung. Das Tumorgewebe dieses Patienten zeigt eine starke Anfärbung gegen p53.

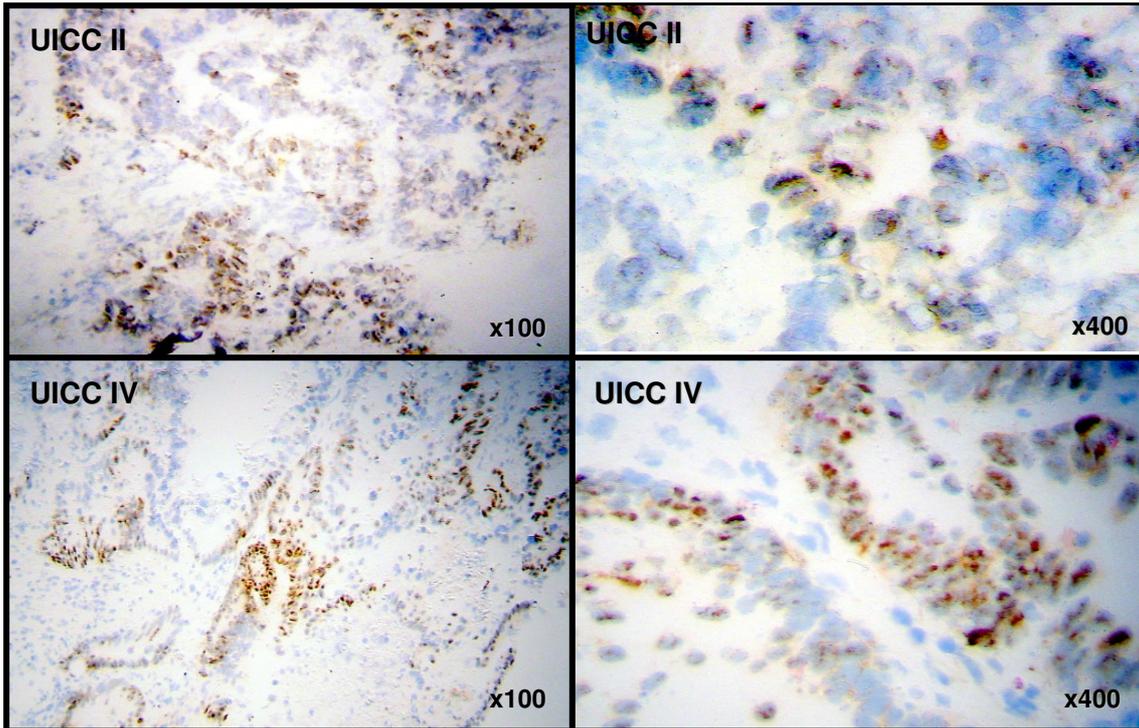


Abb. 6: Immunhistochemische Untersuchung zweier repräsentativer Tumorschnitte (UICC-Stadium II und IV) mit starker intrazellulärer Anfärbung gegen p53 (jeweils 100- und 400-fache Vergrößerung). Patienten in fortgeschrittenen UICC-Stadien (UICCIII/IV) zeigen einen höheren Prozentsatz an p53-positiven Zellen als Patienten in früheren Stadien (UICC I/II). Zur Abschätzung des Prozentsatzes an p53-positiven Zellen wurden jeweils 20 konsekutive *high power fields* (400x) ausgewertet.

4.2 Immunzytochemische Färbung von Cytospins zum Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinom

In dieser Arbeit wurde neben dem Tumorgewebe selbst auch das Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinom immunhistochemisch untersucht. Dazu wurden Cytospins hergestellt. Es ging zunächst darum, einen geeigneten „Marker“ zum Nachweis von disseminierten, zirkulierenden Tumorzellen im Blut zu finden. Daher wurden die Cytospins mit Antikörpern gegen p53, Cytokeratin 20 (CK20), Pancytokeratin (CK AE1/AE3), Her-2/neu (Onkoprotein), Epitheliales Membranantigen (EMA) und Carcinoembryonales Antigen (CEA) gefärbt.

Bei 8 der 14 untersuchten Patienten (57%) ließen sich zahlreiche p53-positive Zellen

(> 10% im Präparat) im peripheren Blut nachweisen. Besonders die Präparate von Patienten mit einem Rektumkarzinom zeigten p53-positive Zellen (5 von 7 Patienten). Die übrigen untersuchten Patienten und die Kontrollen waren entweder komplett negativ oder zeigten nur einzelne schwach positive Zellen (Tab. 5). p53-positive Zellen ließen sich vor allem im Blut von Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung (UICC-Stadium III/IV) detektieren.

Es bleibt die Frage offen, ob wirklich alle p53-positiven Zellen in Wahrheit Tumorzellen sind oder ob sich auch einige PBL anfärben. Im Rahmen unserer Untersuchungen wurden die genannten Färbungen auch bei Patienten mit Magenkarzinom, Pankreaskarzinom, hepatozellulärem Karzinom und anderen Tumoren durchgeführt. Bei allen genannten Tumoren fiel die Färbung gegen p53 meist komplett negativ aus (Abb. 7) oder es ließen sich nur ganz vereinzelt positive Zellen nachweisen. Es scheint, dass sich eine solche Häufung p53-positiver Zellen nur im Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinom findet.

Die anderen potentiellen „Marker“ erwiesen sich als ungeeignet, um im Blut zirkulierende Tumorzellen bei Patienten mit kolorektalem Karzinom nachzuweisen.

Die Färbung gegen CK20 war bei vielen Patienten deutlich positiv. Allerdings wirkte der verwendete Antikörper wenig spezifisch, so dass sich auch einige Kontrollpräparate intensiv anfärbten.

Antikörper gegen Pancytokeratin, Her-2/neu, EMA und CEA färbten die Cytospins der Patienten entweder nicht oder nur wenig positiv an. Diese Präparate lassen sich somit nicht sicher von den Kontrollpräparaten differenzieren. Zusammenfassend erscheint p53 zum Nachweis zirkulierender Tumorzellen bei Patienten mit kolorektalem Karzinom am geeignetsten.

Tab. 5: Ergebnisse der immunzytochemischen Färbung von Cytospins zum Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinom. Es wurden 14 Patienten und 3 Kontrollpersonen untersucht und das UICC-Stadium berücksichtigt. Zum Einsatz kamen Antikörper gegen p53, CK20, Pancytokeratin, Her-2/neu, EMA und CEA. Die Cytospins wurden zunächst bei 100-facher Vergrößerung durchgemustert und dann, wenn zahlreiche positive Zellen vorhanden waren, bei 400-facher Vergrößerung genau ausgezählt. Die folgenden Angaben beziehen sich auf den Anteil positiver Zellen im gesamten Cytospin-Präparat: 0: negativ, +: nur einzelne positive Zellen, ++: < 2% positive Zellen, +++: 2 -10% positive Zellen, +++++: 10 – 30% positive Zellen, ++++++: > 30% positive Zellen. n.v.: nicht vorhanden.

Nummer	Diagnose	UICC	CK AE1/AE3	CK20	p53	Her-2/neu	EMA	CEA
1	Kolon	I	+	++++	0	+	0	0
2	Kolon	II A	0	0	0	+	0	+
3	Kolon	II A	+++	+++	0	++	+++	+++
4	Kolon	III B	++	++++	++++	+	+	+
5	Kolon	IV	++++	++++	+++++	++++	++++	++++
6	Kolon	IV	++	+++++	0	0 -	+++	0
7	Kolon	IV	++	+++++	+++++	++	++	++
8	Rektum	I	0	+++++	+++++	1	0	+
9	Rektum	IIIA	0	+++++	+++++	0	0	0
10	Rektum	IIIB	n.v.	++++	+++++	++++	n.v.	n.v.
11	Rektum	IV	+	++	+++++	0	0	0
12	Rektum	IV	+	+++++	+++++	0	0	+
13	Rektum	IV	++	+++++	0	0	n.v.	0
14	Rektum	IV	+	+++++	0	0	0	0
A	Kontrolle		0	0	0	0	0	0
B	Kontrolle		+	+	0	0	+	+
C	Kontrolle		++	++++	+	0	0	+

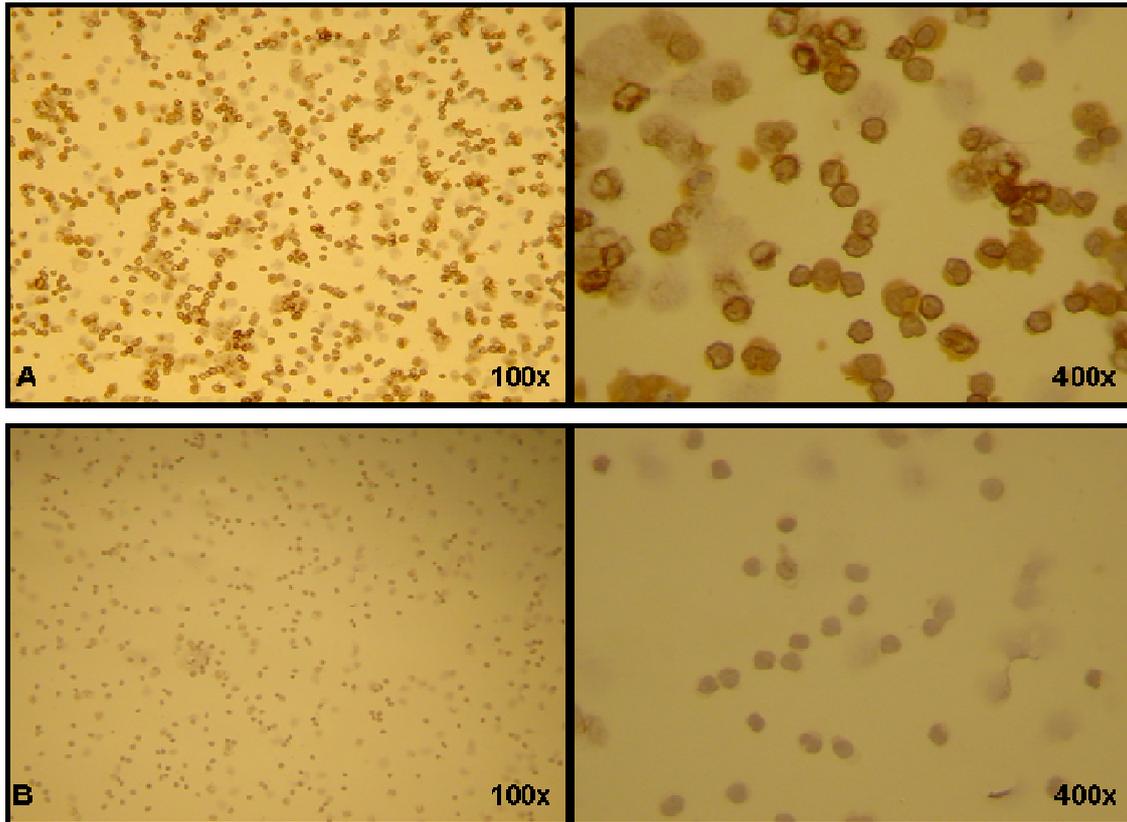


Abb. 7: Zirkulierende p53-positive Zellen im peripheren Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinom (n=14). Bei 57% der untersuchten Patienten ließen sich p53-positive Zellen nachweisen. In A ist als repräsentatives Beispiel ein Cytospin eines Patienten mit Rektumkarzinom im Stadium UICC III B in 100-facher und 400-facher Vergrößerung gezeigt. Es sind zahlreiche p53-positive Zellen zu erkennen. In B ist der Cytospin eines Patienten mit Magenkarzinom dargestellt. Es lassen sich keine p53-positive Zellen nachweisen. Der Anteil an p53-positiven Zellen und die Färbungsintensität (schwach, mittel, stark) wurde nach Auswertung von 20 konsekutiven *high power fields* bestimmt (400x).

4.3 Humorale Immunantwort bei Patienten mit kolorektalem Karzinom

4.3.1 Cytospins

Von 14 Patienten und 4 gesunden Kontrollpersonen mit kolorektalem Karzinom wurden Cytospins angefertigt und gegen CD45RA -einem B-Zell-Marker-, IgM und IgG gefärbt.

Es zeigte sich, dass sich bei den Tumorpatienten eine signifikant ($p < 0,05$) niedrigere Zahl an B-Lymphozyten im peripheren Blut fand als bei den Kontrollpersonen.

Weiterhin produzierten die Lymphozyten der Patienten weniger IgG als die Kontrollen. Für die IgM-Produktion ließ sich kein klarer Trend ausmachen.

Die Zahl der CD45RA- bzw. IgG-positiven Zellen zeigte keine Korrelation zum UICC-Stadium der jeweiligen Patienten (Tab. 6)

Tab. 6: Humorale Immunantwort bei Patienten mit kolorektalem Karzinom (Cytospins). PBL von 14 Patienten und 4 Kontrollen wurden mit Antikörpern gegen CD45RA, IgM und IgG gefärbt. Die Ergebnisse sind angegeben als „Anteil der positiven Zellen in Prozent“. Weiterhin ist das UICC-Stadium der untersuchten Patienten angegeben. Es besteht keine Korrelation zwischen UICC-Stadium und der Art der humoralen Immunantwort.

Nummer	Diagnose	UICC	CD45RA	IgM	IgG
1	Kolon	I	30,6	6,8	0,4
2	Kolon	II A	18,1	10,6	0,9
3	Kolon	II A	5,1	12,6	0,8
4	Kolon	III B	29,3	4,9	1,9
5	Kolon	IV	25,2	3,1	1
6	Kolon	IV	24,6	0 neg.	0,9
7	Kolon	IV	22,9	4	1,2
8	Rektum	I	6,8	0,9	0 neg.
9	Rektum	IIIA	10,3	1,3	2,5
10	Rektum	IIIB	n.v.	19,8	1,5
11	Rektum	IV	20	3,3	0,9
12	Rektum	IV	17,9	0,5	1,2
13	Rektum	IV	25	1,2	1,8
14	Rektum	IV	32,1	9,4	1,1
A	Kontrolle		39,7	2,3	2,4
B	Kontrolle		41,6	2	2,7
C	Kontrolle		46,2	7,2	2,8
D	Kontrolle		38,5	6,3	2,6

4.3.2 Spezifische humorale Immunantwort gegen p53

Mittels ELISA wurde das Vorkommen von IgG-Antikörpern gegen p53 im Serum von 40 Patienten mit kolorektalem Karzinom untersucht. Die Ergebnisse wurden mit den UICC-Stadien der Patienten korreliert.

Wir konnten bei 14 der 40 untersuchten Patienten p53-spezifische Antikörper nachweisen (35%). Bei 26 Patienten waren keine Antikörper nachweisbar oder die Titer lagen unterhalb der *critical range* (65%). Diese Patienten gingen daher nicht in die Auswertung ein. 21,4% der Patienten mit positivem Antikörper-Status waren im UICC-Stadium I, 14,3% im UICC-Stadium II, 21,4% im UICC-Stadium III und 42,9% im UICC-Stadium IV. Die Mehrheit von 65% der getesteten Patienten zeigte keine IgG-Antikörper gegen p53 im Serum (Abb. 8).

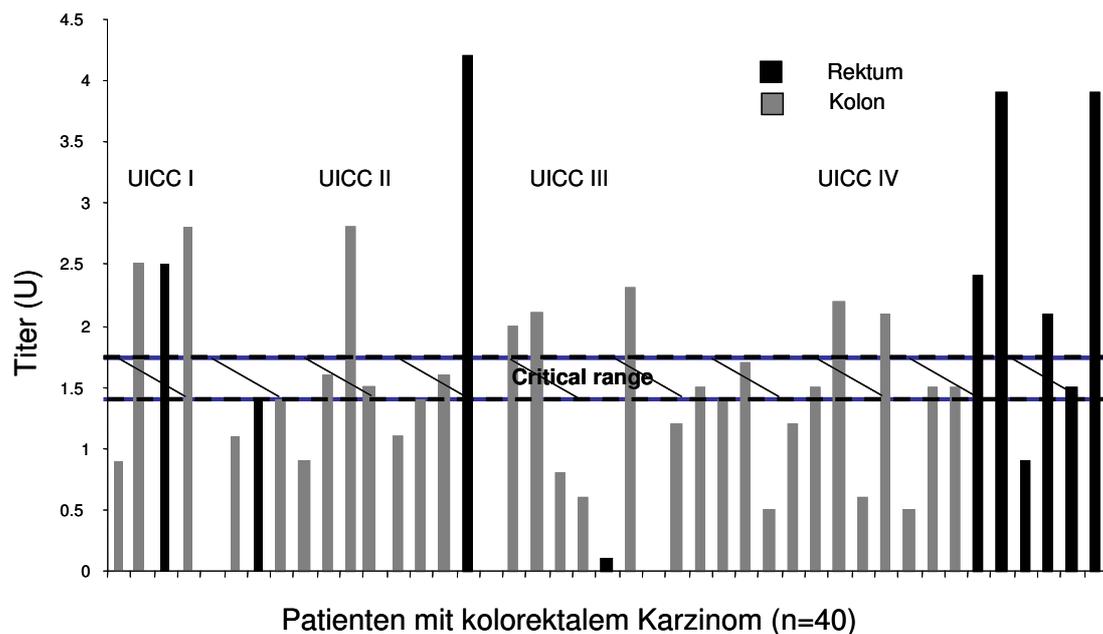


Abb. 8: Ergebnisse des p53-ELISA aus dem Serum von 40 Patienten mit kolorektalem Karzinom. Nur 35% der untersuchten Patienten exprimierten wt-p53-spezifische IgG-Antikörper im Serum. 21,4% der Patienten mit positivem Antikörper-Status waren im UICC-Stadium I, 14,3% im UICC-Stadium II, 21,4% im UICC-Stadium III und 42,9% im UICC-Stadium IV. Die schwarzen Balken repräsentieren Patienten mit Rektumkarzinom, die grauen Balken Patienten mit Kolonkarzinom.

4.3.3 Zusammenhang zwischen der Akkumulation von p53-Protein im Tumor und dem Nachweis von Antikörpern gegen p53 im Serum

Das Vorkommen von p53-spezifischen IgG-Antikörpern korrelierte mit einer starken p53-Färbeintensität im Tumor. Dies weist auf eine Korrelation zwischen der intrazellulären Akkumulation von p53 und dem Vorhandensein einer humoralen Immunantwort gegen p53 hin.

4.4 Zelluläre Immunantwort bei Patienten mit kolorektalem Karzinom

4.4.1 Cytospins

Die zelluläre Immunantwort im peripheren Blut von 14 Patienten mit kolorektalem Karzinom wurde mit Cytospin-Einfachfärbungen untersucht. Die PBL wurden mit Antikörpern gegen CD45RO, CD4, CD25, CD8 und CD56 gefärbt. Dabei ist CD45RO ein Molekül, das auf reifen, aktivierten T-Lymphozyten vorkommt, CD56 ist ein Marker für NK-Zellen.

Bei der Untergruppe mit Kolonkarzinom (n=7) zeigte sich, dass Patienten im UICC-Stadium IV mehr CD25⁺ Zellen im Blut aufweisen als Patienten im UICC Stadium II. In der Kontrollgruppe (n=4) ließen sich durchschnittlich 3% CD25⁺ Zellen nachweisen. Weiterhin fiel auf, dass die Zahl der NK-Zellen im Blut von Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung (UICC III/IV) meist vermindert ist. Dagegen zeigen Patienten in früheren Stadien (UICC I/II) eine erhöhte Zahl von NK-Zellen im Blut im Vergleich zu den Kontrollen (Mittelwert 0,4%) (Abb. 9).

Die Untersuchungen von Patienten mit Rektumkarzinom (n=7) führten zu folgenden Ergebnissen: Patienten im UICC-Stadium III weisen mehr CD25⁺ Zellen im Blut auf als Patienten im UICC-Stadium IV. Im Blut von Patienten mit fortgeschrittenem Rektumkarzinom (UICC IV) finden sich weniger CD25⁺ Zellen als bei vergleichbaren Patienten mit Kolonkarzinom im UICC-Stadium IV.

Bei Patienten im UICC-Stadium III lassen sich mehr NK-Zellen nachweisen als bei Patienten im UICC-Stadium IV (Abb. 10).

Für CD45RO, CD4 und CD8 ließen sich in beiden Patientengruppen keine klaren Trends erkennen.

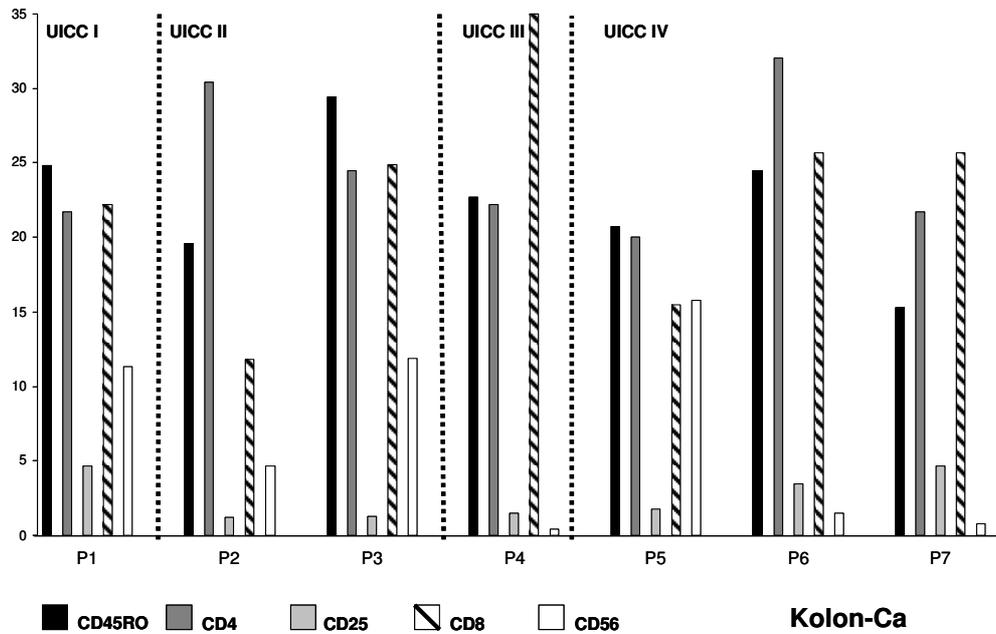


Abb. 9: Cytospin-Einfachfärbungen: Zelluläre Immunantwort bei Patienten mit kolorektalem Karzinom (n=14). Es wurden monoklonale Antikörper gegen CD45RO, CD4, CD25, CD8 und CD56 verwendet. Die Ergebnisse sind für Patienten mit Kolonkarzinom und Rektumkarzinom getrennt dargestellt. Außerdem wurden Präparate von vier Kontrollpersonen untersucht (nicht dargestellt). Zur Auswertung wurde jeder Cytospin zunächst bei 100-facher Vergrößerung durchgemustert. Bei 400-facher Vergrößerung wurden in einem Gesichtsfeld zunächst alle Zellen, dann nur die positiven Zellen innerhalb dieses Gesichtsfeldes gezählt. Es wurden so viele Gesichtsfelder ausgezählt, bis eine Gesamtzahl von 200-250 Zellen erreicht war. Die Ergebnisse sind dargestellt als „Anteil der positiven Zellen in %“. Dem Auswerter war nicht bekannt, welches Präparat er jeweils untersuchte. Abkürzungen: n.v.: nicht vorhanden, neg.: negativ = 0% positive Zellen, P: Patient. **Patienten mit Kolonkarzinom** (n=7) im UICC- Stadium IV haben mehr CD25-positive Zellen als Patienten im UICC-Stadium II (Kontrollen: 3%). Die meisten der UICC-IV-Patienten haben eine verminderte Anzahl von NK-Zellen (CD56+), während UICC- II-Patienten eine gesteigerte Anzahl dieser Zellen im Blut aufweisen (Kontrollen: 0,4%). Ca: Karzinom.

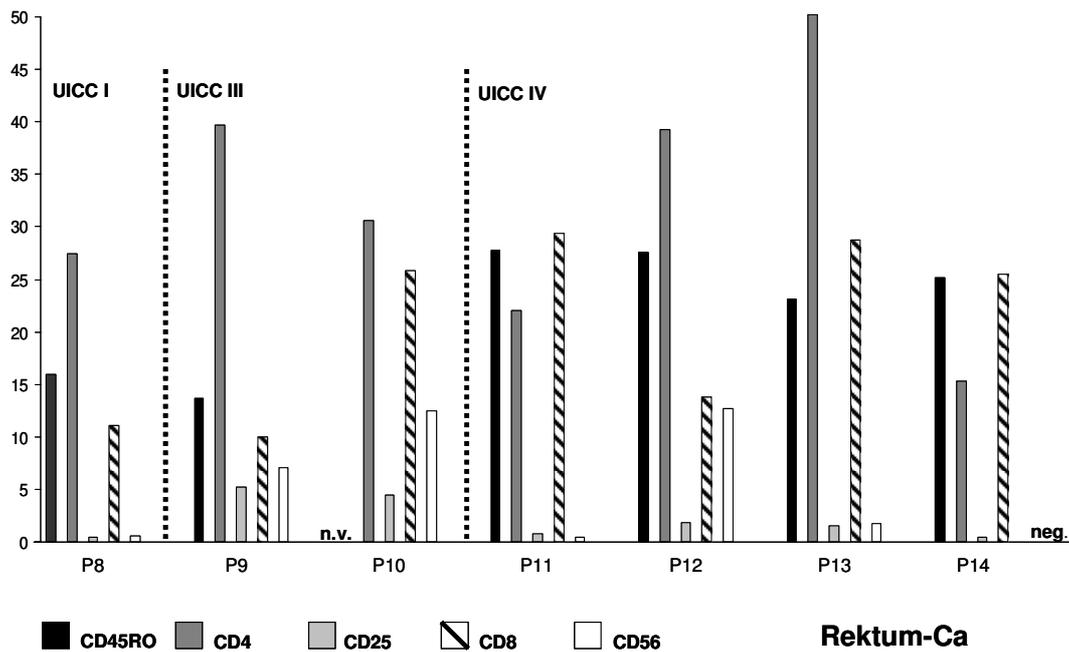


Abb. 10: Cytospin-Einfachfärbungen: Zelluläre Immunantwort bei Patienten mit kolorektalem Karzinom (n=14). Es wurden monoklonale Antikörper gegen CD45RO, CD4, CD25, CD8 und CD56 verwendet. Die Ergebnisse sind für Patienten mit Kolonkarzinom und Rektumkarzinom getrennt dargestellt. Außerdem wurden Präparate von vier Kontrollpersonen untersucht (nicht dargestellt). Zur Auswertung wurde jeder Cytospin zunächst bei 100-facher Vergrößerung durchgemustert. Bei 400-facher Vergrößerung wurden in einem Gesichtsfeld zunächst alle Zellen, dann nur die positiven Zellen innerhalb dieses Gesichtsfeldes gezählt. Es wurden so viele Gesichtsfelder ausgezählt, bis eine Gesamtzahl von 200-250 Zellen erreicht war. Die Ergebnisse sind dargestellt als „Anteil der positiven Zellen in %“. Dem Auswerter war nicht bekannt, welches Präparat er jeweils untersuchte. Abkürzungen: n.v.: nicht vorhanden, neg.: negativ = 0% positive Zellen, P: Patient. **Patienten mit Rektumkarzinom** (n=7): Bei UICC- III-Patienten fanden sich mehr CD25-positive Zellen als bei UICC-IV-Patienten. Patienten mit Rektumkarzinom im UICC-Stadium IV haben im Vergleich zu Kolonkarzinom-Patienten im UICC-Stadium IV weniger CD25-positive Zellen im peripheren Blut. Bei UICC-III-Patienten finden sich vermehrt CD56-positive Zellen, bei UICC-IV-Patienten ist die Population der NK-Zellen meist vermindert. Ca: Karzinom.

4.4.2 Nachweis von CD⁺CD25⁺ Lymphozyten aus dem peripher-venösen Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinom (Cytospins)

Mittels einer Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen CD4 und CD25 wurden 14 Patienten mit kolorektalem Karzinom auf das vermehrte Vorkommen von CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten im peripher-venösen Blut untersucht. Eine Vermehrung von CD4⁺CD25⁺ Zellen weist auf das Überwiegen einer Th2-Immunantwort hin. Weiterhin ist die Co-Expression von CD4 und CD25 auf der Zelloberfläche ein Hinweis auf regulatorische T(T_{reg})-Lymphozyten. Als Ergebnis fanden sich bei den Patienten mit den UICC-Stadien III und IV signifikant mehr CD4⁺CD25⁺ Zellen im peripheren Blut als bei Patienten der UICC-Stadien I und II (Abb. 11).

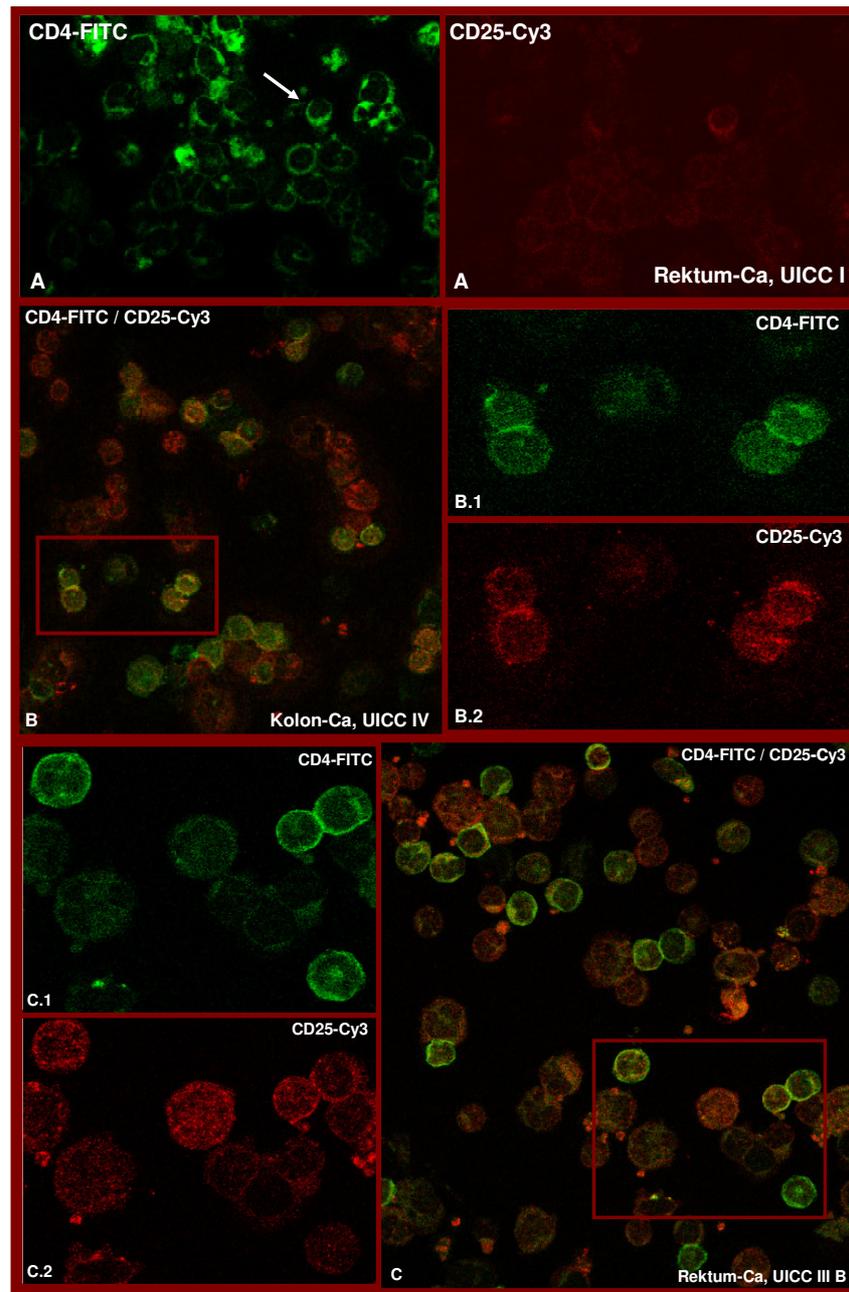


Abb. 11: Repräsentative Immunfluoreszenz-Färbungen von PBL aus dem peripher-venösen Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinom (n=14). CD4-positive Zellen sind grün dargestellt, CD25-positive Zellen färben sich rot an. Bei Patienten mit fortgeschrittenen Krankheitsstadien (UICC III/IV) fanden sich signifikant mehr CD4⁺CD25⁺ Zellen (Th2-Antwort) als bei Patienten der UICC-Stadien I und II. Abbildung A zeigt korrespondierende Abschnitte desselben Präparates eines Patienten im Stadium UICC I. Links findet sich die CD4-Darstellung, rechts die CD25-Darstellung. Es ist nur eine doppelt positive Zelle zu erkennen (Pfeil). Die Abbildungen B und C zeigen Präparate von Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung. In den großen Bildern sind die CD4-Darstellung und die CD25-Darstellung simultan gezeigt, CD4⁺CD25⁺ Zellen färben sich in dieser Darstellung gelb an. Die umrahmten Ausschnitte sind als Einzelfärbungen (CD4, CD25) herausvergrößert worden (B.1, B.2, C.1, C.2). Es sind drei bzw. vier doppelt positive Lymphozyten zu erkennen. Die Färbungsintensität (niedrig, mittel, hoch) und der Anteil der doppelt positiven Zellen wurde nach Mikroskopieren von jeweils 20 konsekutiven *high power fields* (400-fache Vergrößerung) bestimmt. Ca: Karzinom.

4.5 p53-spezifische T-Helfer-Zell-Reaktivität nach Stimulierung von Patienten-Lymphozyten mit synthetischen p53-Peptiden

In dieser Arbeit wurde die tumorspezifische Immunantwort bei Patienten mit kolorektalem Karzinom in Bezug auf die jeweiligen UICC-Stadien untersucht und vor allem die wt-p53-spezifische T_{reg}-Zell-Funktion der Patienten näher charakterisiert.

Nach Stimulation mit verschiedenen p53-Peptidpools fanden wir sowohl Determinanten, die zu einer Th2-Immunantwort (IL-10) führten, als auch Determinanten, die eine Th1-Immunantwort (IFN- γ) induzierten.

Wir beobachteten nach Stimulation mit p53-Peptiden der Sequenz AS 331-370 eine IFN- γ -Expression. Allerdings fand sich keine Korrelation zwischen den UICC-Stadien der Patienten und der Th1-Immunantwort (IFN- γ) (Abb. 12).

Eine IL-10-Produktion wurde durch die beiden Peptidpools mit den AS 1-50 und 291-330 induziert. Auffällig war, dass eine Korrelation zwischen dem UICC- Stadium der Patienten und der IL-10-Produktion nach Stimulation mit p53-Peptiden, welche die AS 1-50 umfassten, bestand. Bei Patienten der UICC-Stadien I und II (n=9) produzierte eine größere Anzahl von Th2-spezifischen Lymphozyten einen höheren Spiegel von IL-10 als Antwort auf Stimulation mit der Peptidsequenz AS 1-50 als die Lymphozyten der Patienten mit UICC-Stadium III (n=8) und IV (n=8) (Mittelwerte, UICC I/II: 135 spots/10⁵ Zellen vs. UICC III: 118 Spots/10⁵ Zellen und UICC IV: 90 Spots/10⁵ Zellen). Die PBL von Patienten mit UICC-Stadium III zeigten nach Stimulation mit dem Peptidpool AS 291-330 eine erniedrigte IL-10 Produktion (Mittelwerte, UICC I/II: 58 spots/10⁵ Zellen vs. UICC III: 26 Spots/10⁵ Zellen vs. UICC IV: 62 Spots/10⁵ Zellen) (Abb. 13).

Ein Ergebnis unserer Untersuchungen ist, dass nach Stimulation mit Peptidpools, welche die gesamte wt-p53-Peptidsequenz umfassen, die Determinanten überwiegen, die eine Th2-Immunantwort (IL-10) induzieren. Dies bedeutet auch, dass die Art der spezifischen Immunantwort gegen p53 von den präsentierten Determinanten des p53-Proteins abhängt.

Die Menge der IL-10-Produktion scheint die IFN- γ -Produktion zu übertreffen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass tumorspezifische Epitope von tumorspezifischen

Antigenen das Resultat der immunologischen *tumor surveillance* direkt beeinflussen könnten.

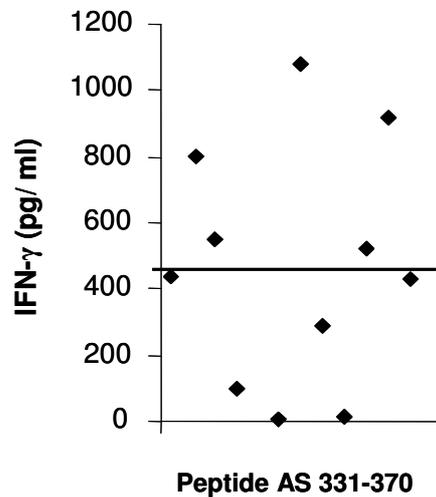


Abb. 12: IFN- γ -Produktion von PBL von Patienten mit kolorektalem Karzinom nach Stimulation mit wt-p53-Peptiden in Kultur (Aminosäuren (AS) 331-370). Die Menge der IFN- γ -Sekretion nach Stimulation mit anderen p53-Determinanten war vergleichbar mit der der Negativkontrollen. Jedes Viereck repräsentiert einen Patienten, die horizontale Linie markiert den Mittelwert der gemessenen IFN- γ -Sekretion (435 pg/ml). Die Überstände des ELISPOT-Assay wurden gesammelt und daraus mittels ELISA die IFN- γ -Produktion bestimmt. Es fand sich keine Korrelation der IFN- γ -Sekretion mit bestimmten UICC-Stadien.

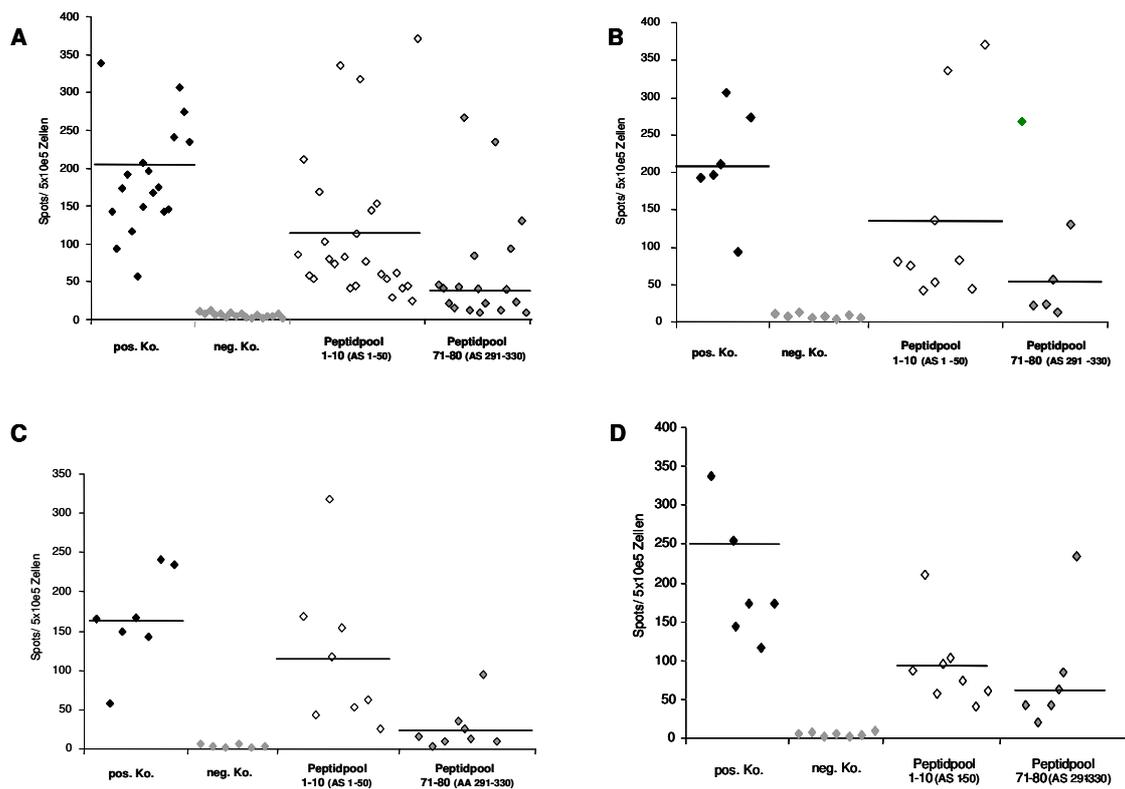


Abb. 13: IL-10-Expression von PBL von Patienten mit kolorektalem Karzinom (A = alle Patienten) nach Stimulation mit wt-p53-Peptiden in Kultur (AS 1-50 und AS 291-330) in den UICC-Stadien I/II (B), III (C) und IV (D). Die IL-10-Produktion nach Stimulation mit diesen Peptidpools zeigte eine Korrelation mit den UICC-Stadien der Patienten. Bei Patienten der UICC-Stadien I und II fanden sich mehr Th2-spezifische Lymphozyten, die höhere IL-10-Spiegel nach Stimulation mit der Peptidsequenz AS 1-50 produzierten, als bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumorstadien. Bei Patienten mit UICC-Stadium III wurde als Antwort auf Stimulation mit der Peptidsequenz 291-330 eine erniedrigte IL-10-Expression gemessen. Jedes Viereck repräsentiert einen Patienten, die horizontalen Balken markieren den Mittelwert der gemessenen IL-10-Expression (Spots/5x10⁵ Zellen). Schwarze Vierecke repräsentieren die gemessenen IL-10-Spots nach Stimulation mit PHA (Positivkontrolle), graue Vierecke die Spots mit Medium alleine (Negativkontrolle), weiße Vierecke die Spots nach Stimulation mit den Peptiden AS 1-50 und graue Vierecke mit schwarzem Rahmen die Spots nach Stimulation mit den Peptiden AS 291-330.

4.6 Mutationen von p53 und ihre Relation zur p53-spezifischen Immunantwort

Mit Hilfe der RT-PCR wurde mRNA aus biopsiertem Tumorgewebe von 16 Patienten mit kolorektalem Karzinom auf p53-Mutationen untersucht. Es wurden fünf verschiedene Punktmutationen an fünf verschiedenen Stellen der p53-Sequenz identifiziert (Basenpaar (bp) 82 C:G; Bp 300 T:C, bp 366 A:G, bp 686 T:C; bp 711

T:C). Davon waren vier im Bereich der *DNA binding core domain* lokalisiert. Die gefundenen Mutationen von p53 zeigten keine signifikante Assoziation zum Vorhandensein einer p53-spezifischen humoralen oder einer gesteigerten zellulären Immunantwort bei diesen Patienten. Weiterhin fand sich keine Korrelation zwischen spezifischen Mutationen und dem UICC-Stadium der Patienten (Tab. 7).

Tab. 7: Es wurde eine RT-PCR durchgeführt, um Mutationen von p53 bei 16 Patienten mit kolorektalem Karzinom nachzuweisen. Es konnten bei fünf Patienten fünf verschiedene Punktmutationen an jeweils verschiedenen Positionen der wt-p53-Sequenz detektiert werden. Vier dieser Mutationen lagen im Bereich der *DNA binding core domain*. Es bestand keine Korrelation zwischen dem Vorliegen bestimmter Mutationen und dem UICC-Stadium der Patienten.

Patient	UICC	Base	Mutation	Codon
1	II A	466	Wt: TCCCC G CGTG Mut: TCCCC C CGTG	52
2	IV	684	Wt: CAG C TGTGGG Mut: CAG T TGTGGG	125
3	II A	750	Wt: TCA C AGCACA Mut: TCA A AGCACA	147
4	I	1068	Wt: GTG C GTGTTT Mut: GTG T GTGTTT	253
5	II A	1095	Wt: AGAC C GGCGC Mut: AGAC T GGCGC	262

4.7 Nachweis Th2-spezifischer Genexpression bei tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL)

Mittels Real-Time-PCR untersuchten wir die Expression der für T_{reg}-Lymphozyten spezifischen Gene CD4, CD25, CTLA-4, Foxp3, GATA-3, GITR und IL-10.

In dieser Arbeit konnte eine erhöhte Expression dieser Gene im Tumorgewebe von Patienten mit UICC-Stadium II nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass die CD4⁺CD25⁺ Zellen in diesem Krankheitsstadium tatsächlich eine erhöhte Population von tumorspezifischen T_{reg}-Zellen einschließen (Abb. 14).

Weiterhin werden auch die typischen Gene für Effektorzellen (CD8, IFN- γ) und Apoptose (Fas/FasL) bei diesen Patienten (UICC II) vermehrt exprimiert. Bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung (UICC III/IV) war die Expression der spezifischen Gene für T_{reg}- und Effektorzellen dagegen signifikant vermindert ($p < 0,05$).

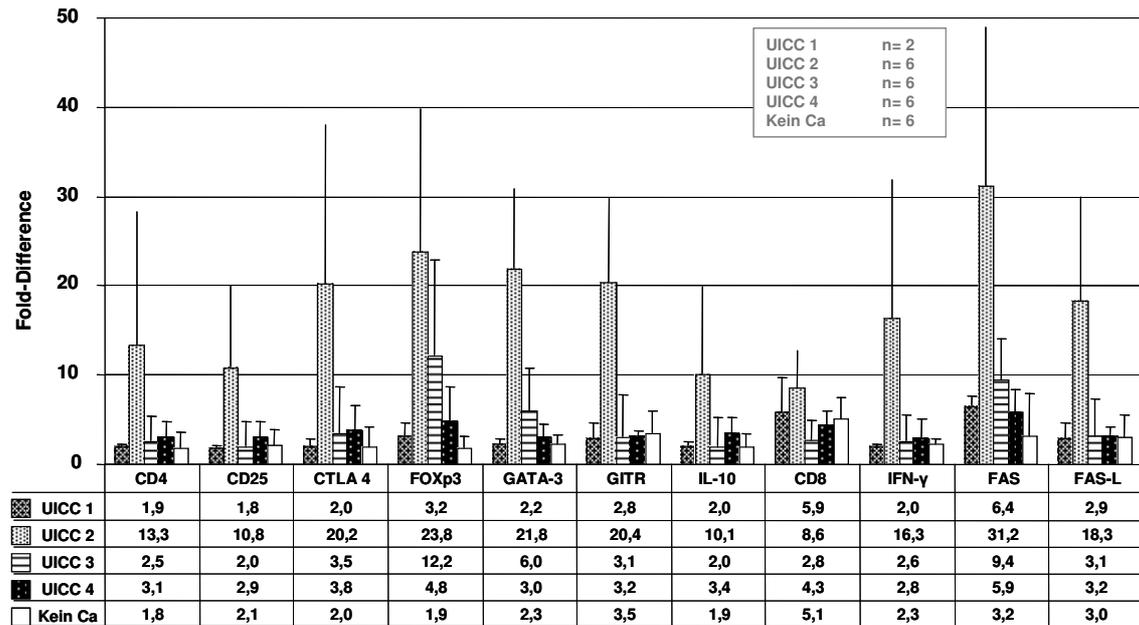


Abb. 14: Ergebnisse der Real-Time-PCR. Gezeigt ist die mRNA-Expression von IFN- γ und IL-10, T_{reg}-spezifischen (CD4, CD25, CTLA4, Foxp3, GATA-3, GITR) und Effektorzell-spezifischen (CD8) Markern sowie von Apoptose-Mediatoren (Fas, FasL) bei Patienten mit kolorektalem Karzinom unterschiedlicher UICC-Stadien. Bei Patienten im UICC-Stadium II fand sich eine gesteigerte Expression T_{reg}-spezifischer Gene im Tumorgewebe. Für Effektorzellen spezifische Gene (CD8, IFN- γ) und „Apoptose-Gene“ (Fas, FasL) wurden bei Patienten in diesem Stadium ebenfalls vermehrt exprimiert. Die Differenz (Δ Ct) zwischen den durchschnittlichen Ct-Werten der Proben in den Targetwells und solcher des *housekeeping genes*, GAPDH, wurde bestimmt. Dann wurde die Differenz ($\Delta\Delta$ Ct) zwischen den durchschnittlichen Δ Ct-Werten der Proben für jedes Target und dem Δ Ct-Wert der Kontrollprobe für dieses Target berechnet. Der relative Quantifizierungswert (*fold change*) errechnete sich als $2^{-\Delta\Delta$ Ct}. Kein Ca: Kein Karzinom.

4.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die p53-spezifische humorale und vor allem zelluläre Immunantwort bei Patienten mit kolorektalem Karzinom stellte den Schwerpunkt dieser Arbeit dar. Dabei wurde die Immunantwort auf Gen- und Proteinebene analysiert.

Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien (UICC III/IV) zeigten eine stärkere Akkumulation von p53 im Tumorgewebe als solche in frühen Krankheitsstadien. Weiterhin gelang bei dieser Patientengruppe vermehrt der Nachweis p53-positiver Zellen im peripheren Blut. Nur die Minderheit von 35% der untersuchten Patienten hatte p53-spezifische Antikörper im Serum. Hier bestand keine Korrelation zum UICC-Stadium. Schließlich ließ sich bei Patienten im UICC-Stadium III/IV eine gesteigerte Zahl von CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten im Blut detektieren.

Stimulation von PBL mit synthetischen p53-Peptidfragmenten der Sequenz AS 331-370 induzierte eine IFN- γ -Produktion, ohne dass eine Korrelation zu den UICC-Stadien bestand. Die Peptidpools mit den AS 1-50 und AS 291-330 stimulierten die Lymphozyten von Patienten im UICC-Stadium II dagegen zur Produktion von hohen IL-10-Spiegeln.

Auf Genebene war die Expression T_{reg}-spezifischer Gene (CD4, CD25, CTLA-4, Foxp3, GITR, GATA-3) im Tumor im UICC-Stadium II gesteigert und korrelierte folglich ebenfalls mit den UICC-Stadien der Patienten.

Zusammenfassend ließ sich bei den untersuchten Patienten mit kolorektalem Karzinom ein durch p53-Epitope induziertes Überwiegen des Th2-Zweiges der Th-Zell-Immunantwort feststellen.

5. Beantwortung der Fragen

1) *Sind p53-positive Zellen im peripheren Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinom nachweisbar?*

Bei 57 % der untersuchten Patienten (n=14) ließen sich eindeutig p53-positive Zellen im peripheren Blut nachweisen. Besonders bei Patienten der UICC-Stadien III/IV sowie bei der Subgruppe mit Rektumkarzinom gelang die Detektion p53-positiver Zellen.

2) *Finden sich bei den Patienten Antikörper gegen p53 im Serum? Besteht eine Korrelation zwischen Antikörperproduktion und UICC-Stadium?*

Nur 35% der untersuchten Patienten (n=40) hatten einen positiven p53-Antikörper-Status. Es bestand keine Korrelation zum UICC-Stadium und zu spezifischen p53-Mutationen.

3) *Besteht eine Korrelation zwischen der Zahl der CD4⁺CD25⁺ Zellen im peripheren Blut und dem UICC-Stadium der Patienten?*

In fortgeschrittenen Krankheitsstadien (UICC III/IV) lassen sich signifikant mehr CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten (Hinweis auf Dominanz der Th2-Immunantwort) im peripher-venösen Patientenblut nachweisen als in frühen Stadien.

4) *Induziert Stimulation mit synthetischen p53-Peptidfragmenten bei peripheren Blutlymphozyten (PBL) der Patienten eher eine Th1-Antwort (IFN- γ -Produktion) oder eine Th2-Antwort (IL-10-Produktion)?*

Stimulation mit p53-Peptiden der Sequenz AS 331-370 induzierte eine IFN- γ -Produktion. Diese korrelierte nicht mit den UICC-Stadien der Patienten.

Die Peptidpools mit den AS 1-50 und AS 291-330 stimulierten die Lymphozyten zur Produktion von IL-10. Hier zeigte sich eine Korrelation zum UICC-Stadium: In frühen

Stadien (UICC I/II) wurden höhere IL-10-Spiegel gemessen als in späten Krankheitsstadien.

Zusammenfassend überwiegen bei p53-Protein die Epitope, die eine Differenzierung der Lymphozyten in Richtung einer Th2-Antwort (IL-10) bewirken. Ein weiteres Ergebnis der Arbeit ist, dass die gefundenen p53-Mutationen nicht mit einer gesteigerten zellulären Immunantwort oder den UICC-Stadien assoziiert waren.

5) Korreliert die Expression von T_{reg}-spezifischen Genen im Tumor mit dem UICC-Stadium der Patienten?

In dieser Arbeit konnte mittels Real-Time-PCR eine erhöhte Expression der T_{reg}-spezifischen Gene CD4, CD25, CTLA-4, Foxp3, GATA-3, GITR sowie von IL-10 im Tumorgewebe von Patienten im UICC-Stadium II gemessen werden (n=20).

6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die humorale und zelluläre Immunität bei Patienten mit kolorektalem Karzinom untersucht, wobei der Schwerpunkt auf der spezifisch gegen p53 gerichteten T-Helfer-Zell-Immunantwort lag.

6.1 Akkumulation von p53 im Tumorgewebe

Die immunhistologische p53-Färbung von Tumorgewebe zeigte bei Patienten mit den UICC-Stadien III und IV eine signifikant ($p < 0,05$) stärkere Färbungsintensität als bei Patienten mit frühen Erkrankungsstadien. Dieses Ergebnis spiegelt die starke intrazelluläre Akkumulation von p53-Protein bei fortgeschrittenen Erkrankungsstadien wider (41).

6.2 Zirkulierende p53-positive Zellen im Blut von Patienten mit kolorektalem Karzinom

Auch im peripher-venösen Blut konnten wir bei 57% der untersuchten Patienten p53-positive Zellen mittels Cytospin nachweisen. Positive Zellen fanden sich vor allem bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung und hier vor allem bei Patienten mit Rektumkarzinom. Bei den p53-positiven Zellen scheint es sich nicht um artifiziell angefärbte Zellen zu handeln, da die Kontrollen komplett negativ waren. Auch bei den anderen von uns untersuchten Tumorarten wie Magen-, Pankreas- oder Nierenkarzinom lassen sich bei den Cytospins meist keine oder höchstens ganz vereinzelt p53-positive Zellen darstellen.

Andere Marker wie CK20 oder Her-2/neu erwiesen sich bei Patienten mit kolorektalem Karzinom als ungeeignet, um zirkulierende Tumorzellen nachweisen. Auch in der Literatur finden sich Hinweise dafür, dass CK20 und EMA häufig falsch positiv sind (42, 43).

6.3. Allgemeine und spezifisch gegen p53 gerichtete humorale Immunantwort

Mittels Cytospin wurde die humorale Immunantwort zunächst allgemein untersucht. Die Tumorpatienten zeigten eine signifikant ($p < 0,05$) niedrigere Zahl an B-Lymphozyten ($CD45RA^+$) als die Kontrollpersonen. Auch der Prozentsatz an IgG-positiven Zellen war in der Patientengruppe geringer. Es ließ sich allerdings keine Korrelation zum UICC-Stadium der Patienten feststellen. Für IgM-positive Zellen ließ sich kein klarer Trend ausmachen. Ein Grund hierfür könnte sein, dass kein spezifisches IgM gemessen wurde und neben dem Malignom zahlreiche andere Faktoren wie z.B. interkurrierende Infekte die IgM-Produktion beeinflussen können.

Mehrere *in vivo* Studien sowohl an Mausmodellen als auch an Tumorpatienten beschreiben neben einer zellulären auch eine humorale Immunantwort gegen p53 (44-50). In einer der Arbeiten wurde das Vorhandensein von zirkulierenden Antikörpern gegen p53-Protein bei Patientinnen mit Mammakarzinom beschrieben (51). Allerdings lassen sich diese Antikörper nur bei etwa 30% aller Malignome nachweisen. Die Detektion von zirkulierenden Antikörpern gegen p53-Protein ist bei Patienten mit Brust- und Magenkrebs sowie bei Patienten mit kolorektalem Karzinom mit fortgeschrittenen Tumorstadien und schlechten Überlebensraten assoziiert (52).

In dieser Arbeit wurden die Seren von Patienten mit kolorektalem Karzinom unter Anwendung eines ELISA auf das Vorhandensein von Anti-p53-Autoantikörpern untersucht. Insgesamt fanden sich Anti-wt-p53-spezifische IgG-Antikörper bei 35% der untersuchten Patienten, d.h., die Mehrheit der Patienten hatte einen negativen Anti-p53-IgG-Antikörperstatus. Das Vorhandensein von p53-spezifischen Antikörpern korrelierte mit einer starken p53-Expression im Tumorgewebe. Hier zeigt sich eine Übereinstimmung mit früheren Arbeiten, die eine Korrelation zwischen starker intrazellulärer Akkumulation von p53 und dem Vorhandensein einer gegen p53 gerichteten humoralen Immunantwort beschreiben (53). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Mechanismen, die der Bildung von Anti-p53-Autoantikörpern zu Grunde liegen und vor allem die Relevanz einer spezifisch gegen p53 gerichteten humoralen Immunantwort *in vivo* nach wie vor nicht ausreichend bekannt sind.

6.4 Zelluläre Immunantwort bei Patienten mit kolorektalem Karzinom

6.4.1 Zelluläre Immunantwort im peripheren Blut

Auch die zelluläre Immunantwort der Patienten mit kolorektalem Karzinom wurde mittels Cytospins zunächst allgemein analysiert. In der Untergruppe der Patienten mit Kolonkarzinom fiel eine verminderte Zahl an NK-Zellen (CD56⁺) im peripher-venösen Blut bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung auf. In den UICC-Stadien I und II war die Zahl der NK-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen dagegen erhöht. Bei den Patienten mit Rektumkarzinom waren die NK-Zellen im UICC-Stadium IV ebenfalls erniedrigt, im Stadium UICC III dagegen erhöht.

Dies könnte bedeuten, dass vor allem im UICC-Stadium IV keine effektive NK-Zell-Antwort mehr stattfindet. In früheren Stadien scheinen die NK-Zellen dagegen aktiviert zu sein. Weitere Experimente (Tunel-Assay) unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass bei Patienten mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium vermehrt NK-Zellen apoptotisch werden (bisher unpublizierte Daten).

Es ist bekannt, dass T_{reg}-Lymphozyten CD25 konstitutiv exprimieren (54). Die Einfachfärbung gegen CD25 zeigte, dass Kolonkarzinom-Patienten im UICC-Stadium IV mehr CD25⁺ Zellen im peripheren Blut haben als Patienten im UICC-Stadium II. Bei Patienten mit Rektumkarzinom sind die CD25⁺ Zellen dagegen erniedrigt.

6.4.2 Nachweis von CD4⁺CD25⁺ Zellen im peripheren Blut

Um die CD25⁺ Zellen näher charakterisieren zu können, wurden Cytospins mit einer Immunfluoreszenz-Doppelfärbung gegen CD4 und CD25 angefertigt. CD4⁺CD25⁺ Zellen sind neben anderen Markern typisch für T_{reg}-Zellen und bei Dominanz einer Th2-Immunantwort erhöht. Bei den untersuchten Patienten fanden wir einen erhöhten Anteil an CD4⁺CD25⁺ Zellen im peripheren Blut bei Patienten mit fortgeschrittenen Krankheitsstadien (UICC III/IV).

In einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe wurde der Anteil der CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten an allen TIL im Tumorgewebe immunhistochemisch bestimmt. Auch hier

waren die CD4⁺CD25⁺ TIL in fortgeschrittenem Tumorstadium erhöht (bisher unpublizierte Daten).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in bestimmten Stadien der Tumorgenese der Anteil der CD4⁺CD25⁺ Zellen erhöht ist. Dies spricht für ein Überwiegen des Th2-Zweiges der Immunantwort und könnte eine mögliche Erklärung dafür bieten, warum das Karzinom nicht durch das körpereigene Immunsystem angegriffen wird (55).

6.4.3 p53-spezifische Th-Zell-Immunität

Bei Patientinnen mit Mammakarzinomen, welche mutiertes p53 exprimierten, konnte eine *in vitro* Proliferation von PBL beobachtet werden, wenn p53-Protein im Kulturmedium vorhanden war (48). Verschiedene Arbeitsgruppen wiesen nach Immunisierung von Mäusen eine gegen p53-Protein gerichtete CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellantwort *in vivo* nach (16, 56). Bei Melanompatienten wurden zirkulierende tumorspezifische Anti-p53 CD8⁺ T-Lymphozyten im Blut gefunden, die allerdings zu einer Tumoreradikation nicht in der Lage waren (57, 58).

Die genannten Studien beweisen, dass während der Tumorgenese spezifisch gegen p53 gerichtete CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten generiert werden. Die exakten p53-Determinanten, die durch die Th-Zellen erkannt werden, sowie der genaue funktionelle Status dieser Zellen sind nach wie vor unbekannt.

Fedoseyeva et al. zeigten, dass auch in der Peripherie des adulten Immunsystems von Mäusen T-Zellen vorhanden sind, die spezifisch gegen bestimmte wt-p53-Determinanten gerichtet sind. Diese Zellen konnten nach Immunisierung der an Tumoren erkrankten Mäuse mit p53-Peptiden spezifisch aktiviert werden (16).

In dieser Arbeitsgruppe wurde die Immunantwort von Mäusen, denen syngeneische J774 metastatische Sarkome inokuliert worden waren, untersucht. Die Mäuse bildeten eine potente CD4⁺ T-Zellantwort gegen p53 aus. Die T-Lymphozyten erkannten sowohl mutierte p53-Abschnitte als auch ursprünglich kryptische wt-p53-Determinanten. Die letztgenannte Beobachtung stützt die Hypothese, dass p53 im Rahmen der Tumorentwicklung immunogen wird.

Bisher wurde die Frage, welche dominanten und kryptischen Determinanten des p53-Proteins Toleranz gegenüber dem Tumorgewebe anstelle eines Angriffs des Tumors induzieren, kaum analysiert. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit T-Lymphozyten von Patienten mit kolorektalem Karzinom *in vitro* mit sich überlappenden wt-p53-Peptiden stimuliert und die Produktion von IL-10 und IFN- γ mittels ELISPOT bzw. ELISA gemessen.

Es existieren sowohl p53-Determinanten, die Th2-Zellen zur IL-10-Produktion anregen, als auch Determinanten die eine Sekretion von IFN- γ durch Th1-Zellen bewirken. Diese Determinanten waren am N- bzw. C-terminalen Ende des p53-Proteins lokalisiert. In dieser Arbeit zeigte sich eine Korrelation zwischen dem UICC-Stadium der Patienten und der IL-10 Produktion nach Stimulierung mit Peptiden der Sequenz AS 1-50: Bei Patienten in den UICC-Stadien I und II produzierten mehr Th2-spezifische Lymphozyten höhere IL-10-Spiegel als bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung (UICC III/IV). Dagegen wurde nach Stimulierung von Lymphozyten von Patienten im UICC-Stadium III mit dem Peptidpool der Sequenz AS 291-330 eine verminderte IL-10-Sekretion beobachtet. p53-Peptide mit der Sequenz AS 331-370 führten zur IFN- γ -Expression, allerdings wurde hier keine Korrelation zum UICC-Stadium gefunden.

Diese Ergebnisse sind konsistent mit früheren Experimenten der Arbeitsgruppe um Fedoseyeva et al. in einem murinen Modell, die aufzeigen, dass T-Lymphozyten auf Stimulierung mit verschiedenen p53-Peptiden in Abhängigkeit vom Stadium der Metastasierung antworten (16).

Unsere Resultate legen nahe, dass der Typ der spezifischen Anti-Tumor-Antwort gegen p53 in frühen Stadien des kolorektalen Karzinoms von der Präsentation und Erkennung von spezifischen wt-p53-Determinanten abhängt. Weiterhin scheint die Mehrheit der immunogenen p53-Determinanten bei Patienten mit kolorektalem Karzinom eine Aktivierung von IL-10-produzierenden T-Zellen zu induzieren. Diese Beobachtung eines Überwiegens der Th2-Immunantwort bei den Patienten könnte eine mögliche Erklärung für das Scheitern einer effektiven immunologischen Tumorbekämpfung bieten.

Unsere Ergebnisse zeigen weiterhin, dass bestimmte Epitope von TAA direkt das *Outcome* der immunologischen *Tumorsurveillance* beeinflussen könnten, indem sie beispielsweise Toleranz gegenüber dem Tumor induzieren.

6.5 Zusammenhang zwischen Mutationen im p53-Gen und der Immunantwort gegen p53

Mittels RT-PCR wurden in dieser Arbeit fünf verschiedene Punktmutationen an fünf verschiedenen Stellen der p53-Sequenz identifiziert, wovon vier im Bereich der *DNA binding core domain* lokalisiert waren. Die Determinanten, die eine IL-10- bzw. IFN- γ -Produktion induzierten, sind dagegen am N- bzw. C-terminalen Ende des p53-Proteins gelegen. Sowohl die p53-spezifische humorale als auch die zelluläre Immunantwort zeigten keine signifikante Assoziation zu Mutationen im p53-Gen. Diese Ergebnisse stimmen mit denen früherer Arbeiten überein, die eine fehlende Korrelation zwischen p53-spezifischen T-Zell-Immunantworten und p53-Genmutationen bei Patienten mit kolorektalem Karzinom fanden (44). Dies spricht für das Vorhandensein von T-Zell-Antworten vor allem gegen konservierte Regionen des p53-Antigens.

6.6 Expression Th2-spezifischer Gene durch tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL)

Unsere Untersuchungen zeigen, dass im Tumorgewebe von Patienten im UICC-Stadium II für T_{reg}-Lymphozyten spezifische Gene wie CD4, CD25, Foxp3, GATA-3, GITR und IL-10 vermehrt exprimiert werden. Dies bedeutet, dass die CD4⁺CD25⁺ Zellen in diesem Krankheitsstadium tatsächlich eine erhöhte Population von tumorspezifischen T_{reg}-Zellen einschließen. Weiterhin zeigen auch die typischen Gene für Effektorzellen (CD8, IFN- γ) und Apoptose (Fas/FasL) bei diesen Patienten (UICC II) eine vermehrte Expression.

Bei Patienten in den UICC-Stadien III und IV war die Expression der spezifischen Gene für T_{reg}-Zellen und Effektorzellen dagegen signifikant vermindert ($p < 0,05$). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass schon in frühen Stadien der Karzinomentwicklung Ereignisse stattfinden, die für das weitere Schicksal der Anti-Tumor-Immunantwort entscheidend sind (55).

6.7 Kritik

Vergleiche verschiedener Zytokine sollten stets sorgfältig durchgeführt werden. Unterschiede bei der Transkription, Prozessierung und Sekretion eines jeden Zytokins und die Verwendung verschiedener Antikörper und anderer Reagenzien für ELISPOT, ELISA und Real-Time-PCR erschweren die quantitative Evaluation verschiedener Zytokine. Obwohl beobachtet wurde, dass bei einigen Zytokinen die Zahl der Spots im ELISPOT und die Menge an RNA oder sezerniertem Protein nicht eng korrelierten (47), wurde für die Th2-spezifischen Zytokine eine starke Korrelation der Ergebnisse von ELISA, ELISPOT und Real-Time-PCR nachgewiesen (48).

Aus Gründen der mangelnden Verfügbarkeit von Zellen konnte in dieser Arbeit kein IL-10-ELISA oder IFN- γ -ELISPOT durchgeführt werden. Dennoch zeigen unsere Ergebnisse eine Übereinstimmung mit anderen Studien, welche schlussfolgerten, dass bei Patienten mit kolorektalem Karzinom eine mögliche Th1-Immunantwort durch eine überwiegende Th2-Immunantwort supprimiert sein könnte (40). Nachdem in dieser Arbeit die entscheidenden p53-Peptidpools bestimmt wurden, die die Lymphozyten zur Produktion von Zytokinen stimulierten, werden in unserer Arbeitsgruppe weitere Experimente durchgeführt, um festzustellen, welche exakten Determinanten für die Differenzierung der Lymphozyten in die Th1- oder Th2-Richtung verantwortlich sind.

6.8 Schlussfolgerung

Auch wenn schon seit langem bekannt ist, dass die meisten Tumoren potentielle Ziele einer Immuntherapie sind und in den meisten Fällen eine Immunantwort gegen sie induziert wird (59-61), ist die Frage nach der optimalen klinischen Anwendung der bisherigen Forschungsergebnisse nach wie vor ungelöst. Noch sind nicht alle *Escape*-Mechanismen bekannt und verstanden, die es dem Tumor ermöglichen, der körpereigenen *Immunosurveillance* zu entgehen. In dieser Arbeit stellen wir einen weiteren solchen Mechanismus vor, der auch auf andere TAA als p53 und auf andere Tumorentitäten übertragen werden könnte:

Aus dieser Arbeit lässt sich schlussfolgern, dass der Tumor selbst durch Überexpression von p53 direkt das *Outcome* der immunologischen *Surveillance* bei Patienten mit kolorektalem Karzinom beeinflussen könnte. Dies scheint vor allem für die frühen Phasen der Tumorgenese zu gelten. Die Überexpression von p53 könnte zu einem Überwiegen der Induktion von p53-spezifischen Th2-Lymphozyten und konsekutiv zu einer Inhibition der Th1-Immunantwort durch immunsuppressive Zytokine wie IL-10 führen. Dies stellt nach unserem Kenntnisstand einen in der Literatur bisher noch nicht beschriebenen Tumor-*Escape*-Mechanismus dar. Aus zahlreichen Studien aus dem Bereich der Transplantationsimmunologie ist bekannt, dass Immunantworten vom Th2-Typ eher zur Toleranz als zur Abstoßung von Fremdgewebe führen (62). Wenn man daher das Malignom als „modifiziertes körpereigenes Gewebe“ ähnlich eines transplantierten Organs betrachtet, könnte es die Überexpression von p53 dem Tumor ermöglichen, die Anti-Tumor-Aktivität des körpereigenen Immunsystems durch Stimulation von Th-2-Lymphozyten zu hemmen (62, 63).

Unsere Ergebnisse könnten auch eine Erklärung dafür bieten, warum p53-Mutationen mit p53-Überexpression häufiger bei zahlreichen Malignomen mit schlechter Prognose gefunden werden (64, 65). Eine weitere Erkenntnis aus der vorliegenden Arbeit ist, dass die Immunantwort durch T_{reg}- und Effektor-T-Lymphozyten in den fortgeschrittenen UICC-Stadien III und IV herunterreguliert ist. Dies unterstreicht, dass für das Schicksal der immunologischen Anti-Tumor-Antwort entscheidende Ereignisse schon in frühen Stadien der Tumorentwicklung des kolorektalen Karzinoms stattzufinden scheinen.

Zwei zusätzliche Mechanismen könnten das Scheitern einer effektiven Anti-Tumor-Immunantwort bei Patienten mit kolorektalem Karzinom erklären. Zum einen ist das Milieu in der Darmmukosa und –submukosa eher antientzündlich als proentzündlich. In dieser Umgebung wird die suffiziente Übertragung von proinflammatorischen Signalen an dendritische Zellen behindert, so dass diese in einem unreifen Zustand verbleiben (66). Zum anderen zeigen diese Arbeit und andere Veröffentlichungen, dass kolorektale Karzinome früher Stadien noch zu wenig Volumen haben könnten, um genügend p53-Peptide zu produzieren, wie es für eine effektive Prozessierung durch antigenpräsentierende Zellen notwendig ist.

6.9 Zukünftige therapeutische Optionen/Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen die folgenden therapeutischen Optionen nahe: Durch eine externe Modifikation der Cytokin-Expression müsste bei Tumoren mit intrazellulärer p53-Akkumulation unter bestimmten Umständen ein spezifisch gegen p53 gerichteter Anti-Tumor-Angriff durch das körpereigene Immunsystem induzierbar sein. Denkbare Wege, den *Shift* in die Th1-Richtung zu erreichen, sind der Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen IL-10 oder CTLA-4 bzw. eine gezielte Depletion von T_{reg}-Zellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bieten eine mögliche Erklärung für das Scheitern einiger klinischer Vakzinierungsversuche. Das Schicksal der Anti-Tumor-Immunantwort scheint schon in frühen Phasen der Tumorprogression festgelegt zu werden. Es könnte daher sein, dass diese Versuche zu spät in der Tumorentwicklung zur Anwendung kamen. Die Patienten müssten demnach schon in möglichst frühen UICC-Stadien immuntherapeutisch behandelt werden. Dies setzt aber auch eine weitere Verfeinerung der Diagnostik zur Früherkennung voraus.

7. Zusammenfassung

Trotz radikaler chirurgischer Resektion kommt es bei Patienten mit kolorektalem Karzinom häufig zum Tumorrezidiv. In unserem Patientenkollektiv (n=51) erlitten innerhalb von 3 Jahren 18% der Patienten ein Rezidiv nach kurativer R0-Resektion. Eine mögliche Erklärung dafür wird in einer Suppression der Anti-Tumor-Immunantwort gesehen, die eine vollständige immunologische Tumorerstörung verhindert. Regulatorische T(T_{reg})-Lymphozyten spielen hierbei eine wesentliche Rolle. Der Nachweis dieser Zellen und deren gesteigerte IL-10-Produktion könnte eine mögliche Erklärung für die hohe Rezidivrate bei Patienten mit kolorektalem Karzinom bieten. Ziel unserer Untersuchungen war es daher, die tumorspezifische Immunantwort bei Patienten mit kolorektalem Karzinom stadienabhängig (UICC I-IV) zu untersuchen und im Blut und Tumor vorhandene T-Zellen sowohl morphologisch als auch funktionell zu charakterisieren. Als tumorspezifisches Antigen wurde das Tumorsuppressorgen p53 gewählt, da es in bis zu 60% aller kolorektalen Karzinome überexprimiert wird.

Präoperativ gewonnene periphere Blutlymphozyten (PBL) dieser Patienten wurden mit überlappenden synthetischen Peptidfragmenten der gesamten Wildtyp-p53-Proteinsequenz stimuliert und anhand der resultierenden Zytokinproduktion (IL-10, IFN- γ) verglichen (ELISPOT, ELISA). Sowohl Cytospinpräparate der PBL als auch Tumorgewebe wurden immunhistologisch in Einzel- und Doppelfärbung charakterisiert. Mittels ELISA wurde das Serum der Patienten auf das Vorhandensein von p53-Antikörpern untersucht. Spezifische p53-Mutationen und die Expression von T_{reg} -spezifischen Genen im Tumorgewebe wurden mittels Real-Time-PCR analysiert.

Nur bei 35 % der untersuchten Patientensera (n=40) fanden sich p53-spezifische Antikörper, wobei keine Korrelation zum UICC-Stadium bestand. Es zeigte sich, dass sich die p53-Peptide, die eine IFN- γ Produktion hervorrufen, von denen unterscheiden, die eine IL-10 Expression induzieren. Unabhängig von spezifischen p53-Mutationen spielte dabei das UICC-Stadium für die IL-10-Produktion eine besondere Rolle. So produzierten nach Peptid-Stimulation T-Zellen von Patienten im UICC-Stadium II wesentlich mehr IL-10 als T-Zellen von Patienten fortgeschrittener Stadien. Für die IFN- γ -Produktion fand sich keine Korrelation zum UICC-Stadium. Die

immunhistologischen Untersuchungen zeigten, dass Patienten höherer Stadien (UICC III/IV) mehr CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten im Blut und eine stärkere p53-Akkumulation im Tumor aufwiesen als Patienten niedrigerer Stadien. Die Expression T_{reg}-spezifischer Gene (CD4, CD25, CTLA-4, Foxp3, GITR, GATA-3) im Tumor korrelierte ebenso mit dem UICC-Stadium und war im UICC-Stadium II gesteigert.

p53 induziert sowohl eine IFN- γ - als auch eine IL-10-Expression. Das Überwiegen der IL-10-Produktion deutet darauf hin, dass p53-spezifische T_{reg}-Zellen direkt an der Modulation der Anti-Tumor-Immunantwort beteiligt sind. Durch Überexpression von p53 induziert der Tumor selbst eine Th2-Immunantwort, die zu vermehrter Toleranz des Tumors durch die Lymphozyten führt. Dies stellt einen neuen möglichen Tumor-*Escape*-Mechanismus dar. Sowohl die IL-10 Spiegel im Blut als auch die Expression T_{reg}-spezifischer Gene im Tumorgewebe korrelieren mit dem Stadium der Erkrankung. Dieser Sachverhalt könnte eine Erklärung für die schlechte Prognose und hohe Rezidivhäufigkeit von Patienten mit bereits weit fortgeschrittenen Karzinomen bieten. Die Ergebnisse der Arbeit eröffnen darüber hinaus neue Therapieoptionen: Eine Verschiebung der Anti-Tumor-Immunantwort hin zur vollständigen immunologischen Tumorerstörung (Th1) wäre in Form einer spezifischen Anti-IL-10-Antikörperapplikation oder einer gezielten Depletion der tumorspezifischen T_{reg}-Zellen denkbar.

8. Literaturverzeichnis

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(2):74-108
2. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319(9):525-32
3. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW: APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992; 359(6392):235-7
4. Cho KR, Vogelstein B: Suppressor gene alterations in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *J Cell Biochem Suppl* 1992; 16G:137-41
5. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S, Vogelstein B: p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1990; 50(23):7717-22
6. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC: p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253(5015):49-53.
7. Offringa R, Vierboom MP, van der Burg SH, Erdile L, Melief CJ: p53: a potential target antigen for immunotherapy of cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 910:223-33; discussion 233-6
8. Lane DP: Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358(6381):15-6.
9. Oren M, Damalas A, Gottlieb T, Michael D, Taplick J, Leal JF, Maya R, Moas M, Seger R, Taya Y, Ben-Ze'Ev A: Regulation of p53: intricate loops and delicate balances. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 973:374-83.
10. Ullrich SJ, Anderson CW, Mercer WE, Appella E: The p53 tumor suppressor protein, a modulator of cell proliferation. *J Biol Chem* 1992; 267(22):15259-62.
11. Chene P: Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(2):102-9.
12. Hernandez J, Ko A, Sherman LA: CTLA-4 blockade enhances the CTL responses to the p53 self-tumor antigen. *J Immunol* 2001; 166(6):3908-14.

13. Rogel A, Popliker M, Webb CG, Oren M: p53 cellular tumor antigen: analysis of mRNA levels in normal adult tissues, embryos, and tumors. *Mol Cell Biol* 1985; 5(10):2851-5.
14. Bargonetti J, Manfredi JJ: Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Curr Opin Oncol* 2002; 14(1):86-91.
15. Haupt Y, Robles AI, Prives C, Rotter V: Deconstruction of p53 functions and regulation. *Oncogene* 2002; 21(54):8223-31.
16. Fedoseyeva EV, Boisgerault F, Anosova NG, Wollish WS, Arlotta P, Jensen PE, Ono SJ, Benichou G: CD4+ T cell responses to self- and mutated p53 determinants during tumorigenesis in mice. *J Immunol* 2000; 164(11):5641-51
17. Mayordomo JI, Loftus DJ, Sakamoto H, De Cesare CM, Appasamy PM, Lotze MT, Storkus WJ, Appella E, DeLeo AB: Therapy of murine tumors with p53 wild-type and mutant sequence peptide-based vaccines. *J Exp Med* 1996; 183(4):1357-65
18. Vierboom MP, Bos GM, Ooms M, Offringa R, Melief CJ: Cyclophosphamide enhances anti-tumor effect of wild-type p53-specific CTL. *Int J Cancer* 2000; 87(2):253-60
19. Coffman RL, Mocchi S, O'Garra A: The stability and reversibility of Th1 and Th2 populations. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 238:1-12
20. Mosmann TR, Sad S: The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17(3):138-46.
21. Wang X, Mosmann T: In vivo priming of CD4 T cells that produce interleukin (IL)-2 but not IL-4 or interferon (IFN)-gamma, and can subsequently differentiate into IL-4- or IFN-gamma-secreting cells. *J Exp Med* 2001; 194(8):1069-80.
22. Coffman RL, Reiner SL: Instruction, selection, or tampering with the odds? *Science* 1999; 284(5418):1283, 1285.
23. van der Burg SH, de Cock K, Menon AG, Franken KL, Palmén M, Redeker A, Drijfhout J, Kuppen PJ, van de Velde C, Erdile L, Tollenaar RA, Melief CJ, Offringa R: Long lasting p53-specific T cell memory responses in the absence of anti-p53 antibodies in patients with resected primary colorectal cancer. *Eur J Immunol* 2001; 31(1):146-55

24. Zwaveling S, Vierboom MP, Ferreira Mota SC, Hendriks JA, Ooms ME, Suttmuller RP, Franken KL, Nijman HW, Ossendorp F, Van Der Burg SH, Offringa R, Melief CJ: Antitumor efficacy of wild-type p53-specific CD4(+) T-helper cells. *Cancer Res* 2002; 62(21):6187-93
25. Melief CJ, Toes RE, Medema JP, van der Burg SH, Ossendorp F, Offringa R: Strategies for immunotherapy of cancer. *Adv Immunol* 2000; 75:235-82
26. Zwaveling S, Van der Burg SH, Menon AG, Melief CJ, Offringa R: Immunotherapy of cancer through targeting of the p53 tumor antigen. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2002; 50(5):297-305
27. Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H: The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med* 1998; 188(12):2357-68
28. Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, Perricaudet M, Tursz T, Maraskovsky E, Zitvogel L: Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* 1999; 5(4):405-11
29. Romani N, Ratzinger G, Pfaller K, Salvenmoser W, Stossel H, Koch F, Stoitzner P: Migration of dendritic cells into lymphatics-the Langerhans cell example: routes, regulation, and relevance. *Int Rev Cytol* 2001; 207:237-70
30. Griffith TS, Wiley SR, Kubin MZ, Sedger LM, Maliszewski CR, Fanger NA: Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J Exp Med* 1999; 189(8):1343-54
31. de Vries TJ, Fourkour A, Wobbes T, Verkroost G, Ruiters DJ, van Muijen GN: Heterogeneous expression of immunotherapy candidate proteins gp100, MART-1, and tyrosinase in human melanoma cell lines and in human melanocytic lesions. *Cancer Res* 1997; 57(15):3223-9
32. Jager E, Ringhoffer M, Karbach J, Arand M, Oesch F, Knuth A: Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8+ cytotoxic-T-cell responses: evidence for immunoselection of antigen-loss variants in vivo. *Int J Cancer* 1996; 66(4):470-6

33. Cabrera T, Angustias Fernandez M, Sierra A, Garrido A, Herruzo A, Escobedo A, Fabra A, Garrido F: High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive breast carcinomas. *Hum Immunol* 1996; 50(2):127-34
34. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, Lopez-Botet M, Duggan-Keen M, Stern PL: Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 1997; 18(2):89-95
35. Algarra I, Collado A, Garrido F: Altered MHC class I antigens in tumors. *Int J Clin Lab Res* 1997; 27(2):95-102
36. Schwartz RH: A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990; 248(4961):1349-56
37. Chen L, McGowan P, Ashe S, Johnston J, Li Y, Hellstrom I, Hellstrom KE: Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *J Exp Med* 1994; 179(2):523-32
38. De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G, Urbain J, Leo O, Moser M: Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol* 1997; 27(5):1229-35
39. Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, Carbone DP, Gabrilovich DI: Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6(5):1755-66
40. Menon AG, Janssen-van Rhijn CM, Morreau H, Putter H, Tollenaar RA, van de Velde CJ, Fleuren GJ, Kuppen PJ: Immune system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis. *Lab Invest* 2004; 84(4):493-501
41. Manne U, Myers RB, Moron C, Poczatek RB, Dillard S, Weiss H, Brown D, Srivastava S, Grizzle WE: Prognostic significance of Bcl-2 expression and p53 nuclear accumulation in colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 1997; 74(3):346-58
42. Davidson BR, Sams VR, Styles J, Deane C, Boulos PB: Detection of occult nodal metastases in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 1990; 65(4):967-70

43. Rosenberg R, Friederichs J, Gertler R, Hoos A, Mueller J, Nahrig J, Nekarda H, Siewert JR: Prognostic evaluation and review of immunohistochemically detected disseminated tumor cells in peritumoral lymph nodes of patients with pN0 colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19(5):430-7
44. Chen HL, Carbone DP: p53 as a target for anti-cancer immunotherapy. *Mol Med Today* 1997; 3(4):160-7.
45. Fujita H, Senju S, Yokomizo H, Saya H, Ogawa M, Matsushita S, Nishimura Y: Evidence that HLA class II-restricted human CD4+ T cells specific to p53 self peptides respond to p53 proteins of both wild and mutant forms. *Eur J Immunol* 1998; 28(1):305-16.
46. Winter SF, Minna JD, Johnson BE, Takahashi T, Gazdar AF, Carbone DP: Development of antibodies against p53 in lung cancer patients appears to be dependent on the type of p53 mutation. *Cancer Res* 1992; 52(15):4168-74
47. Vennegoor CJ, Nijman HW, Drijfhout JW, Vernie L, Verstraeten RA, von Mensdorff-Pouilly S, Hilgers J, Verheijen RH, Kast WM, Melief CJ, Kenemans P: Autoantibodies to p53 in ovarian cancer patients and healthy women: a comparison between whole p53 protein and 18-mer peptides for screening purposes. *Cancer Lett* 1997; 116(1):93-101
48. Tilkin AF, Lubin R, Soussi T, Lazar V, Janin N, Mathieu MC, Lefrere I, Carlu C, Roy M, Kayibanda M, et al.: Primary proliferative T cell response to wild-type p53 protein in patients with breast cancer. *Eur J Immunol* 1995; 25(6):1765-9
49. Carbone DP, Minna JD: In vivo gene therapy of human lung cancer using wild-type p53 delivered by retrovirus. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86(19):1437-8
50. Legros Y, Lafon C, Soussi T: Linear antigenic sites defined by the B-cell response to human p53 are localized predominantly in the amino and carboxy-termini of the protein. *Oncogene* 1994; 9(7):2071-6
51. Schlichtholz B, Legros Y, Gillet D, Gaillard C, Marty M, Lane D, Calvo F, Soussi T: The immune response to p53 in breast cancer patients is directed against immunodominant epitopes unrelated to the mutational hot spot. *Cancer Res* 1992; 52(22):6380-4.

52. Rahko E, Blanco G, Soini Y, Bloigu R, Jukkola A: A mutant TP53 gene status is associated with a poor prognosis and anthracycline-resistance in breast cancer patients. *Eur J Cancer* 2002; 39(4):447-53.
53. Cabelguenne A, Blons H, de Waziers I, Carnot F, Houllier AM, Soussi T, Brasnu D, Beaune P, Laccourreye O, Laurent-Puig P: p53 alterations predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective series. *J Clin Oncol* 2000; 18(7):1465-73
54. Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A: CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 2003; 98(5):1089-99
55. Bueter M, Gasser M, Schramm N, Lebedeva T, Tocco G, Gerstlauer C, Grimm M, Nichiporuk E, Thalheimer A, Thiede A, Meyer D, Benichou G, Waaga-Gasser AM: T-cell response to p53 tumor-associated antigen in patients with colorectal carcinoma. *Int J Oncol* 2006; 28(2):431-8
56. Zwaveling S, Vierboom MP, Ferreira Mota SC, Hendriks JA, Ooms ME, Sutmuller RP, Franken KL, Nijman HW, Ossendorp F, Van Der Burg SH, Offringa R, Melief CJ: Antitumor efficacy of wild-type p53-specific CD4(+) T-helper cells. *Cancer Res* 2002; 62(21):6187-93.
57. Melief CJ, Van Der Burg SH, Toes RE, Ossendorp F, Offringa R: Effective therapeutic anticancer vaccines based on precision guiding of cytolytic T lymphocytes. *Immunol Rev* 2002; 188(1):177-82.
58. Petersen TR, Buus S, Brunak S, Nissen MH, Sherman LA, Claesson MH: Identification and design of p53-derived HLA-A2-binding peptides with increased CTL immunogenicity. *Scand J Immunol* 2001; 53(4):357-64.
59. Brossart P, Wirths S, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L, Brugger W: Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood* 2000; 96(9):3102-8
60. Cox AL, Skipper J, Chen Y, Henderson RA, Darrow TL, Shabanowitz J, Engelhard VH, Hunt DF, Slingluff CL, Jr.: Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 1994; 264(5159):716-9

61. Wilson RE, Hager EB, Hampers CL, Corson JM, Merrill JP, Murray JE: Immunologic rejection of human cancer transplanted with a renal allograft. *N Engl J Med* 1968; 278(9):479-83
62. Waaga AM, Gasser M, Kist-van Holthe JE, Najafian N, Muller A, Vella JP, Womer KL, Chandraker A, Khoury SJ, Sayegh MH: Regulatory functions of self-restricted MHC class II allopeptide-specific Th2 clones in vivo. *J Clin Invest* 2001; 107(7):909-16
63. Ludewig B, Graf D, Gelderblom HR, Becker Y, Kroczeck RA, Pauli G: Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF-alpha, but strongly enhanced by interleukin-10. *Eur J Immunol* 1995; 25(7):1943-50
64. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ: Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408(6810):307-10
65. Vousden KH, Lu X: Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(8):594-604
66. Messi M, Giacchetto I, Nagata K, Lanzavecchia A, Natoli G, Sallusto F: Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes. *Nat Immunol* 2003; 4(1):78-86

9. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AEC	Aminoethyl-Carbazol
APC	antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
Ca	Karzinom
c-DNA	Copy-Desoxyribonukleinsäure
CEA	carcinoembryonales Antigen
CK	Cytokeratin
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DAB	Diaminobenzidin
DC	dendritische Zelle
EMA	epitheliales Membranantigen
5-FU	Fluorouracil
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
Her-2/neu	Funktion: Membranrezeptor-Tyrosinkinase
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
neg.	negativ
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
n.v.	nicht vorhanden
PBL	periphere Blutlymphozyten

RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
TAA	tumorassoziiertes Antigen
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TIL	tumorinfiltrierende Lymphozyten
T _{reg} -Zellen	regulatorische T-Zellen
u.a.	unter anderem
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
wt-p53-Protein	<i>wild-type</i> -p53-Protein

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Arnulf Thiede, dem Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik I, danke ich dafür, dass er mir die Durchführung des praktischen Teils dieser Arbeit ermöglichte.

Meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. rer. nat. Ana Maria Waaga-Gasser, der Leiterin der Abteilung für Molekulare Onkoimmunologie, danke ich für die Überlassung des Themas, die sehr gute Anleitung zur selbständigen wissenschaftlichen Arbeit, die ermutigenden Worte auch in schwierigen Phasen dieser Arbeit sowie die exzellente und persönliche Betreuung sowohl während des experimentellen Teils als auch in der Phase des Schreibens der Doktorarbeit.

Meinem Betreuer, Herrn Dr. med. Martin Gasser, Chirurg an der Chirurgischen Klinik I, danke ich für die ebenfalls hervorragende Betreuung, die stete Bereitschaft zur Diskussion meiner Ergebnisse und seine hilfreichen Ratschläge zur Immunhistologie.

Für die Einarbeitung in das Gebiet der Onkoimmunologie zu Beginn meiner Arbeit möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Marco Büter, Assistenzarzt an der Chirurgischen Klinik I, bedanken.

Den Medizinisch-Technischen Assistentinnen Frau Sabine Müller und Frau Andrea Trumpfheller möchte ich für die Einführung in die Methoden der Arbeit sowie die gute Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Experimente herzlich danken.

Allen Mitdoktorandinnen und Mitdoktoranden der Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit und die aufschlussreichen Vorträge bei den Doktorandenseminaren. Besonders hervorheben möchte ich die Mitdoktoranden Martin und Michael Grimm und ihnen für die nützlichen Hinweise aus dem Bereich der Immunhistologie danken.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name Nicolai Alexander Schramm
Geburtsdatum 12. April 1979
Geburtsort Fulda
Staatsangehörigkeit deutsch
Konfession römisch-katholisch
Familienstand ledig
Adresse Bavariastr. 9a
80336 München
Tel.: 0661/61399
Mobil: 0176/62085928
E-Mail: nicschramm@gmx.de

Schulbildung

1985-1989 Grundschule Rauschenberg, Petersberg
1989-1998 Freiherr-vom-Stein-Gymnasium, Fulda
Juni 1998 Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,9)
Leistungskurse: Biologie, Englisch

Studium

Oktober 1999 – Juni 2006 Studium der Humanmedizin
Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
August 2001 Ärztliche Vorprüfung (Note: 1,00)
August 2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1)
April 2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,66)
Juni 2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1)
Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung: 1,33
19. Juni 2006 Approbation als Arzt

Klinische Ausbildung

Februar – April 2002 *Famulatur Viszeral- und Unfallchirurgie (7 Wochen)*
Herz-Jesu-Krankenhaus, Fulda
September 2002 *Famulatur Radiologie*
Rad. Gemeinschaftspraxis Dr. Keil/Dr. Roy, Würzburg
August – Oktober 2003 *Famulatur Radiologie (8 Wochen)*
Department of Radiology, Children´s Hospital,
Harvard Medical School, Boston, MA, USA
Februar – März 2004 *Famulatur Innere Medizin, Kardiologie*
Juliusspital, Würzburg

März – April 2004	<i>Famulatur Urologie</i> Missionsärztliche Klinik, Würzburg
September 2004	<i>Famulatur Anaesthesiologie</i> Allgemeines Krankenhaus, Wien, Österreich
April – August 2005	<i>1. Tertial des Praktischen Jahres, Wahlfach Neurologie</i> Neurologische Universitätsklinik Würzburg, Prof. Dr. Toyka
August – Oktober 2005	<i>2. Tertial des Praktischen Jahres, Innere Medizin</i> Medizinische Klinik der Universität Würzburg, Abteilung Kardiologie, Prof. Dr. Ertl
Oktober – November 2005	<i>2. Tertial des Praktischen Jahres, Innere Medizin</i> Department of Medicine (Infectious Diseases, Nephrology) Director: Peter Bates, MD, Maine Medical Center, Portland, ME, USA
November 2005 – März 2006	<i>3. Tertial des Praktischen Jahres, Chirurgie</i> Chirurgische/Orthopädisch-traumatologische Klinik Prof. Dr. Schöb/Dr. Hug Spital Limmattal, Schlieren, Schweiz
ab 1. August 2006	<i>Weiterbildung zum Facharzt für Radiologie</i> Klinikum der Universität München Institut für Klinische Radiologie Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser

Praktische Tätigkeiten

1998 – 1999	<i>Zivildienst in der Pflege (13 Monate)</i> Abteilung für Geriatrie/Rheumatologie Herz-Jesu-Krankenhaus, Fulda
2000 - 2005	<i>Regelmäßige Nachtdienste in der Pflege</i> auf medizinischen und neurologischen Stationen sowie der Herz-Thorax-Intensivstation der Uniklinik Würzburg

Promotion

„*Untersuchungen zur Anti-Tumor-Immunantwort unter Berücksichtigung der Bedeutung regulatorischer T-Zellen bei Patienten mit kolorektalem Karzinom*“

Doktormutter: Frau Prof. Dr. rer. nat. Ana Maria Waaga-Gasser
Universität Würzburg, Zentrum Operative Medizin (ZOM), Chirurgische Klinik I
Abteilung für Molekulare Onkoimmunologie

Preise

2004: International Society of Immunology, Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS);
Bereich Onkologie – Anti-Tumorimmunantwort (*Ko-Preisträger*)

Sonstige Kenntnisse

Fremdsprachen	Englisch, Latein, Grundkenntnisse in Französisch/Spanisch
EDV	MS Office Software, Adobe Photoshop, Internet

Würzburg, 20. Juli 2006