





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

**Untersuchung der PD-1/PDL-1/PDL-2 Expression und infiltrierender T-Zellen im  
humanen kolorektalen Karzinom und ihre Auswirkung auf die Immunantwort**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Matthias Königshausen  
aus Düsseldorf

Würzburg, Juli 2006

Referent: Prof. Dr. rer. nat. A-M. Waaga-Gasser PhD

Koreferent: Prof. Dr. med. M. Böck

Dekan: Prof. Dr. med. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28. September 2007

Der Promovend ist Arzt.

Für meine geliebte Anita und für meine kleine Helena...

„Das Bekannte überhaupt ist darum, weil es *bekannt* ist, nicht *erkannt*.“

Georg Wilhelm Friedrich Hegel

aus *Phänomenologie des Geistes*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Das kolorektale Karzinom	1
1.1.1. Epidemiologie	1
1.1.2. Ätiologie	2
1.1.3. Pathogenese	3
1.1.4. Pathologie und Tumorklassifikation	5
1.2. Die Apoptose	7
1.3. Proteolytische Kaskade der Apoptose	8
1.4. Die zelluläre Immunantwort	10
1.5. Die Th1/Th2 Immunantwort	11
1.6. Die regulatorischen T-Zellen	12
1.7. Die Bedeutung von PD-1, PDL-1 und PDL-2 bei der Immunantwort gegen den Tumor	13
<b>2. Fragestellung</b>	<b>17</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>18</b>
3.1. Patientengut	18
3.2. Immunhistologie	18
3.2.1. Antikörper für die Immunhistologie	20
3.3. Nachweis der Apoptose im TUNEL-Assay	22
3.4. Immunfluoreszenz	24
3.5. RT-PCR Real Time Polymerase Kettenreaktion	27
3.6. Statistische Analyse	31
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>32</b>
4.1. p53-Expression im Tumorgewebe	32
4.2. PDL-1- sowie PDL-2 - Expression im Tumorgewebe	32
4.3. T-Effektor-Zellen im Tumorgewebe	35
4.4. Regulatorische T-Zellen im Tumorgewebe	35
4.5. CD4+PD-1-, CD4+PDL-1-, CD4+PDL-2- Expression	37

4.6. Expression von PD-1, PDL-1 und PDL-2 und Nachweis von T-Zell-Subpopulation und Zytokin-Expression im Tumorgewebe in der Genexpressionsanalyse	39
4.7. CD4+Foxp3+PD-1-/PDL-1-/PDL-2-Expression	40
4.8. Nachweis der Apoptose	42
4.8.1. Expression von FAS und FAS-L auf T-Zellen im Tumorgewebe	42
4.8.2. Apoptose der CD8+ T-Zellen	45
<b>5. Beantwortung der Fragen</b>	<b>46</b>
<b>6. Diskussion</b>	<b>48</b>
<b>7. Ausblick</b>	<b>55</b>
<b>8. Zusammenfassung</b>	<b>56</b>
<b>9. Literaturverzeichnis</b>	<b>58</b>
<b>10. Abbildungsverzeichnis</b>	<b>64</b>
<b>11. Anhang</b>	<b>65</b>
<b>12. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>66</b>



# 1. Einleitung

Onkologische Erkrankungen und ihre unterschiedlichen Behandlungsformen betreffen weltweit in vielen medizinischen Disziplinen einen grossen Anteil des Patientengutes. Diese Tatsache hat nicht nur schwerwiegende Folgen für den einzelnen betroffenen Patienten, sondern für die gesamte Gesellschaft und ist heute eine der grössten Herausforderungen in der modernen Medizin. Die Molekulare Onkoimmunologie stellt in diesem Zusammenhang ein wichtiges Forschungsgebiet dar, bei der die natürlichen Abwehrmechanismen untersucht sowie neue immunologische Möglichkeiten des Körpers im Kampf gegen Tumorerkrankungen definiert werden.

Die Rolle des Immunsystems in der Progression von Malignomen erfährt auch in vielen anderen Forschungsgebieten der Medizin zunehmend eine herausragende Bedeutung. Die Stärkung der Immunantwort gegen einen Tumor unterliegt komplexen Regel-Mechanismen. So verhindert beispielsweise der Tumor seine eigene Erkennung durch das Immunsystem und ermöglicht somit seine Progression und die Metastasierung. Bisherige Daten zeigen, dass sich der Tumor mit verschiedenen Oberflächenmolekülen auf der Tumorzelle vor der immunologischen Zerstörung schützt (1-4).

Das kolorektale Karzinom stellt das häufigste Malignom unter den gastrointestinalen Tumoren dar. In der vorliegenden Arbeit wurden Patienten mit dieser Tumorentität näher untersucht. Auf einige wichtige Aspekte zu dieser Erkrankung in Verbindung mit der untersuchten Fragestellung wird im Folgenden weiter eingegangen.

## 1.1. Das kolorektale Karzinom

### 1.1.1. Epidemiologie

Das KRK zählt zu den häufigsten malignen Tumoren des Menschen. Es ist der häufigste Tumor des menschlichen Gastrointestinaltraktes und gleichzeitig der häufigste maligne Tumor des Intestinums. Dementsprechend geht es, trotz Fortschritten in Diagnostik und Therapie, mit einer hohen Mortalität und einer hohen Letalität einher. Die Inzidenz liegt jährlich bei 50.000 Fällen, wobei davon 17.000 auf das Rektumkarzinom entfallen (5). Das KRK steht insgesamt an zweiter Stelle aller Tumoren des Menschen, sowohl bei Männern (nach dem Bronchialkarzinom) als auch bei Frauen (nach dem Mammakarzinom) (6, 7). Das Alter

ist ein Hauptrisikofaktor für das Auftreten des KRK. Wird es vor dem 40. Lebensjahr äußerst selten diagnostiziert, so steigt die Inzidenz zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr signifikant und erhöht sich weiter mit zunehmendem Lebensalter (8). Das linke Hemikolon, das Sigma und das Rektum sind die Hauptmanifestationsorte des KRK, allerdings wurde in den letzten Jahren eine zunehmende „Rechtsverschiebung“ (sog. „shift to the right“) des KRK mit einem selteneren Befall des linken Hemikolons und Rektums und einer relativen Zunahme im rechten Hemikolon beobachtet (9, 10). Die Gründe sind hierfür nicht ausreichend belegt.

### **1.1.2. Ätiologie**

Das KRK weist eine multifaktorielle Genese auf. Es hat sich gezeigt, dass sowohl Umweltfaktoren, als auch genetische Faktoren bei der Entwicklung des KRK eine Rolle spielen. Obwohl ein ausgesprochen hohes Risiko bezüglich des Auftretens eines KRK in der Vererbung der Erkrankung liegt, tritt die Mehrheit der KRKs eher vermehrt sporadisch auf als familiär (11). Fleisch- und fettreiche Ernährung gelten als sichere Risikofaktoren für das KRK. Außerdem wird ein vermehrtes Auftreten auf eine verminderte Aufnahme von Ballaststoffen zurückgeführt. Dies führt dazu, dass es zu einer längeren Verweildauer aufgenommener Nahrung im Lumen des Dickdarms kommt und daraus eine höhere Einwirkung von Karzinogenen resultiert (12).

Weiterhin zeigte sich, dass ein erhöhter Body Mass Index (BMI) und eine geringe körperliche Aktivität das Risiko eines KRK erhöhen, wohingegen in Studien festgestellt werden konnte, dass ein hoher Konsum an Früchten und Gemüse sowie an Kalzium einen protektiven Effekt bezüglich einer karzinogenen Genese hat (13).

Die häufigste Form der hereditären KRK-Syndrome ist das hereditäre nichtpolypöse kolorektale Karzinom (HNPCC), wohingegen die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) wesentlich seltener vorkommt (14). Die FAP ist für ca. 1 Prozent der KRK verantwortlich. Typischerweise kommt es bereits in der Kindheit zu zahlreichem Auftreten von Kolonadenomen. Symptome manifestieren sich dann um das 16. Lebensjahr, und bis zum fünfundvierzigsten Lebensjahr haben 90 Prozent der unbehandelten Patienten ein Kolonkarzinom entwickelt (15). Das HNPCC (oder auch Lynch-Syndrom) ist die häufigste hereditäre Form des kolorektalen Karzinoms. Charakteristischerweise kommt es bei einer HNPCC zu einer

Manifestation eines KRK in der Mitte des vierten Lebensjahrzehnts. Das Lynchsyndrom wird nochmal in zwei Untergruppen (Lynch I und Lynch II) unterteilt (16).

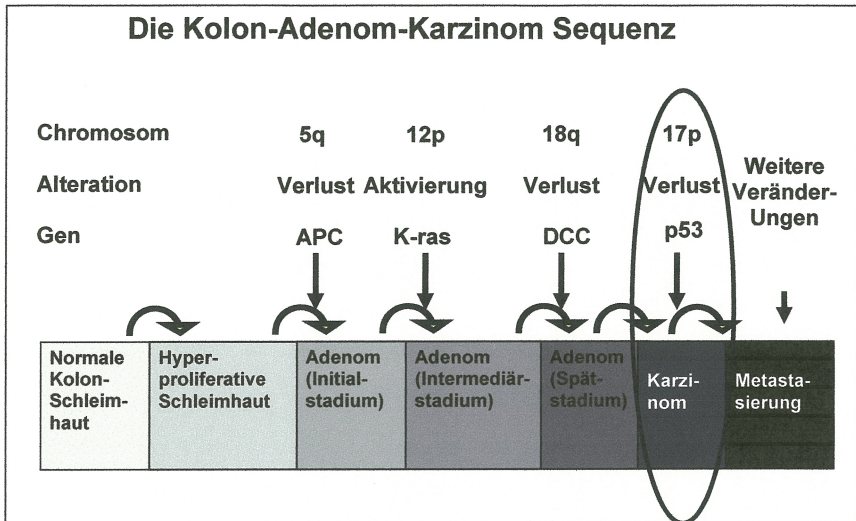
Ein weiterer Risikofaktor für die Entwicklung des KRK stellen entzündliche Darmerkrankungen dar, wobei hier in erster Linie an die Colitis ulcerosa zu denken ist. Betroffene Patienten haben, neben anderen möglichen Begleiterkrankungen, immer ein erhöhtes Risiko hinsichtlich einer malignen Entartung der entzündlichen Darmabschnitte, besonders wenn die Erkrankung schon für einen langen Zeitraum besteht und mit einer großen Ausdehnung einhergeht (17, 18), wobei eine frühzeitige Diagnose und eine nachfolgend adäquate medikamentöse oder auch chirurgische Therapie in der Lage sind, das Risiko deutlich zu senken.

### 1.1.3. Pathogenese

Spezifische genetische Veränderungen sind dafür verantwortlich, dass aus normalem Kolonepithel ein invasives Karzinom entsteht. Im Jahr 1990 wurde die molekulare Basis des KRK als ein mehrstufiger Prozess beschrieben, in dem jede genetische Veränderung zu einem selektiv-fortschreitenden Wachstum des Kolonepithels und letztlich zu einer Tumorprogression führt (19, 20). Zwei Genklassen stehen hierbei im Vordergrund: Die Onkogene (K-Ras-Gene) und die Tumorsuppressorgene (APC-, DCC-, p53-Gene). Bei den Proto-Onkogenen können mehrere Mechanismen an genetischen Veränderungen zu einer Aktivierung führen (Rekombinationen, Punktmutationen u.a.). Tumorsuppressor-Gene unterdrücken hingegen im intakten Zustand ein Zellwachstum und verlieren diese Funktion durch Genverlust oder Promotormethylierung (21).

Zu Beginn der Adenom-Karzinom-Sequenz (siehe *Abb. 1*) kommt es zu einer Inaktivierung des APC-Gens (auf Chromosom 5q21) und dadurch zu erhöhten  $\beta$ -Cateninspiegeln. Dies wiederum bedingt ein verstärktes Zellwachstum, welches die Transformation von Kolonepithel zu adenomatösem Gewebe bewirkt (siehe auch *Abb. 2*) (21). In der beschriebenen Theorie folgt als nächstes die K-Ras-Aktivierung. Diese Gene, mitverantwortlich für Signaltransduktion sowie Zellwachstum, führen bei Mutation zu einer verstärkten Zelltransformation und -proliferation (22). Wenn es dann zu einer Deletion des DCC-Gens kommt, so kann dies einen Verlust der zellulären Kontakte bedeuten und letztlich eine weitere Lösung und eventuelle Metastasierung begünstigen (19). Der Verlust des p53 stellt ein relativ spätes Ereignis in der Tumorgenese dar. Normalerweise induziert p53 bestimmte Regulierungen, die zu einer Wachstumshemmung führen, weswegen es auch „Wächter des

Genoms“ genannt wird. Ist es aber inaktiviert, so kommt es zu einem überschießenden Wachstum und zu einer Progression vom Adenom hin zum Karzinom. (20, 21, 23, 24).



*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.

## Entstehung des Kolon-Ca

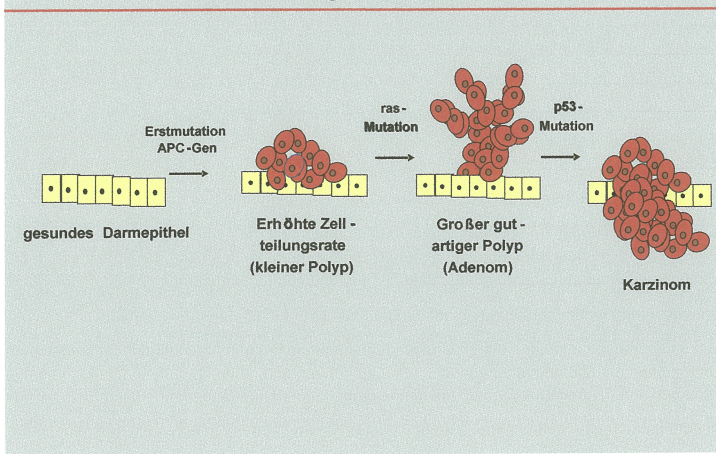


Abb.2: Schematisch-Morphologische Darstellung der Entstehung des kolorektalen Karzinoms.

### 1.1.4. Pathologie und Tumorklassifikation

Neben verschiedenen morphologischen Wachstumsformen handelt es sich beim KRK histologisch fast immer um ein Adenokarzinom. Die histopathologische Beschreibung des Differenzierungsgrades (Grading) basiert auf einem Nummerierungssystem von 1-4 (G1-G4) entsprechend folgender Beurteilung: gut, mäßig, schlecht und undifferenziert. Die Karzinome heißen entsprechend ihrer Nummerierung Low-grade-Karzinome (G1, G2) und High-grade-Karzinome (G3, G4).

Schon im Jahre 1932 konnte gezeigt werden, dass das Grading unmittelbar mit dem Ausmaß von Lymphknoten- und Fernmetastasierung zusammenhängt (25, 26). Die Ausprägung der Differenzierung ist auch entscheidend für die Wahrscheinlichkeit hinsichtlich des Befalls und nachfolgenden Einbruchs in venöse oder lymphatische Gefäße.

Für die Stadieneinteilung wird die von Dukes vorgeschlagene und später auch von Astler und Coller (27) modifizierte Stadieneinteilung verwendet, wobei die TNM-Tumorklassifikation nach der Union Internationale contre le cancer (UICC) (Abb.3) heute die weiteste Verbreitung gefunden hat und weltweit akzeptiert wird (28, 29).

TNM-System (Tumor-Node-Metastasis-System):

**T1-4:** Ausmaß der Tumordinfiltration

**N0-2:** Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung

**M0-1:** Metastasenstatus

Diese Klassifikation ist international gebräuchlich; auf dieser Basis können auch Vergleiche bezüglich der Primärdiagnose vorgenommen werden.

### TNM-Erklärung

<b>Tis</b>	<u>Carcinoma in situ</u>
<b>T1</b>	<u>Mucosa und Submucosa befallen</u>
<b>T2</b>	<u>Muscularis propria befallen</u>
<b>T3</b>	<u>Subserosa befallen</u>
<b>T4</b>	<u>angrenzende Organe befallen</u>
<b>N0</b>	<u>keine regionären Lymphknoten befallen</u>
<b>N1</b>	<u>angrenzende Lymphknoten befallen</u>
<b>N2</b>	<u>entfernte Lymphknoten befallen</u>
<b>M0</b>	<u>keine Fernmetastasen</u>
<b>M1</b>	<u>Fernmetastasen</u>

### UICC-Stadien des KRK

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

Abb.3: Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms nach UICC (überarbeitetes Schema von 2003).

Die genaue Ermittlung der UICC-Stadien des KRK betroffener Patienten durch einen erfahrenen Pathologen ist von entscheidender Bedeutung in der Wahl einer adäquaten Therapie, die sich von operativen Methoden bis hin zu Bestrahlung und/oder Chemotherapie erstreckt.

Das KRK ist von vielen Faktoren abhängig, die entscheidenden Anteil an der Prognose der Erkrankung haben. Deshalb ist es von besonderem Interesse, deren Bedeutung abzuwägen, um ein frühzeitiges therapeutisches Eingreifen zu gewährleisten. Die derzeitige 5-Jahresüberlebensrate für das Kolonkarzinom beträgt im UICC Stadium I ca. 95%, im Stadium II 90%, im Stadium III 65% und im Stadium IV 5%. Für das Rektumkarzinom verhält es sich sehr ähnlich (UICC-Stadium I-IV): 95%, 85%, 55% und 5% (30).

Im Folgenden sollen nun einige Hintergründe auf zellulärer sowie molekularer Ebene näher erklärt werden, die als Verständnisgrundlage des zu behandelnden Themas dienen sollen:

## **1.2. Die Apoptose**

Während der Embryonalentwicklung von Säugetieren kommt es regelmäßig zur Zerstörung funktionsloser Zellen (bspw. autoreaktiver T-Lymphozyten). Beim erwachsenen Menschen ist dieser Mechanismus speziell bei Zellen zu finden, die sich in einer reversiblen Expansion befinden (z.B. Epithel der Prostata oder der Brustdrüse). Dieser Vorgang ist auch bei virusbefallenen Zellen und manchen Tumorzellen zu beobachten.

Schon seit den 50er Jahren ist bekannt, dass dieser Mechanismus nach einem festgelegten Programm abläuft, weswegen auch der Begriff „programmierter Zelltod“ oder „Apoptose“ verwandt wurde. Nach dem Zerfall einer abgestorbenen Zelle (*Abb.4*) wird das entstandene Material von Makrophagen aufgenommen, ohne dass es vorher zu einer Entzündungsreaktion kommt. Biochemisch ist die Apoptose ein induzierbarer, energieabhängiger Vorgang (31).

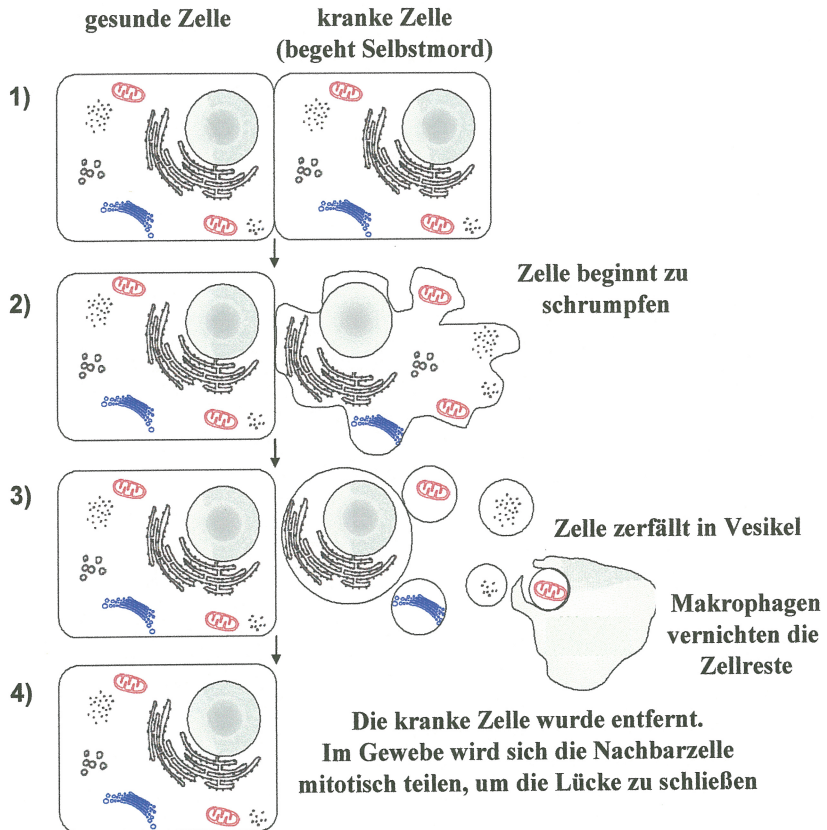


Abb.4: Apoptose einer kranken bzw. befallenen Zelle im Vergleich zu einer gesunden Zelle.

### 1.3. Proteolytische Kaskade der Apoptose

Die Abbildung 5 stellt schematisch einen Apoptoseablauf auf molekularer Ebene dar. Die Zelle besitzt einen Todesrezeptor. Bindet nun ein Ligand an diesen Rezeptor, so wird über ein Adaptermolekül die Procaspase gebunden. Dadurch wird sie zur aktiven Caspase, welche (über eine Aktivierung von Effektor-Caspasen und Caspase-3) eine proteolytische Kaskade in Richtung Zelltod in Gang setzt, die zur Zerstörung der wichtigsten Proteine und der Nukleinsäuren in der Zelle führt (32).



Als Reaktion auf Stress, der auf die Zelle durch Umweltfaktoren ausgeübt werden kann, kommt es zu Permeabilitätsänderungen der äußeren Mitochondrienmembran und zu einer Ausschüttung von Cytochrom C und anderen Effektorproteinen. Cytochrom C ist ein Kofaktor, welcher APAF-1 induziert Caspase-9 zu aktivieren, eine Caspase, die möglicherweise zu einem intrinsischen Zelltod führen kann. Die darauf folgende Aktivierung von Effektorproteasen (inklusive Caspase 3) resultiert im apoptotischen Zelltod (33, 34).

Dieser Ablauf wird von einigen Proteinen reguliert, die an den Todesrezeptor, die Adaptermoleküle oder Caspasen binden und so ihre Funktionen beeinflussen. Der Apoptose liegen also komplexe Mechanismen zugrunde, die letztendlich den Tod einer Zelle herbeiführen können (35, 36).

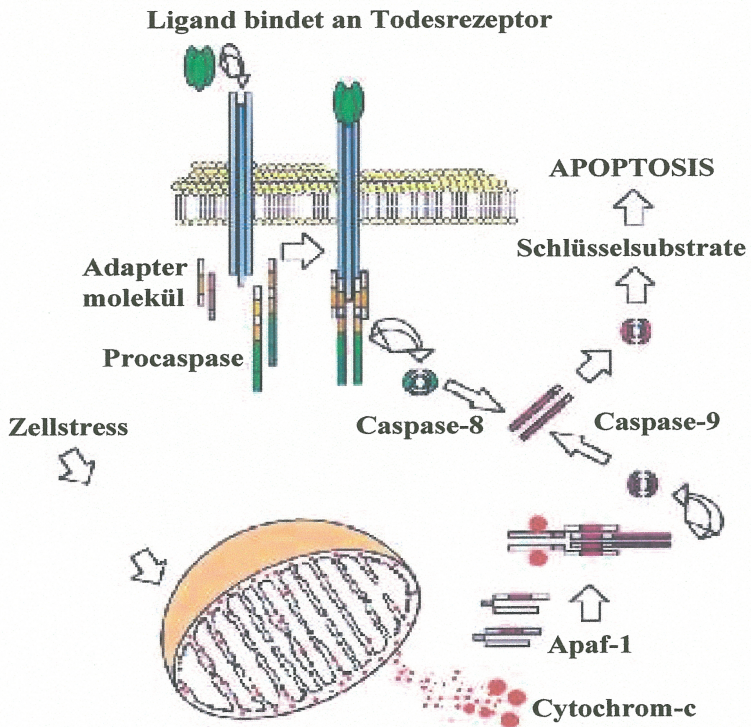


Abb. 5: Schematische Darstellung eines Apoptoseablaufs auf molekularer Ebene.

## 1.4. Die zelluläre Immunantwort

Bei der Entstehung eines Karzinoms werden die fremd-Antigene auf der Oberfläche der Tumorzellen exprimiert. Spezifische T-Killerzellen erkennen diese Antigene und lösen eine Apoptose der Tumorzellen aus. Zusätzlich bewirken auch zytotoxische T-Zellen (cytotoxic T-lymphocytes, CTL) nach Tumorantigenerkennung eine Lyse oder auch Apoptose der Zielzellen.

CTLs weisen in der Regel einen CD8+ Phänotyp auf. Sie erkennen das Fremd-Peptid in Verbindung mit einem MHC (Major Histocompatibility)-Klasse I-Molekül auf der Zelloberfläche. Diese spezifische T-Zellerkennung ist notwendig für die nachfolgende zytotoxische T-Zellantwort.

Die Differenzierung von unreifen zu funktionell reifen CTLs benötigt mindestens zwei Signale. Das erste Signal setzt sich aus der spezifischen Erkennung des Antigens durch den T-Zellrezeptor in Verbindung mit dem MHC-Klasse-I-Molekül zusammen. Dieses Signal wirkt durch den Einfluß von Zytokinen stabilisierend.

Das zweite oder kostimulatorische Signal besteht aus dem CD28-Rezeptor auf der CD8+ T-Zelle (CTL) mit dem CD-86-Molekül auf der Zielzelle. Dabei wird eine Apoptose auch ohne Mitwirkung von Interleukin (IL-) 2 in der Zielzelle induziert. Bereits Minuten nach der Zell-Zellbindung werden Granula aus dem Golgiapparat der T-Zelle ausgeschüttet und damit die Perforine und Granzyme aus den Vesikeln freigesetzt. Die Zielzelle erfährt dann eine osmotische Lyse. Gleichzeitig können auch andere Signale die Apoptose einleiten (*siehe Abb. 6*).

### Der CD95 (FAS) Signalweg

Das transmembrane Glycoprotein CD95 (FAS) ist ein Schlüsselement in der Apoptose. Kommt es mit einem TNF-ähnlichen Protein (CD95-L; FAS-Ligand), dem „Killerfaktor“ in Kontakt, leitet es die Selbsterstörung der Zelle ein. Stimulierte CTL's besitzen auf ihrer Oberfläche CD95L (FAS-Ligand)-Proteine und sind damit in der Lage, alle Zellen, die FAS exprimieren, durch die Induktion der Apoptose zu vernichten (*siehe Abb. 6*). Die zytotoxische T-Zelle entkoppelt sich anschließend, um dann die nächste Zielzelle aufzusuchen und mittels desselben Mechanismus zu zerstören (37-40).

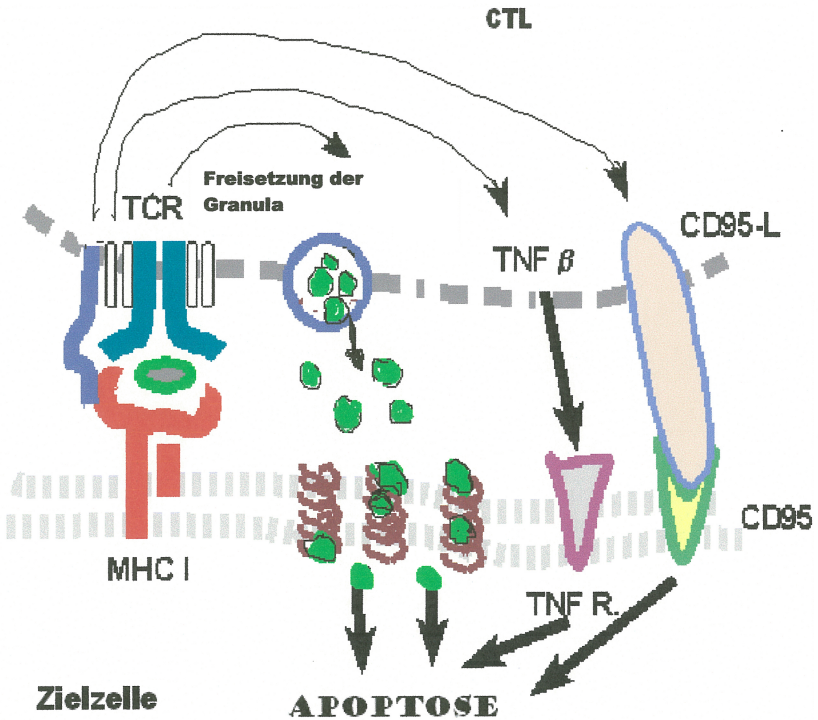


Abb. 6: Apoptoseinitiation durch eine CTL über den FAS/FAS-L (CD95/CD95-L) pathway und die daraus folgende Zellerstörung.

## 1.5. Die Th1/Th2 Immunantwort

Die Zytokine IL-2, Interferon (IFN)- $\gamma$ , IL-12, IL-8 werden der T-Helfer-(Th)1-Immunantwort zugeordnet, wobei andere Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 für die Th2-Immunantwort charakteristisch sind (41). Eine größere Anzahl an Th1-T-Helferzellen führt zum Mechanismus der sogenannten zellulären Immunantwort und zur Produktion von opsonierenden Antikörpern (vor allem IgG), während es bei der Ausbildung einer Th2-Immunantwort in erster Linie zur Bildung von Antikörpern der Klassen, IgA und IgE kommt (42-44).

Mittlerweile ist es allgemein anerkannt, dass die beiden Untergruppen sich auch untereinander beeinflussen und regulieren können. Der eine Grund ist, dass die Zytokine CD4+ T-

Zellen hemmen oder zumindest beeinflussen können. So kann zum Beispiel IL-10, ein Th2-typisches Zytokin, die Proliferation von Th1-Zellen blockieren, indem durch die Wirkung von IL-10 antigenpräsentierende Zellen gehemmt werden können. IL-10 hemmt außerdem die Expression von Zytokinen, welche für die Th1-Immunantwort charakteristisch ist. Aus diesem Grunde wurde IL-10 ursprünglich als *Cytokine Synthesis Inhibitory Factor* bezeichnet (45). Hingegen kann IFN- $\gamma$ , ein spezifisches Zytokin der Th1-Zellen, die Aktivierung von Th2-Zellen inhibieren. Wenn eine bestimmte Untergruppe von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zuerst oder verstärkt im Rahmen einer Immunantwort aktiviert wird, kann dies die Aktivierung der anderen Untergruppe verhindern. Viele Immunantworten werden deshalb entweder von einer Th1- oder von einer Th2-Antwort dominiert. *In vivo* kann aber in vielen Fällen auch eine gemischte Immunantwort auftreten (44, 46).

Es gibt Daten, die belegen, dass eine Th1 spezifische Immunantwort weitaus effektiver für die Tumorbekämpfung ist als eine Th2-Antwort (47). Eine andere Studie hingegen zeigt im Mausversuch, dass die Manifestation einer Th2-Antwort in Verbindung mit einer IL-10-Expression in der Lage ist, das Wachstum von Zelllinien kolorektalen Karzinoms (CT 26) sowie deren metastatisches Potential zu hemmen (45). Wie man hier sehen kann, liegen keine eindeutigen Daten vor, welche T-Zell-Antwort am effizientesten Tumorgewebe zur Regression bringen kann. Es scheint vielmehr auch davon abzuhängen, um welche Art eines Malignoms es sich handelt.

## 1.6. Die regulatorischen T-Zellen

Regulatorische T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der peripheren Immunantwort und haben höchstwahrscheinlich einen nicht geringen Einfluss auf das Auftreten und das Ausmaß von Autoimmunerkrankungen (48). Es gibt zwei beschriebene Hauptkategorien regulatorischer T-Zellen: Die Einen sind die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen, die vom Thymusgewebe abstammen und eine vermehrte Expression des Forkhead-Transkriptionsfaktors Foxp3 aufweisen. Dieses Foxp3 ist essentiell für ihre Entwicklung und ihre Funktion (49-52). Die andere Kategorie beinhaltet die antigen-spezifischen regulatorischen T-Zellen, welche anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und/oder TGF- $\beta$  sezernieren und beispielsweise Reaktionen des Immunsystems regulieren (48, 53). Aktivierete regulatorische T-Zellen, die IL-10 sezernieren werden als IL-10-regulatorische T-Zellen oder Tr1-Zellen bezeichnet und diejenigen, die TGF- $\beta$  ausschütten, als Th3-Zellen. Es wurde festgestellt, dass aktiviertes Gefäßendothel alloantigen-spezifische

CD4+CD25+Foxp3+ regulatorische T-Zellen generiert, welche T-Zellproliferation *in vitro* und *in vivo* verhindern können (54). Deshalb fungieren CD4+CD25+ regulatorische T-Zellen in Form der Unterdrückung der Aktivierung von CD4+, CD8+ und NK-Effektor-Zellen genauso wie T-Gedächtnis-Zellen (T-memory-cells) (55-57). Aus diesem Grunde kann sich insbesondere eine Hoch-regulation von regulatorischen T-Zellen an der Tumorentwicklung beteiligen. Wie Kapitel 1.5. zu entnehmen sind diese regulatorischen T-Zellen somit in der Lage, andere T-Zellen über die Sekretion von Zytokinen zu beeinflussen.

Es konnte festgestellt werden, dass regulatorische T-Zellen bei verschiedenen Malignomen im peripheren Blut von Patienten vermehrt nachzuweisen sind, darunter gastrointestinale Malignome (Magen-Ca, Kolon-Ca, Oesophagus-Ca, Pankreas-Ca) (58), das hepatozelluläre Karzinom (59) und das Bronchialkarzinom, NSCC (60). Hingegen berichten Loddenkemper et al., dass bei metastasiertem Kolonkarzinom die Infiltration regulatorischer T-Zellen geringer war als bei noch nicht metastasiertem Kolonkarzinom. Auch unterschied sich die Überlebenswahrscheinlichkeit bei geringer regulatorischer T-Zell-Infiltration nicht wesentlich von derjenigen mit tiefer Infiltration (61).

Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahren bleiben jedoch viele Fragen im Hinblick auf die vielfältigen Funktionen der regulatorischen T-Zellen unbeantwortet.

## **1.7. Die Bedeutung von PD-1, PDL-1 und PDL-2 bei der Immunantwort gegen den Tumor**

Entscheidend für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit ist die stadienabhängige Rolle von PD-1, PDL-1 und PDL-2 bei der Tumorentwicklung des kolorektalen Karzinoms sowie ihre Bedeutung bei der Immunantwort gegen den Tumor. Aus diesem Grund soll im Folgenden näher darauf eingegangen werden.

Das Programmed death-1 Signal (Programmierter Zelltod-1, PD-1) ist ein kostimulatorisches Molekül, welches inhibitorisch gegenüber T-Zellen wirken kann und so deren Aktivierung verhindert. Im Jahre 1992 konnte erstmals cDNA isoliert werden, in der PD-1 als ein Zelloberflächenmolekül der Immunoglobulin-Superfamilie gefunden wurde. PD-1 gehört zu der CD28 Familie und seine extrazelluläre Region ist teilweise identisch mit dem

*cytotoxic lymphocyte associated 4* (CTLA-4) (62, 63). CTLA-4 (CD152) ist ein Glykoprotein, welches die Eigenschaft hat, T-Zellantworten zu begrenzen und die T-Zellproliferation zu inhibieren (64). Es konnte nachgewiesen werden, dass PD-1 negativ-regulatorische Einflüsse auf die T-Zell-Aktivierung hat und weiterhin ein entscheidender Faktor für die Aufrechterhaltung der Immuntoleranz des Körpers ist. In Mausversuchen konnte gezeigt werden, dass ein Mangel an PD-1 spontane Autoimmunerkrankungen hervorrufen kann (63, 65). PD-1 wird auf T- und B-Zellen, myeloischen Zellen und, im Gegensatz zu normalem Gewebe, auf vielen menschlichen Karzinomen (66, 67) exprimiert, darunter die Karzinome der Brust, der Zervix, der Lunge, des Ovars, außerdem das Melanom (68) und das Glioblastom (69).

Zwei Liganden (L) für PD-1, PDL-1 (B7-H1), dessen Gen sich auf Chromosom 9 befindet, und PDL-2 (B7-DC) wurden als Zelloberflächen-Glykoproteine zugehörig zur B7-Familie identifiziert. Es konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass PD-1/PDL-1- sowie PD-1/PDL-2- Interaktionen zu einem Arrest des Zell-Zyklus' in der G0/G1-Phase führen und damit T-Zell-Wachstum und Zytokinausschüttung verhindern können (70-75). Neben PD-1 wird noch ein weiterer kostimulatorischer Rezeptor vermutet (*siehe Abb. 7*), der in die Interaktion mit PDL-1 und PDL-2 involviert ist, dessen Entität und Funktion aber bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt unklar ist (76, 77). Die Expression von PDL-1 auf Tumorzellen erhöht die Apoptose von antigenspezifischen T-Zell-Klonen *in vitro* (66). Weiterhin erhöht die PDL-1-Blockade mit einem monoklonalen anti-PDL-1 Antikörper die anti-Tumor-Immunantwort und verhindert das Tumorstadium *in vivo* (78). Ähnliche Beobachtungen konnten auch für PDL-2 gemacht werden: Wildtyp-Mäuse, die mit einem cross-linking Antikörper gegen PDL-2 behandelt wurden, wiesen, im Vergleich zu nicht behandelten Tieren, ein weitaus geringeres Tumorstadium auf (79). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass PDL-2 einen hemmenden Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung *in vitro* und *in vivo* ausübt und dass ein Mangel an PDL-2 zu einer erhöhten T-Zell-Aktivierung führt (80). Dies lässt darauf schließen, dass PDL-1 und PDL-2 eine wichtige Rolle bei der Immunantwort gegen das körpereigene Immunsystem über PD-1 vermittelte inhibitorische Signale spielen, die dem Tumor einen Vorteil hinsichtlich einer selektiven Inhibierung von CD8+ T-Zellen einräumt (66, 78). Ausserdem verhindert eine PDL-1-Blockade eine Aktivierung und Expansion von CD4+CD25+Foxp3+ regulatorischen Zellen.

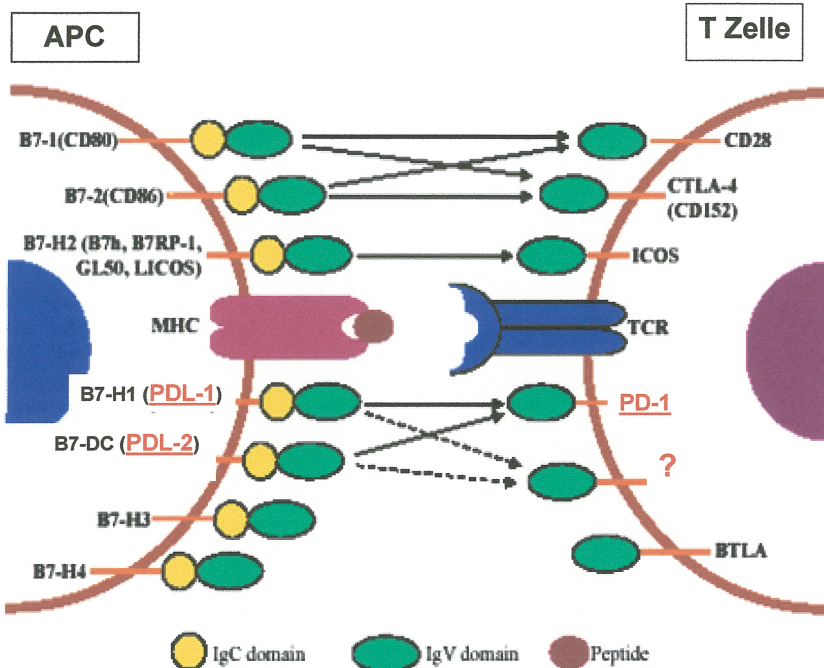


Abb.7: Interaktion der T-Zellen mit APC-Zellen über mehrere Moleküle. Die Moleküle PD-1/ PDL-1 sowie PD-1/ PDL-2 treten in Kontakt und können, beispielsweise an einem Tumor exprimiert, ein Apoptose-Signal induzieren, T-Zellen im Zellzyklus arretieren sowie die Proliferation zwischen T-Zellen hemmen. Ein weiteres Oberflächenmolekül, welches wohl als weitere Andockstelle der Liganden (PDL-1 und PDL-2) fungiert, ist bisher noch nicht identifiziert worden.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Stimulation von T-Zellen allein unter Vorhandensein von PDL-1 die Proliferation steigerte und die Produktion von IL-10 und IFN- $\gamma$  beförderte (70). IL-10 ist ein Zytokin, welches anti-inflammatorische Eigenschaften hat und unter anderem von Th2-Zellen, regulatorischen T-Zellen, Mastzellen und auch zum Teil von aktivierten T-Zellen exprimiert wird (81-83). IL-10 hemmt die Expression von Zytokinen, welche für die Th1-Immunantwort charakteristisch sind. Das Zytokin IFN- $\gamma$  wird von T-Zellen, NK-Zellen, sowie Makrophagen exprimiert und aktiviert CD4+ und CD8+ T-Zellen. Dies lässt vermuten, daß IFN- $\gamma$  bei einer Interaktion zwischen PD-1 und PDL-1 bei CD4+ und CD8+ T-Zellen vermindert ist.

Aufgrund dieser Ergebnisse wird zunehmend deutlich, dass viele Tumorkomponenten eine effektive antigen-spezifische T-Zell-Antwort verhindern. Dies dürfte wohl teilweise auf eine komplexe Strategie oder einen Fehler in der Kostimulation am Tumorgewebe zurückzuführen sein, welcher eine Initialzündung in Richtung auf eine effektive Immunantwort verhindert.

Allgemein sind nur wenige Informationen bezüglich der Expression von PD-1/PDL-1 bzw. PD-1/PDL-2 und dem Vorkommen von regulatorischen T-Zellen in verschiedenen Tumorstadien des kolorektalen Karzinoms verfügbar (66, 78). Maligne Tumoren können (wie oben angedeutet) wohl der immunologischen Überwachung über eine Unterregulation der T-Zell Aktivierung mittels eines PD-1/PDL-1- bzw. PD-1/PDL-2- Signals ausweichen. Dies würde zu einer herabgesetzten Immunantwort führen und somit Tumorwachstum fördern. Ziel dieser Arbeit war es nun zu untersuchen, wie die Expression von PD-1/PDL-1 bzw. PDL-2, IFN- $\gamma$  und IL-10 mit dem Vorkommen von regulatorischen T-Zellen im Kolonkarzinom stadienabhängig assoziiert sind. Damit sollten Rückschlüsse auf die An- oder Abwesenheit regulatorischer T-Zellen je nach Expressionsmuster von PD-1, PDL-1 und PDL-2 auf den Tumorzellen und auf den regulatorischen T-Zellen gezogen werden.



## 2. Fragestellung

1. *Exprimieren humane kolorektale Karzinomzellen das kostimulatorische Molekül PD-1 sowie seine Liganden PDL-1 und PDL-2? Werden diese Moleküle stadienabhängig unterschiedlich exprimiert?*

2. *Welche Veränderungen werden im Zuge der unterschiedlichen Expressionsmuster für PD-1, PDL-1 und PDL-2 in Bezug auf CD8+ und CD56+ Zellen in den verschiedenen UICC-Stadien beobachtet?*

3. *Welche unterschiedlichen Expressionsmuster wurden für PD-1, PDL-1 und PDL-2 auf intratumoralen CD4+ Zellen beobachtet? Inwieweit unterscheidet sich die Anzahl an CD4+ Zellen in den unterschiedlichen Tumorstadien und welche Gründe können für diese Daten herangezogen werden?*

4. *Sind regulatorische T-Zellen stadienabhängig in unterschiedlichem Ausmaß im Tumor nachweisbar? Welchen Einfluss könnten PD-1, PDL-1 und PDL-2 auf diese Zellen ausüben?*

5. *Welche unterschiedlichen Expressionsmuster für IL-10 und IFN- $\gamma$  werden stadienabhängig beobachtet?*

6. *Eröffnet sich für die Zukunft aus dem untersuchten Expressionsmuster für PD-1, PDL-1 und PDL-2 ein therapeutischer Ansatz für das kolorektale Karzinom?*

## **3. Material und Methoden**

### **3.1. Patientengut**

Einundachtzig Patienten mit primärem Kolonkarzinom, die in der chirurgischen Klinik der Universität Würzburg behandelt wurden, wurden in die Studie einbezogen (47 Männer und 34 Frauen mit einem mittleren Alter von 66,6 +/- 5,6 Jahren). Die Patienten wurden hinsichtlich der Stadien ihrer Primärtumore, regionaler Lymphknoten sowie ihrer Fernmetastasen beurteilt. Sie wurden in UICC-Stadien wie folgt klassifiziert: Stadium I n=16, 19,8%; Stadium II n=20, 24,7%; Stadium III n=20, 24,7%; Stadium IV n=25, 30,9%. Bei keinem dieser Patienten wurde präoperativ eine Chemotherapie durchgeführt. Tumorrelevante Daten wurden zusammen mit krankheitsspezifischen Daten in der klinikeigenen Tumorbank dokumentiert.

### **3.2. Immunhistologie**

Die Immunhistologie baut auf dem antikörperbasierten Nachweis von Zielstrukturen z.B. im Tumorgewebe auf der Proteinebene auf. Im ersten Schritt werden die fixierten histologischen Gewebestücke mit einem primären Antikörper inkubiert. Dieser Primärantikörper bindet an bestimmten Epitopen der Antigene, die er aufgrund seiner Spezifität zu diesen „erkennt“. Im zweiten Schritt erfolgt eine zweite Inkubation mit einem Sekundärantikörper, der spezifisch am Primärantikörper bindet (Speziesspezifität). Mittels eines Chromogens (häufig wird dafür 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid [DAB] verwendet) wird der Antigen-Antikörperkomplex sichtbar gemacht. Um die ungebundenen (und überflüssigen) Antikörper zu beseitigen, werden zwischen jedem Schritt „Waschschritte“ durchgeführt. Dies erfolgt normalerweise mit neutralen Lösungen (z.B. mit phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (phosphat buffered saline, PBS), die den Antigen-Antikörperkomplex (oder seine Bestandteile) nicht beeinflussen.

Um die Expression von PD-1, PDL-1, PDL-2, Foxp3, CD4, CD8, CD56, IL-10 und IFN- $\gamma$  in Tumorgewebeproben zu analysieren, wurden Einfach- und Doppelfärbungen von diesen Molekülen durchgeführt. Zusammen mit p53 wurden Doppelfärbungen von PD-1, PDL-1, PDL-2 an Tumorzellen erstellt. Dazu wurden Tumorgewebeschnitte von insgesamt 81 Pati-

enten mit kolorektalem Karzinom verschiedener UICC-Stadien verwendet. Die Analyse wurde sowohl auf Tumorgewebe, als auch auf Normalgewebe durchgeführt. Die Expression von PD-1, PDL-1, PDL-2, CTLA-4, CD25, Foxp3, und IL-10 in CD4+ T-Zellen wurde ebenfalls in einer Doppelfärbung beurteilt. Regulatorische T-Zellen (CD4+CD25+Foxp3+) wurden durch eine Immunfluoreszenz-Dreifachfärbung charakterisiert. Diese werden über die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 (Forkhead box protein 3) identifiziert, da CD25 nicht ausschließlich auf regulatorischen T-Zellen zu finden ist. Koexpression wurde mittels einer sequentiellen HRP/AP-immunenzymatischen Doppelfärbung analysiert. Serielle Kryostatschnitte (5µm) wurden für 10 Minuten in Aceton (Fa. Deventer, Holland) fixiert, dann für 10 min luftgetrocknet und anschließend mit 0.3% Peroxidase für 5 Minuten geblockt. Die Objektträger wurden mit primärem Antikörper oder Kontroll-Antikörper in TBS plus 0.5% Rinderserum-Albumin (bovine serum albumin, BSA) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend mit sekundärem HRP-konjugiertem Antikörper für ebenfalls 20 Minuten bei 37°C weiterbehandelt. Es erfolgte die Entwicklung mit 3,3'-Diaminobenzidin (Biogenex, San Ramon, CA). Die gebundenen Antikörper wurden während des ersten Färbeschrittes unter der Benutzung von En Vision K1395 Doppelfärbblock (DAKO, Glostrup, Dänemark) gemäß der Benutzungsanweisung geblockt. Die Objektträger wurden nachträglich mit dem zweiten primären monoklonalen Antikörper (mAk) in TBS plus 0.5% BSA 20 Minuten bei 37°C inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit AP-konjugiertem zweiten Sekundärantikörper ebenfalls 20 Minuten bei 37°C. Nach einer 30minütigen Applikation von Fast Red (K1395, DAKO, Glostrup, Dänemark) und einer 1minütigen Gegenfärbung mit Hämalau wurden die Objektträger mit Glycergel (DAKO, Glostrup, Dänemark) bedeckt und unter einem Nikon Eclipse TE 300 Mikroskop (Nikon Instruments, Melville, NY) analysiert. Alle Inkubationen wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die Bilder wurden mit einer Spot digital Kamera and Spot Version 3.3.2 Software Packung (Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, MI) erstellt und in Adobe Photoshop (Adobe Systems, Mountain View, CA) übertragen. Die sequentielle HRP/AP immunenzymatische Dreifachfärbung (CD4/CD25/CTLA-4) wurde mit derselben oben beschriebenen Färbemethode unter Verwendung des Doppelfärbblocks (K1395, DAKO) durchgeführt. Im dritten Färbeschritt erfolgte unter Verwendung eines weiteren alkalische Phosphatase-konjugierten Antikörpers 10 Minuten lang die Entwicklung mit BCIP/NBT (DAKO, K0598). Zytospins der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29 (HTB-38™, LGC Promochem, Wesel, Deutschland) wurden als Positivkontrollen benutzt, um zu zeigen, dass die für p53 gefärbten Zellen tatsächlich Tumorzellen waren (siehe Kapitel 11. Anhang,

Abb. 19). Im Gesunden Gewebe, welches als Referenz untersucht wurde, war keine Färbung von p53 darstellbar. Nur die Bereiche, die positiv für p53 im Gewebeschnitt waren und somit Tumorzellen repräsentierten, wurden analysiert.

### **3.2.1. Antikörper für die Immunhistologie**

Der monoklonale PD-1 (Programmed death-1) Antikörper wurde bezogen von MBL (Nakaku, Nagoya, Japan). PDL-1 (B7-H1) mAk eBioscience (San Diego, CA, USA) und PDL-2 (B7-DC) von R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland). Der anti p53 mAk (DO-7, 35-45) wurde als Marker benutzt, um die Menge von Tumorzellen und den Tumorrand zu determinieren. Für die Analyse der regulatorischen T-Zellen wurden CTLA-4 mAk (CD 152), Foxp3 (CD 127) (Abcam, Cambridge, United Kingdom), CD4+ (T-Helfer-Zellen) und CD25+ (T-aktivierte Zellen) mAk (DAKO, Glostrup, Dänemark) benutzt. Repräsentative Zytokine für die Charakterisierung der T-Zellen wurden beurteilt; zu diesen gehören: IL-10, IFN- $\gamma$  (Santa Cruz, CA). T-Zell-Subpopulationen wurden über positive Färbungen bei CD8+ (T-zytotoxische-Zelle) und CD56 (NK, natürliche Killerzelle) (DAKO, Glostrup, Dänemark) identifiziert. Isotyp-Kontroll-mAk wurden von Pharmingen (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Der zweite Antikörper war Horseradisch peroxidase (HRP)- und alkalische Phosphatase (AP)-konjugiert und wurde ebenfalls bei DAKO (Glostrup, Dänemark) erworben (siehe *Tabelle 1 u. 2*).

*Table 1:* Zusammenfassende Darstellung der verwendeten Primär-Ak für die Immunhistochemie und Angaben über Verdünnung und Hersteller der Ak.

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
p53	DAKO (Glostrup, Dänemark) M7001 Clone DO-7	1:50
CD8	DAKO (Glostrup, Dänemark) M7103 Clone C8/144B	1:50
CD4	DAKO (Glostrup, Dänemark) M0716 Clone MT310	1:50
CD56	DAKO (Glostrup, Dänemark) M0852 Clone T199	1:50
PDL-1 (B7-H1)	eBioscience (San Diego, CA, USA) 16-5983 Clone MIH1	1:50
PDL-2 (B7-DC)	R&D Systems (Wiesbaden) MAB 1224 Clone 176611	1:60
PD-1	MBL (Naka-ku, Nagoya, Japan) D132-3 Clone J110	1:50
Foxp3 (CD 127)	Abcam (Cambridge, United Kingdom) ab2481-100 goat	1:100
CTLA-4 (CD152)	BD Pharmingen (Heidelberg) 550405	1:50
CD25	DAKO (Glostrup, Dänemark) M0731 Clone ACT-1	1:50
IgG	BD Pharmingen (Heidelberg) 610410	1:25
IL-10	R&D Systems MAB 217 Clone 23738	1:100
B27 (interferon- $\gamma$ )	BD Pharmingen (Heidelberg) 550011 Clone B27	1:20

*Table 2:* Darstellung der verwendeten Sekundär-Ak für die Immunhistochemie und Angaben über Verdünnung und Hersteller der Ak.

Hase Anti-Maus HRP-konjugiert	DAKO Glostrup, Dänemark) P0161	1:50
Hase Anti-Maus AP-konjugiert	DAKO (Glostrup, Dänemark) D0314	1:50

### 3.3. Nachweis der Apoptose im TUNEL-Assay

Um Zellen mit fragmentierter DNA zu identifizieren, wurde in dieser Studie der TUNEL-Assay (terminal-deoxynucleotidyltransferase mediated d-UTP nick end-labeling), unter Verwendung von Digoxigenin-dNTP und Terminal-Transferase benutzt (ApopTag® Plus Peroxidase in Situ Apoptosis Kit, Chemicon, Planegg-Muenchen, Deutschland). Diese Methode eignet sich besonders gut für den gezielten Nachweis der Apoptose. Die im Verlauf der Apoptose entstehenden typischen DNA-Fragmente werden hierbei mit Hilfe einer terminalen Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) markiert. Diese TdT ist ein Enzym und katalysiert die Bindung der Digoxigenin gekoppelten Nukleotide an die 3'-OH-Enden der DNA-Fragmente. Diese Digoxigenin gekoppelten Nukleotide polymerisieren an den 3'-OH-Enden der DNA-Fragmente.

Anschließend können die Digoxigenin positiven Kerne durch einen anti-Digoxigenin Peroxidase-konjugierten Antikörper markiert und durch Substratumsatz (Nova Red, Linaris, Wertheim-Bettingen) des Enzyms immunhistologisch dargestellt werden.

Die endogene Peroxidase wurde mit 0.1% Hydrogen-Peroxid geblockt. Vor der Hinzugabe von Reaktions-Puffer, welcher Digoxigenin-dNTP Oligonukleotide enthielt, wurden sie in Terminal-Transferase-Puffer equilibriert. Die Digoxigenin-dNTP enthaltenen Oligonukleotid-Verlängerungen wurden anhand von anti-Digoxigenin-Peroxidase-Konjugat detektiert, welches mit einem *blocking agent* gemischt war. Danach wurde eine Färbung durchgeführt (Nova Red, Linaris, Wertheim-Bettingen) und ein Doppelfärbblock (DAKO, Glostrup, Dänemark), um Kreuzreaktionen bei der Oberflächenfärbung zu vermeiden. Der CD8+-Antikörper (DAKO) wurde über Nacht in einer feuchten Kammer auf die Zellen inkubiert und nach einem Waschschrift mit einem alkalischen Phosphatase-konjugierten anti-Maus-Antikörper (DAKO) fortlaufend inkubiert. Die einzelnen Objektträger wurden gewaschen, gefärbt (BCIP/NBT Substrate Kit, Vector Laboratories, Peterborough, UK) und gegengefärbt (Hämalaun-Färbung). Für negative Kontrollen wurden die Abschnitte mittels TUNEL reaction mixture ohne TdT inkubiert. Für positive Kontrollen wurden Gewebeschnitte von weiblichen Brustdrüsen verwendet.

Eine Doppelfärbung für TUNEL/CD8 wurde angesetzt, um die Anzahl an Tumor-infiltrierenden apoptotischen CD8+ T-Zellen zu bestimmen. Im ersten Schritt wurde, wie oben beschrieben, eine TUNEL-Färbung mit Nova Red durchgeführt. Danach wurde anti-CD8+-Antikörper (DAKO) hinzugefügt und im Folgenden mit BCIP/NBT als Substrat inkubiert. Unter dem Lichtmikroskop stellten sich die CD8+-positiven Zellen schwarz dar,

während sich die doppelt positiven CD8-Zellen in roter (TUNEL) und schwarzer Farbe (CD8+) zeigten.

Der apoptotische Index (AI) wurde als das Verhältnis von TUNEL-positiv infiltrierten Zellen zu allen gezählten infiltrierenden Zellen  $\times 100$  bestimmt. Für jede Gruppe, wurde die Anzahl gefärbter Zellen in mindestens zehn 400-fachen Vergrößerungsfeldern gezählt. Zellen wurden als apoptotisch definiert, wenn das gesamte Kernareal der Zellen positiv (rot) markiert war.

Um die Apoptose näher zu charakterisieren wurden wie in 3.2. beschrieben, Doppelfärbungen von CD4+ und CD8+ mit FAS durchgeführt (*Tabelle 3*). Weitere Doppelfärbungen von CD4+ und CD8+ mit dem FAS-Liganden sollten Hinweise dafür liefern, ob CD4+ und CD8+ T-Zellen durch Expression dieses FAS-Liganden in der Lage sind, gegenüber anderen T-Zellen apoptotisch wirksam zu sein.

*Tabelle 3:* Darstellung der verwendeten Primär-AK für die Apoptosefärbung und Angaben über Verdünnung und Hersteller der AK.

FAS (CD 95)	BD Pharmingen (Heidelberg) 610197 Clone 13	1:100
FAS-Ligand	BD Pharmingen (Heidelberg) 610410	1:100

### 3.4. Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ermöglicht die Untersuchung der Expression von zellulären Oberflächenantigenen und wird zum Nachweis von bestimmten Antikörpern herangezogen (Abb.8).

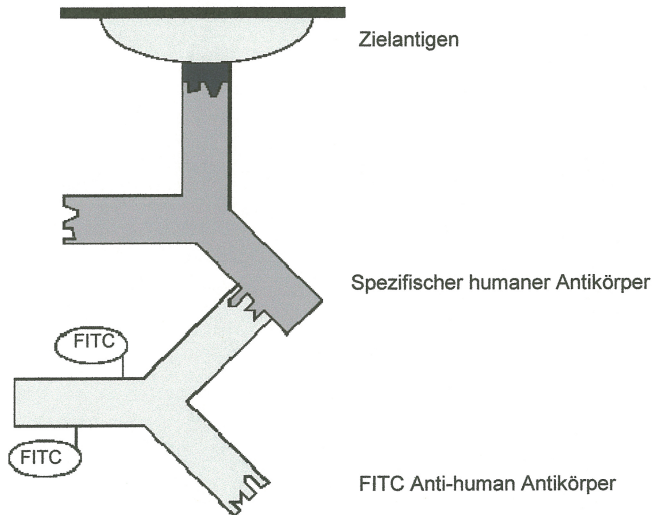


Abb.8: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz: Im ersten Inkubationsschritt binden sich Antikörper an die Festphasen-gebundenen Antigene (Zelle). Im zweiten Inkubationsschritt werden diese Antikörper mit (beispielsweise FITC-) markierten anti-Maus-Antikörpern sichtbar gemacht. Im Fluoreszenzmikroskop werden dann farbliche Emissionen sichtbar.

Die gelagerten Gewebeschnitte (-20°C) wurden in vorgekühltem Aceton 10 min fixiert. Als nächstes wurden sie für 10 min luftgetrocknet, beschriftet und dreimal je 5 min in Tris-NaCl-Puffer (pH 7,4) (ohne BSA, Fa. Merck) gespült. Anschließend wurde 100 µl für 15 min lang verdünntes Antikörper-Diluent (Chemmate, Antibody Diluent, DAKO Glostrup, Dänemark) auf die Objektträger aufgetragen. Danach wurden die Gewebeschnitte mit den unkonjugierten Primäantikörpern inkubiert.

Als Antikörperkombinationen wurden p53/PDL-1, CD4/Foxp3/PDL-1, CD4/Foxp3/PDL-2, CD4/Foxp3/PD-1 verwendet (siehe Tabelle 4 u. 5). Nach der Inkubation der Objektträger mit 100 µl Primäantikörper (über Nacht bei 4°C) wurden diese dreimal je 5 min gewaschen. Die weiteren Schritte fanden im Dunklen statt. Nach Inkubation mit Foxp3 mAκ über



Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer, wurden 100 µl Cy5-konjugierter Sekundäntikörper 1:100 verdünnt, 30 min bei Raumtemperatur aufgetragen. Danach wurde der zweite Primäntikörper (100 µl für PD-1, PDL-1 und PDL-2) auf den Objektträger aufgetragen und, nach der Inkubation bei 4°C über Nacht, wiederum dreimal je 5 min gewaschen. Anschließend wurden 100 µl des FITC- oder Cy3-konjugierten Sekundäntikörpers, 1:100 verdünnt 30 min bei Raumtemperatur aufgetragen. Nach dem Waschen wurde Maus-Serum (Biozol, Eching) 1:20 verdünnt, in Tris-Puffer 60 min bei Raumtemperatur auf die Objektträger aufgetragen. Erst dann wurde, um Kreuzreaktionen mit anderen Maus-Antikörpern zu verhindern, nach dem Waschen der PE-konjugierte dritte Primäntikörper 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Falle der Doppelfärbung von p53 mit PDL-1 erfolgte die Applikation von p53-FITC. Anschließend wurden die Objektträger gewaschen und mit Fluoreszenz-Eindeckmittel Fluoromount (DAPI, 4',6-Diamidino-2-phenylindol, Biozol, Eching) eingedeckt. Die nachfolgende Auswertung fand an einem Fluoreszenzmikroskop der Fa. Leica Camera AG (Solms) statt.

Die Färbung wurde in sechs individuellen Magnetfeldern (bei 400 facher Vergrößerung) in einem Vier-Skalen-System analysiert. Eine intensive Färbung in mehr als 50% der Zellen wurde mit +++ bezeichnet, Färbungen bei geringeren Zell-Verhältnissen (10-50%) mit ++; schwach oder leicht braun/rote Membran- oder Zytoplasmafärbungen in wenigen Zellen (< 10%) wurden als + aufgeführt, keine Expression wurde mit 0 gekennzeichnet.

*Tabelle 4:* Zusammenfassende Darstellung der verwendeten Primär-AK für die Immunfluoreszenz und Angaben über Verdünnung und Hersteller der AK.

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Foxp3	Abcam (Cambridge, United Kingdom) ab2481-100 goat	1:100
p53-FITC	Dako (Glostrup, Dänemark) F7054 Clone DO-7	1:50
PD-1	MBL (Naka-ku, Nagoya, Japan) D132-3 Clone J110	1:50
PDL-1 (B7-H1)	eBioscience (San Diego, CA, USA) 16-5983 Clone MIH1	1:50
PDL-2 (B7-DC)	R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland) MAB 1224 Clone 176611	1:60
CD4-PE	Dako (Glostrup, Dänemark) R0805 Clone MT310	1:5

*Tabelle 5:* Zusammenfassende Darstellung der verwendeten Sekundär-AK für die Immunfluoreszenz und Angaben über Verdünnung und Hersteller der AK.

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
Esel Anti-Ziege Cy5 konjugiert	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA; 715-096-150	1:100
Esel Anti-Maus Cy3 konjugiert	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA; 715-166-150	1:100
Esel Anti-Maus FITC konjugiert	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA; 705-176-147	1:100

### 3.5. RT-PCR Real Time Polymerase Kettenreaktion

Die Untersuchungen mittels Real Time Polymerase-Ketten-Reaktion wurden zur Vervielfältigung der für die Studie relevanten Gene durchgeführt (siehe Abb.9).

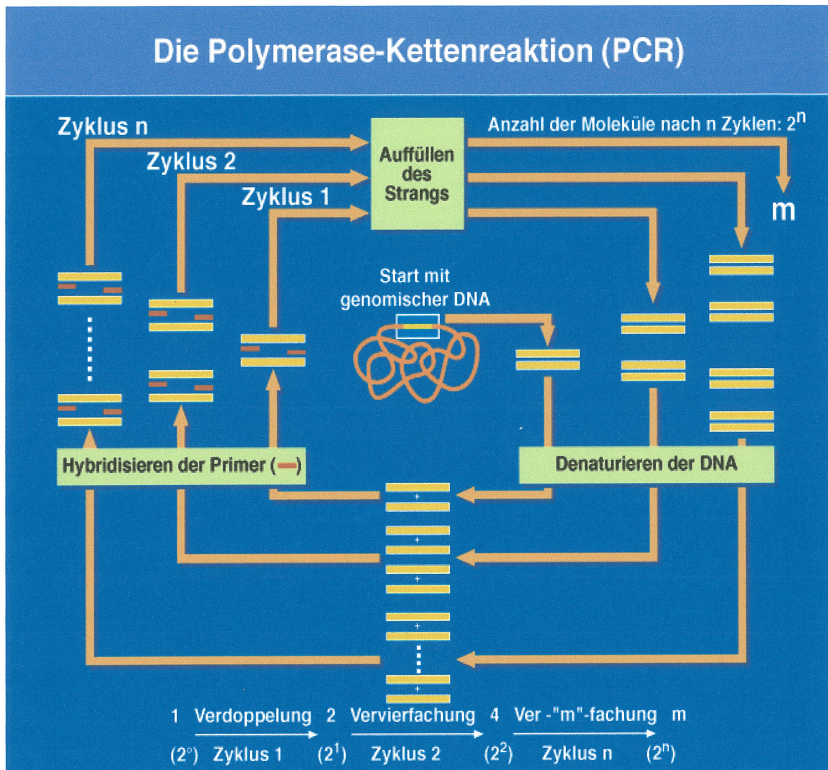


Abb.9: Vereinfachte Darstellung der PCR-Methodik. Um die Transkription eines Gens nachzuweisen, muss die abgelesene RNA untersucht werden. Bei der Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden spezifische DNA-Polymerasen verwendet, welche DNA abhängig sind. Daher wird zuerst eine Reverse Transkriptase (RT) eingesetzt, mit deren Hilfe RNA in cDNA umgeschrieben werden kann. Die cDNA kann im Anschluss als Ausgangsprodukt in einer PCR verwendet werden, um spezifische Sequenzen aus dieser zu amplifizieren.

Die Real-time PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, welche auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion beruht und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus durchgeführt. Die Fluoreszenz nimmt pro-

portional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Es gibt verschiedene Methoden, die Menge der vorliegenden DNA über Fluoreszenzsignale sichtbar zu machen. Unter anderem werden interkalierende Farbstoffe, TaqMan Sonden, Molecular Beacons u.a. eingesetzt. Die einfachste Möglichkeit zur Quantifizierung des PCR-Produktes ist hierbei der Einsatz von interkalierenden Farbstoffen wie z.B. SYBER Green. SYBER Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, dessen Fluoreszenz bei der Bindung an doppelsträngige DNA stark ansteigt. In ungebundenem Zustand ist die Fluoreszenz dieses Markers vernachlässigbar. Dieser Fluoreszenzfarbstoff ist allerdings nicht produktspezifisch, d.h. SYBR Green lagert sich in gleicher Weise an gewünschtes Amplifikationsprodukt und an eventuell anfallendes Fehlerprodukt an. Ebenso erhält man ein Fluoreszenzsignal, wenn sich Primer-Dimere ausbilden. Deshalb ist es notwendig, bei der Arbeit mit SYBR-Green gesondert zu prüfen, ob das Amplifikat „sauber“ ist. Hierbei ist es von Vorteil, dass man im SYBR Green-System im Rahmen einer PCR eine sogenannte Schmelzkurvenanalyse an die Amplifikationszyklen anschließen kann. Dies bedeutet, dass die doppelsträngige DNA zunächst aufgeschmolzen wird und die Temperatur im Reaktionsansatz langsam gesenkt wird. Das Aufschmelzen der DNA führt dazu, dass das Fluoreszenzsignal zunächst aufgehoben wird. Wenn im Well die für das jeweilige Amplifikationsprodukt spezifische Temperatur erreicht wird, bilden sich wieder DNA Doppelstränge aus, was zu einem sprunghaften Anstieg der Fluoreszenz führt.

Im Folgenden werden die angewandten Schritte kurz dargestellt:

Es wurden Proben von Tumorgewebe (n= 47) eingefroren und bei -80°C für eine RNA-Extraktion und eine RT-PCR-Analyse gelagert. RNA wurde von mindestens 10mg homogenisiertem Tumorgewebe unter der Benutzung von RNA extraction Kit (Qiagen Kit, Hilden, Deutschland) gewonnen, in DEPC-75% Ethanol gewaschen bevor es dann weiter in DEPC-Wasser (RNA-Inhibitor) gewaschen und bei 70°C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt wurde. Die Summe der gesamten RNA wurde mittels Absorptionsmessung von 260 nm bestimmt. Die Reinheit der gesamten RNA wurde festgesetzt durch die Bestätigung, dass die 260:280nm Verhältnisse innerhalb des 1.8-2.0 Ranges waren, was darauf hindeutet, dass die RNA Preparation frei von Proteinkontaminationen war.

Die RNA-Expression von repräsentativen Oberflächenmolekülen und Zytokinen (PD-1, PDL-1, CD4, CD25, CTLA-4, Foxp3, GITR, IL-10, IFN- $\gamma$ , CD8, CD56, p53) wurde in randomisiert ausgewählten kolorektalen Tumoren von 47 Patienten mittels Real time PCR analysiert. Als Referenzgen wurde das sogenannte 'house-keeping Gene' Glyceraldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) verwendet.

Die RNA wurde wie oben beschrieben entnommen. cDNA wurde unter Benutzung von 2µg Hitze-denaturierter RNA vorbereitet. Die Primer-Sequenzen sind in *Tabelle 6* (Sigma Genosys, Woodlands, TX) aufgeführt. Quantitative Real time PCR wurde in einer zwei-Schritt RT-PCR unter Zuhilfenahme von SYBR Green PCR Master Mix (PE Biosystems, Foster City, CA) mit 100ng cDNA und 300nM Primer in einem Reaktionsvolumen von 50µl hergestellt.

Die Bedingungen der PCR-Messung (Temperatur, Zyklen, Zeit) waren wie folgt: Erhitzen auf 95°C für 15 min, gefolgt von 40 Zyklen bei 95°C für 15 Sekunden und 60°C für 60 Sekunden.

Die Genprodukte wurden durchgehend gemessen mittels eines ABI Prism 7700 Sequenzdetektors (Applied Biosystems, Foster City, CA), eine relative Quantifizierung wurde gemäss der Gebrauchsanweisung durchgeführt. Alle Proben wurden während der Datenanalyse durch einen passiven Referenzfarbstoff kenntlich gemacht, der im SYBR Green PCR Master Mix enthalten war, um die Fluoreszenz-Werte von Well-zu-Well darzustellen.

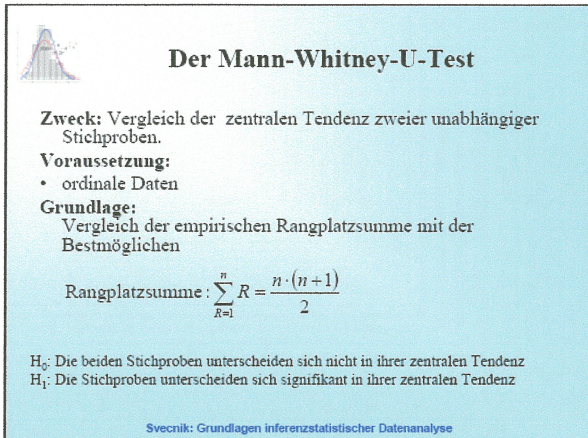
Der durchschnittliche Treshold-Zykluswert (Ct) wurde als Zyklusnummer berechnet, bei der die Fluoreszenz einen fixen Grenzwert erreicht. Die Differenz ( $\Delta Ct$ ) zwischen dem Mittelwert der Proben in den target-wells und denen der housekeeping-Gene, GAPDH, wurde bestimmt, gefolgt von der Berechnung des Unterschieds zwischen dem  $\Delta Ct$ -wert der Proben für jedes target und dem  $\Delta Ct$ -Wert der Kontrollprobe (normales Kolongewebe) für das target ( $\Delta\Delta Ct$ ). Dieser relative Quantifizierungswert wird bezeichnet als  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

*Tabelle 6: Verwendete Primer in der Real Time-PCR zum Nachweis von PD-1, PDL-1, PDL-2, CD4, CD8, CD56, Foxp3, CD25, CTLA-4, GITR, IL-10 IFN- $\gamma$  und p53. GAPDH diene als housekeeping gene.*

PD-1	Forward: 5'-CCC AAG GCG CAG ATC AA-3' reverse: 5'-GCA CTT CTG CCC TTC TCT CTG T-3'
PDL-1	Forward: 5'-AAT TGT TGG CTT TCA CTT T-3' reverse: 5'-AGC GTC TTT TTC ATA CTT CA-3'
PDL-2	Forward: 5'-GTA CAT AAT AGA GCA TGG CAG CA-3' reverse: 5'-CCA CCT TTT GCA AAC TGG CTG T-3'
CD4	Forward: 5'-CTG AGT GAC TCG GGA CAG GTC-3' reverse: 5'-GGG CAG AAC CTT GAT GTT GG-3'
CD8	Forward: 5'-CAC GGT GAA GAG GTG GAA CA-3' reverse: 5'-GCT TGC ATC CCG AQAA CAC A-3'
CD56	Forward: 5'-GTG TGG TTA CAG GCG AGG AT-3' reverse: 5'-GAT GAC ATC TGG GCC TTT GT-3'
Foxp3	Forward: 5'-GAG AAG CTG AGT GCC ATG CA-3' reverse: 5'-GGT CAG TGC CAT TTT CCC AG-3'
CD25	Forward: 5'-AAG TCC AAT GCA GCC AGT GG-3' reverse: 5'-TCC CTG CAG TGA CCT GGA AG-3'
CTLA-4	Forward: 5'-ATC GCC AGC TTT GTG TGT GA-3' reverse: 5'-GAC CTC AGT GGC TTT GCC TG-3'
GITR	Forward: 5'-GTG GCT CCC AAT GCA AAC TAC-3' reverse: 5'-CAG CCG CAC CTC AAA AGG-3'
IL-10	Forward: 5'-CTA CGG CGC TGT CAT CGA TT-3' reverse: CAC GGC CTT CGT CTT GTT TT-3'
IFN- $\gamma$	Forward: 5'-GAG TGG CAC CAA TGA TGC TG-3' reverse: 5'-GGT TTC TGG GTC ACA GAC AGG-3'
p53	Forward: 5'-TGT GAC TTC GAG ATG CCC AG -3' reverse: 5'-GGT GAA CCT GCT CTC TCG CT-3'
GAPDH	Forward: 5'-CCA GCC GAG CCA CAT CGC TC-3' reverse: 5'-ATG AGC CCC AGC CTT CTC CAT-3'

### 3.6. Statistische Analyse

Der Mann-Whitney-U-Test wurde durchgeführt, um die Signifikanz der Daten zu ermitteln. Die Signifikanz wurde bei  $p < 0.05$  ermittelt.



**Der Mann-Whitney-U-Test**

**Zweck:** Vergleich der zentralen Tendenz zweier unabhängiger Stichproben.

**Voraussetzung:**

- ordinale Daten

**Grundlage:**  
Vergleich der empirischen Rangplatzsumme mit der Bestmöglichen

Rangplatzsumme: 
$$\sum_{R=1}^n R = \frac{n \cdot (n + 1)}{2}$$

$H_0$ : Die beiden Stichproben unterscheiden sich nicht in ihrer zentralen Tendenz  
 $H_1$ : Die Stichproben unterscheiden sich signifikant in ihrer zentralen Tendenz

Svecnik: Grundlagen inferenzstatistischer Datenanalyse

Abb. 10: Der **Mann-Whitney-U-Test** ist ein parameterfreier statistischer Test. Er dient zur Überprüfung, ob zwei unabhängige Gruppen zu derselben Grundgesamtheit gehören.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. p53-Expression im Tumorgewebe

Eine Expression von p53 wurde in 37,1% derjenigen Tumorzellen gefunden, die sich im UICC-Stadium I und II befanden, während 57,1% der Zellen in Tumoren von Patienten positiv waren, deren Stadium mit III und IV beziffert wurde (*Tabelle 7*). Zusätzlich gab es eine hohe Expression von p53 in Primärtumoren, die sich in Progression befanden, als auch bei Rezidiven betroffener Patienten ( $n=30/36$ ,  $p=0,0001$ ).

### 4.2. PDL-1 - sowie PDL-2 - Expression im Tumorgewebe

Eine Expression von PD-1 auf Tumorzellen war in frühen Tumorstadien (UICC I und II) erhöht (p53/PD-1:66,6%) und in fortgeschrittenen Stadien (UICC III und IV) vermindert (p53/PD-1:36,4%), wohingegen die PDL-1-Expression auf Tumorzellen im Gegensatz zu früheren Tumorstadien (p53/PDL-1: 22,2%) signifikant bei Patienten in den UICC-Stadien III/IV erhöht war (p53/PDL-1: 60%;  $p<0,001$ , *Tabelle 7; Abb. 11, A und B vs. C/D und E/F* in der Immunfluoreszenz).

Ebenfalls konnte eine verstärkte Expression von PDL-2 in höheren Tumorstadien (UICC III/IV: 72,7%) im Vergleich zu niedrigen Stadien (UICC I/II: 44,4%) nachgewiesen werden (*Tabelle 7; Abb. 11 G und H*).



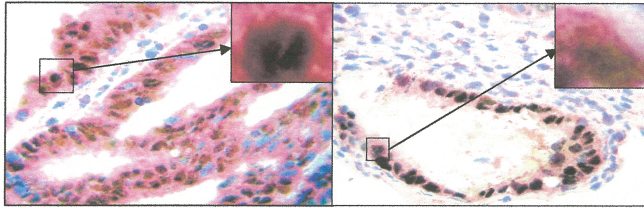
*Tabelle 7: Immunohistochemische Ergebnisse aus Tumorgewebe von Patienten mit kolorektalem Karzinom.*

	UICC I/II (% positive Zellen)	UICC III/IV (% positive Zellen)
p53	++ (37,1)	+++ (57,1)
CD4	++ (18,2)	+++ (52,5)
CD8	+++ (55,5)	++ (11,1)
CD56	+++ (55,5)	++ (11,1)
p53/PD-1	+++ (66,6)	++ (36,4)
p53/PDL-1	++ (22,2)	+++ (60,0)
CD4/PD-1	++ (44,4)	+++ (77,8)
CD4/PDL-1	+++ (77,9)	++ (45,5)
CD4/PDL-2	++ (36,4)	++ (18,2)
CD4/IL-10	++ (33,3)	+++ (63,6)
FOXP3-/IL-10	++ (33,3)	+++ (50,0)
CD4/IFN- $\gamma$	+++ (77,9)	++ (44,4)
p53/PDL-2	++ (44,4)	+++ (72,7)
CD4/Foxp3	++ (45,5)	+++ (77,8)

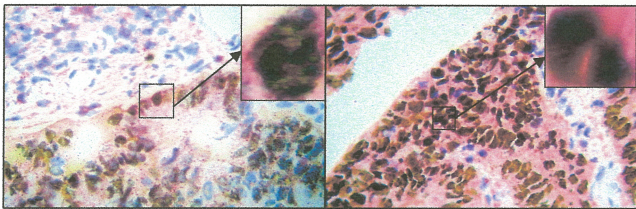
-, Keine Positivität, +, <10% Positivität, ++, 10-50% Positivität, +++, >50% Positivität

UICC I/II

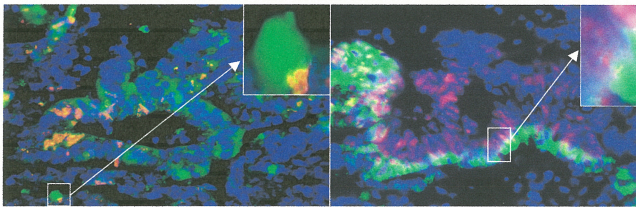
UICC III/IV



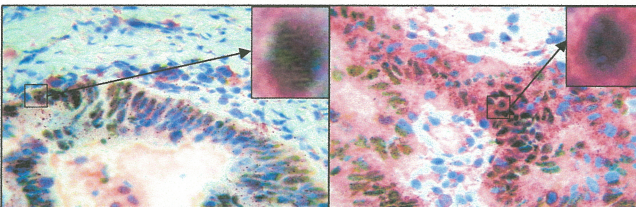
p53/PDL1



p53/PDL-1



p53/PDL-1



p53/PDL-2

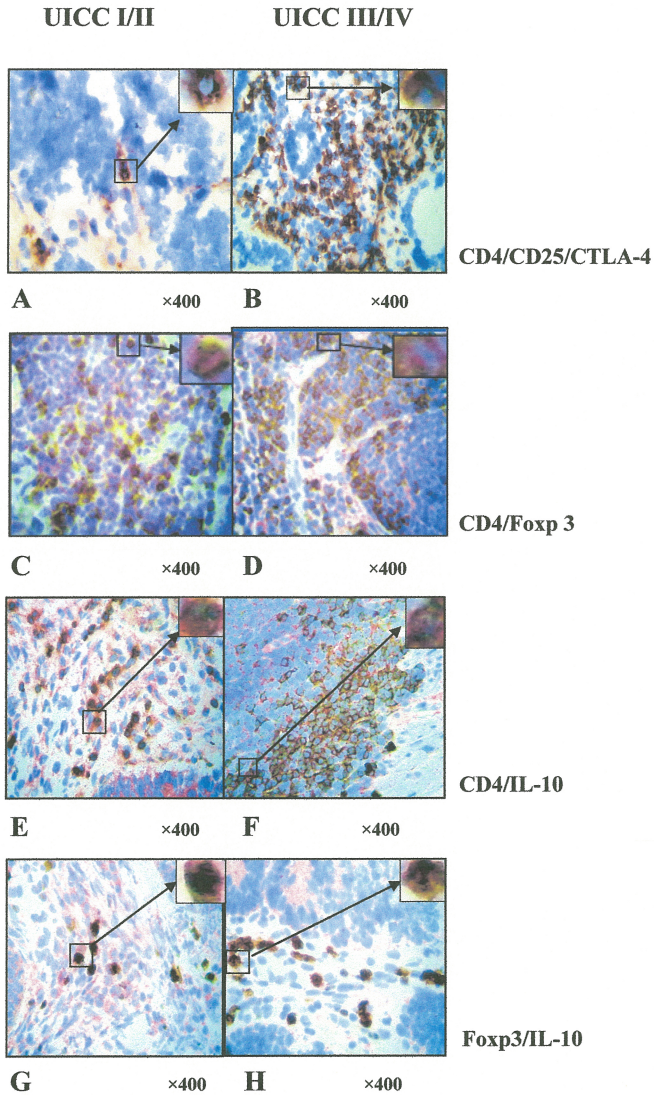
*Abb.11:* Immunhistologische Analyse von Gewebeproben der Patienten mit Kolon-Ca. Verminderte Expression von p53/PDL-1 in Stadium III/IV sowie ein erhöhter Nachweis an PDL-1 und PDL-2 in höheren Tumorstadien. Immunohistochemie von Proben humanen Kolon-CA: DAB, braune Farbe, Fast Red, rote Farbe. Siehe auch Immunfluoreszenzaufnahme in E und F: FITC, grüne Färbung, Cy3 rot/violette Färbung, nukleäre Gegenfärbung DAPI blau.

### 4.3. T-Effektor-Zellen im Tumorgewebe

Während der Progression der Erkrankung (UICC III/IV) konnte eine ausgeprägte Infiltration von CD4+ T-Zellen beobachtet werden, wobei aber weniger CD8+ oder NK –Zellen nachweisbar waren (CD4: 52,5%; CD8: 11,1%; NK: 11,1% positive Zellen;  $p < 0,001$ ; *Tabelle 7*). Diese Daten weisen darauf hin, dass, im Vergleich mit CD4+ T-Zellen die Anzahl der Tumor infiltrierenden Effektor-Zellen (CD8+ und NK-Zellen) in fortgeschrittenen Tumorstadien aufgrund zunehmender Ineffektivität der anti-Tumor-Immunantwort vermindert sind. Auf Apoptose als mögliche Ursache der verminderten Zahl an CD8+ Zellen, wird in 4.8. (S. 42) eingegangen.

### 4.4. Regulatorische T-Zellen im Tumorgewebe

Um herauszufinden, ob regulatorische T-Zellen in den Prozess der Immuntoleranz involviert sind, wurde eine Dreifachfärbung, bestehend aus CD4+CD25+CTLA4+, ebenso wie eine Doppelfärbung für CD4+/Foxp3+ durchgeführt. Eine stärkere Expression von CD4+CD25+CTLA-4+ bzw. CD4+/Foxp3+, welche, ausgehend von regulatorischen T-Zellen für eine unterdrückte Immunantwort charakteristisch ist, wurde im Tumorgewebe in den UICC-Stadien III/IV im Vergleich zu UICC-Stadien I/II beobachtet (*Abb.12*, A und B, C und D), was daraufhin hindeutet, dass die Präsenz regulatorischer T-Zellen die Tumorprogression erhöht. Außerdem wurde eine beachtlich erhöhte Expression an IL-10, welche u.a. mit regulatorischen T-Zellen assoziiert ist, bei CD4+ T-Zellen, in Verbindung mit Foxp3 im Tumorgewebe der Stadien UICC III/IV beobachtet (*Tabelle 7*,  $p < 0.0005$ ; *Abb.12*, E und F, G und H)



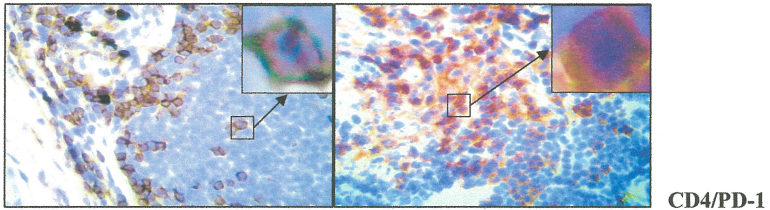
*Abb.12:* Immunhistologische Analyse von Gewebeproben der Patienten mit Kolon-Ca. Eine erhöhte Expression von CD4/CD25/CTLA-4, CD4/Foxp3, CD4/IL-10 und Foxp3/IL-10 war in höheren Tumorstadien im Vergleich zu frühen Stadien nachweisbar. DAB, braune Färbung, Fast Red, rote Färbung, BCIP/NBT blaue Färbung in der Dreifachfärbung, Hämalaun nukleäre Gegenfärbung.

#### **4.5. CD4+PD-1-, CD4+PDL-1-, CD4+PDL-2- Expression**

Eine Co-Lokalisation von CD4 positiven Zellen mit PD-1 war initial auffindbar in UICC-Stadien III/IV (77.8%; *Tabelle 7*,  $p < 0.001$ ; *Abb.13* A und B), wohingegen eine PDL-1 Expression auf CD4+ T-Zellen vor allem in UICC-Stadien I und II gefunden wurde (UICC I/II: 77.9%; *Tabelle 7*,  $p < 0.0005$ ; *Abb.13*, C und D). Eine PDL-2 Expression auf CD4+ positiven Zellen konnte ebenfalls in frühen Tumorstadien nachgewiesen werden (36,4%; *Tabelle 7*, *Abb.13*, E und F). Weiterhin war eine gesteigerte Expression von CD4+ in fortgeschritteneren Tumorstadien aufzufinden (UICC III/IV: 52.5%), wobei es sich hier um T-Effektorzellen oder regulatorische T-Zellen handeln kann (*Tabelle 7*).

UICC I/II

UICC III/IV

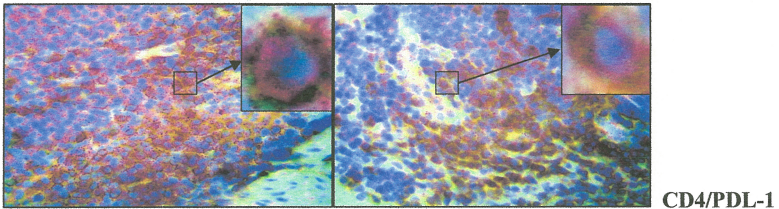


A

×400

B

×400

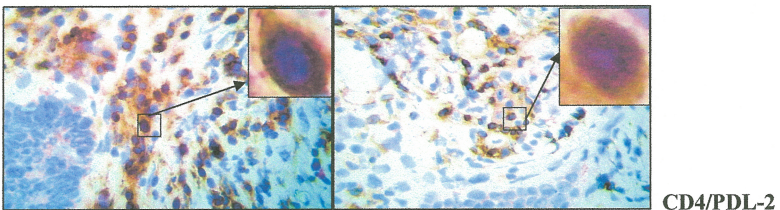


C

×400

D

×400



E

×400

F

×400

Abb.13: Immunhistologische Analyse von Gewebeproben der Patienten mit Kolon-Ca. CD4/PD-1 zeigte eine verstärkte Expression in hohen UICC-Stadien, CD4/PDL-1 und CD4/PDL-2 in niedrigeren Tumorstadien. DAB, braune Farbe, Fast Red, rote Farbe. Hämalaun, nukleäre Gegenfärbung.

#### **4.6. Expression von PD-1, PDL-1 und PDL-2 und Nachweis von T-Zell-Subpopulation und Zytokin-Expression im Tumorgewebe in der Genexpressionsanalyse**

Die Genexpression von PD-1, PDL-2, CD4, CD25, CTLA-4, Foxp3, GITR, IL-10 genauso wie p53 mRNA-Level waren bei Patienten mit fortgeschrittenen Stadien kolorektaler Karzine im Tumorgewebe signifikant erhöht ( $p < 0.0005$ ). Im Vergleich dazu waren aber die IFN- $\gamma$  -, CD8 -und CD56 (NK-Zellen) -Genexpression an Tumoren fortgeschrittener Stadien dieser Patienten reduziert. Bei PDL-1 war nur eine leichte Erhöhung in der Genexpression bezüglich höherer Tumorstadien festzustellen (*Abb.14*). Weiter ist auffällig, dass CD4 und CD25 im Gegensatz zu CD8 in höheren Stadien vermehrt aufzufinden war, was den Schluss zulässt, dass es sich bei diesen Zellen um regulatorische T-Zellen handelt. Auch dass Foxp3 in den Stadien III/IV erhöht vorzufinden war, unterstreicht diese Schlussfolgerung, da Foxp3 als ein typischer Transkriptionsfaktor für regulatorische T-Zellen gilt. Auch IL-10, welches u.a. mit regulatorischen T-Zellen assoziiert ist, war in fortgeschrittenen Stadien erhöht, wohingegen IFN- $\gamma$  vermindert nachgewiesen wurde (UICC III/IV). Auch das GITR-Gen, welches Einfluss u.a auf regulatorische T-Zellen ausübt, konnte verstärkt exprimiert nachgewiesen werden. Diese Daten korrelieren mit den Ergebnissen der immunhistologischen Analyse.

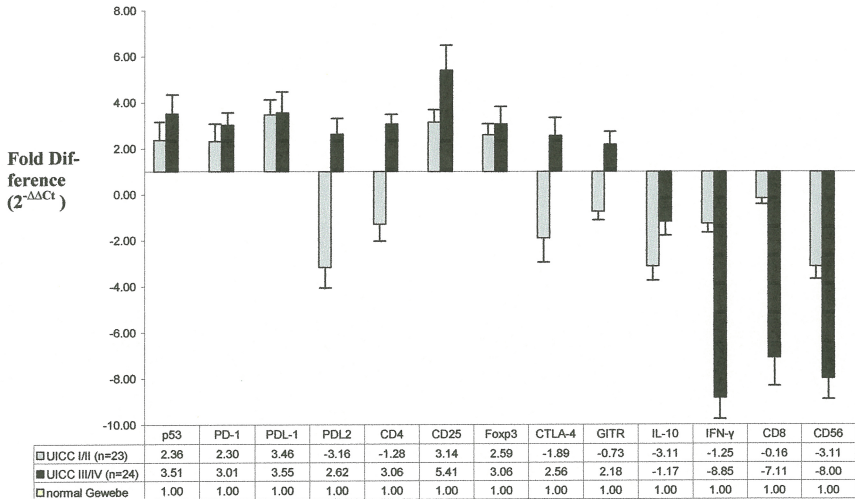


Abb.14: Genexpressionsanalyse. In der Genexpressionsanalyse ist ein eindeutig vermehrt Nachweis an p53 und PD-1 in fortgeschrittenen Tumorstadien zu beobachten, wobei PDL-1 im UICC-Stadium III/IV nur leicht vermehrt vorzufinden ist. Es konnte eine höhere Expression von CD4, CD25, Foxp3, GITR und IL-10 nachgewiesen werden. Die Genexpression von CD8, CD56 (NK-Zellen) und IFN- $\gamma$  in diesen Tumorstadien zeigt sich hingegen in verminderter Expression. Die Differenz ( $\Delta$ Ct) zwischen den durchschnittlichen Ct-Werten der Proben in den Targetells und solcher des *housekeeping genes* GAPDH, wurde bestimmt. Dann wurde die Differenz ( $\Delta\Delta$ Ct) zwischen den durchschnittlichen  $\Delta$ Ct-Werten der Proben für jedes Target und dem  $\Delta$ Ct-Wert der Kontrollprobe für dieses Target berechnet. Der relative Quantifizierungswert (*fold change*) errechnete sich als  $2^{-\Delta\Delta$ Ct}.

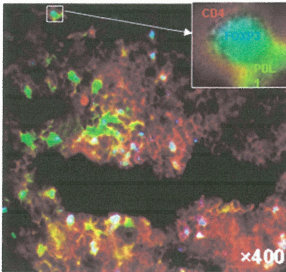
#### 4.7. CD4+Foxp3+PD-1- /PD-L1- /PD-L2-Expression

Um die Ergebnisse der Doppelfärbung und der RT-PCR quantitativ darzustellen, wurde eine für das jeweilige Tumorstadium aussagekräftige Immunfluoreszenz-Dreifachfärbung von CD4+Foxp3+PD-1 bzw. PDL-1 und PDL-2 angefertigt (Abb. 15).

In der Immunfluoreszenz-Dreifachfärbung zeigte sich in frühen Stadien im Vergleich mit späten Tumorstadien, ein deutlich erhöhter Anteil an PDL-1 und PDL-2 positiven CD4+ T-Zellen mit gleichzeitiger Foxp3-Expression. In späten Stadien überwog dagegen die Expression von PD-1 auf CD4+/Foxp3-Zellen. Dies lässt vermuten, dass regulatorische T-Zellen den PDL-1- und PDL-2-Signalweg dazu benutzen, regulierend auf T-Effektorzellen im Tumor zu wirken.

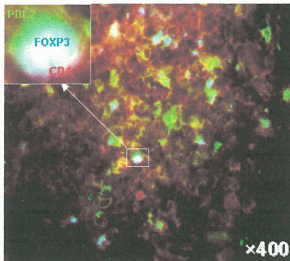


### UICC I/II



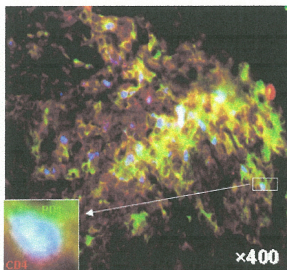
**Foxp3/PDL-1/CD4**

### UICC I/II



**Foxp3/PDL-2/CD4**

### UICC III/IV



**Foxp3/PD-1/CD4**

*Abb.15:* Immunfluoreszenz-Dreifachfärbung von Foxp3/PDL-1/CD4, Foxp3/PDL2/CD4 sowie Foxp3/PD-1/CD4. PDL-1- und PDL-2-Expression sind in Verbindung mit Foxp3 und CD4 vornehmlich in den Tumorstadien I und II nachzuweisen. Hingegen ist PD-1 in ähnlicher Konstellation in den Stadien III und IV vermehrt aufzufinden. Foxp3: Cy5, hellblaue/weiße Färbung, PD-1, PDL-1, PDL-2 : FITC, grüne Färbung, CD4: PE, rote Färbung.

## 4.8. Nachweis der Apoptose

### 4.8.1. Expression von FAS und FAS-L auf T-Zellen im Tumorgewebe

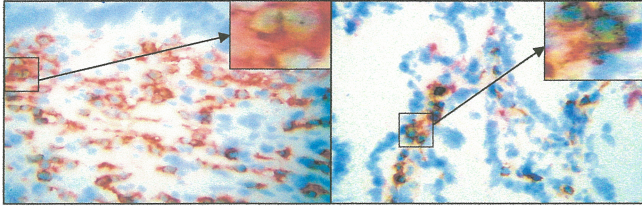
Es konnte nachgewiesen werden, dass CD4/FAS und CD56/FAS im Verhältnis zu UICC-Stadium I in den fortgeschrittenen Stadien stark vermindert war (UICC I/II vs. III/IV; CD4/FAS: 50% vs. 33,3%; CD56/FAS: 66,6% vs. 18,2%;  $p < 0,001$ ), wobei CD8/FAS nur geringfügig weniger exprimiert wurde (UICC I/II vs. III/IV; CD8/FAS: 90,9% vs. 88,9%). Ausserdem ließ sich zeigen, dass FAS-L auf allen drei zur Beobachtung herangezogenen Zelltypen (CD4, CD8, CD56) vermindert war (UICC I/II vs. III/IV; CD4/FAS-L: 77,8% vs. 60,0%; CD8/FAS-L: 44,4% vs. 10,0%; CD56/FAS-L: 77,8% vs. 18,2%; für CD8/ und CD56/FAS-L  $p < 0,0005$ ). Das am Tumor exprimierte p53/FAS-L war im Gegensatz zu p53/FAS in höheren Stadien vermehrt aufzufinden (UICC I/II vs. III/IV; p53/FAS-L: 22,2% vs. 50,0%; p53/FAS: 55,5% vs. 9,1%). (Tabelle 8, Abb.16).

Tabelle 8: Immunhistochemische Ergebnisse aus Gewebeproben von Patienten mit Kolon-Ca.

	UICC I/II (%)	UICC III/IV (%)
CD4/FAS	+++ (50,0)	++ (33,3)
CD8/FAS	+++ (90,9)	+++ (88,9)
CD56/FAS	+++ (66,6)	++ (18,2)
CD4/FAS-L	+++ (77,8)	+++ (60,0)
CD8/FAS-L	++ (44,4)	+ (10,0)
CD56/FAS-L	+++ (77,8)	++ (18,2)
p53/FAS	+++ (55,5)	+ (9,1)
p53/FAS-L	++ (22,2)	+++ (50,0)

UICC I/II

UICC III/IV



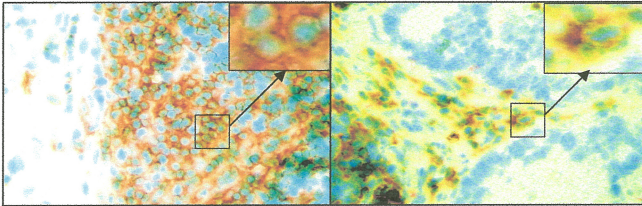
CD4/FAS

A

×400

B

×400



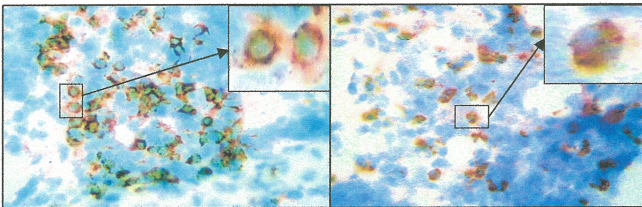
CD4/FAS-L

C

×400

D

×400



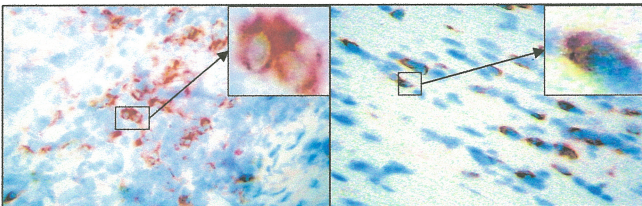
CD8/FAS

E

×400

F

×400



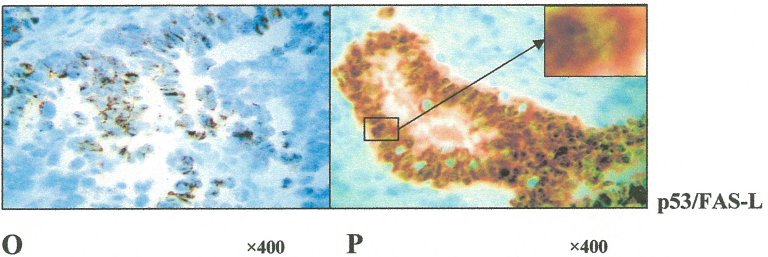
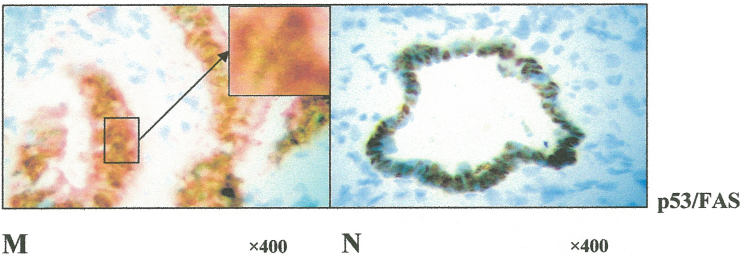
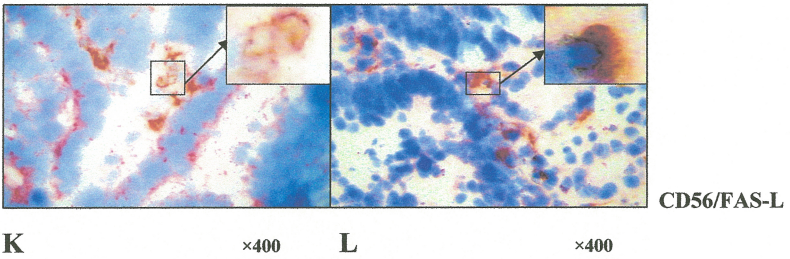
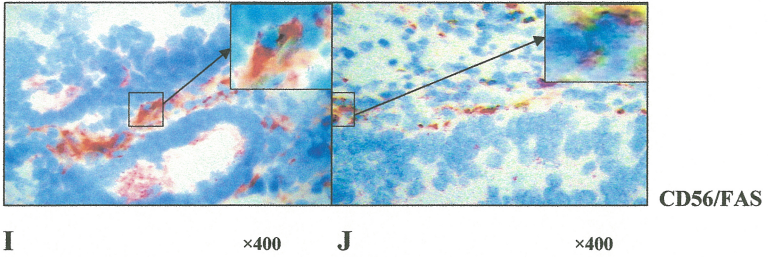
CD8/FAS-L

G

×400

H

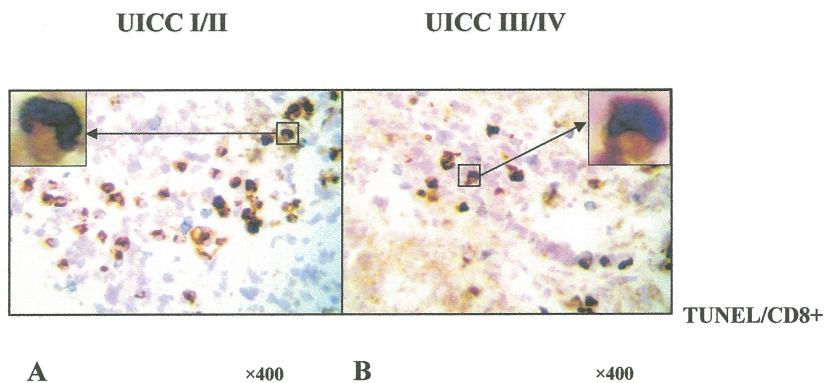
×400



*Abb. 16:* Immunhistologische Analyse von Gewebeproben der Patienten mit Kolon-Ca. Verminderte Expression von FAS und FAS-Ligand an CD4, CD8 und CD56- Zellen in fortgeschrittenen Tumorstadien. p53/FAS ist in den UICC-Stadien I/II deutlich vermehrt exprimiert (rote Farbe), p53/FAS-L ebenso deutlich exprimiert in den Stadien III und IV. Immunhistochemie: DAB, braune Farbe (als erstes), Fast Red, rote Farbe (als zweites), Hämalaun, nukleäre Gegenfärbung.

## 4.8.2. Apoptose der CD8+ T-Zellen

Um herauszufinden, wie es sich mit den CD8+ T-Zellen im Verlaufe der Krankheit verhielt, wurde die Anzahl der den Tumor infiltrierenden Zellen, welche sich im Zustand der Apoptose befanden, mittels der Doppelfärbung TUNEL/CD8 bestimmt. Um weiterhin das Schicksal der CD8+ T-Zellen im Verlauf der Erkrankung nachzuvollziehen, wurde die Anzahl der apoptotisch infiltrierten Zellen im Tumor mit Hilfe einer TUNEL/CD8-Doppelfärbung nachgewiesen. Der Apoptose-Index (AI) wurde innerhalb von Tumorproben quantifiziert. Apoptotische CD8+ (rot markiert) wurden eher bei Patienten mit UICC III und IV als in UICC I und II gefunden ( $2.6 \pm 0.8\%$  vs  $1.9 \pm 0.7\%$ , entsprechend *Abb.17*). Diese Daten stützen die Hypothese, dass die PDL-1- und PDL-2-Expression durch Immunzellen oder Tumorzellen in der Lage sind, die Apoptose-Rate von Tumor-reaktiven Zellen (CD8+ und CD56+) zu erhöhen.



*Abb.17:* Tumorassay in Gewebeproben der Patienten mit Kolon-Ca. Verstärkte Apoptose von CD8+ Zellen in erhöhten Tumorstadien (UICC III/IV). Die apoptotischen Zellen sind rötlich dargestellt. Nova Red, rot-braune Farbe, BCIP/NBT, schwarz/violette Farbe.

## 5. Beantwortung der Fragen

*1. Exprimieren humane kolorektale Karzinomzellen das kostimulatorische Molekül PD-1 sowie seine Liganden PDL-1 und PDL-2? Werden diese Moleküle stadienabhängig unterschiedlich exprimiert?*

Diese Arbeit zeigt erstmals, dass das Oberflächenmolekül PD-1 und seine Liganden PDL-1 und PDL-2 auf kolorektalem Tumorgewebe stadienabhängig unterschiedlich stark exprimiert wurden. In frühen Tumorstadien (UICC I-II) ist PD-1 im Gegensatz zu späten Stadien (UICC III-IV) verstärkt nachweisbar, wohingegen PDL-1 und PDL-2 in fortgeschrittenen Stadien vermehrt, in frühen Stadien jedoch nur schwach exprimiert sind.

*2. Welche Veränderungen werden im Zuge der unterschiedlichen Expressionsmuster für PD-1, PDL-1 und PDL-2 in Bezug auf CD8+ und CD56+ Zellen in den verschiedenen UICC-Stadien beobachtet?*

Es zeigen sich im Tumorgewebe später Stadien (UICC III/IV) im Vergleich zu den Stadien I und II deutlich weniger CD8+ und CD56+ T-Zellen. Dies deutet darauf hin, dass die zytotoxische (CD8+) und die NK(CD56)-T-Zellantwort gegenüber Tumorzellen in fortgeschrittenen Stadien abgeschwächt werden.

*3. Welche unterschiedlichen Expressionsmuster werden für PD-1, PDL-1 und PDL-2 auf intratumoralen CD4+ Zellen beobachtet? Inwieweit unterscheidet sich die Anzahl an CD4+ Zellen in den unterschiedlichen Tumorstadien und welche Gründe können für diese Daten herangezogen werden?*

Es wurde erstmals gezeigt, dass PD-1 auf CD4+ Zellen in den fortgeschrittenen UICC-Stadien III und IV verstärkt exprimiert wird. PDL-1 und PDL-2 lassen sich dagegen deutlich verstärkt in den frühen Stadien I und II, jedoch deutlich vermindert in späten Stadien auf CD4+ Zellen detektieren. CD4+ Zellen akkumulieren intratumoral in späten UICC-Stadien. Molekulargenetisch wurde dazu für fortgeschrittene Tumorstadien nachgewiesen, dass unter den CD4+ Zellen verstärkt regulatorische T-Zellen mit vorliegen. Durch die vermehrte Expression von PDL-1 auf seinen Tumorzellen wäre der Tumor damit nicht mehr auf die ‚Hilfe‘ von PDL-1 auf den regulatorischen T-Zellen zur effektiven Abwehr der Tumormimmunantwort angewiesen. Aus diesem Grunde wäre eine verminderte Expression von PDL-1 und PDL-2 auf CD4+ Zellen vorstellbar. Andererseits könnte es sich bei den verstärkt nachweisbaren CD4+ Zellen in den Stadien III/IV auch um T-Helfer-Zellen handeln,

welche durch das PD-1/PDL-1 Signal ausgehend von Tumorzellen, in ihrem Zellzyklus (G0/G1 Phase) arretiert werden. Sie wären damit morphologisch zwar weiterhin nachweisbar aber funktionell nicht wirksam.

*4. Sind regulatorische T-Zellen stadienabhängig in unterschiedlichem Ausmaß im Tumor nachweisbar? Welchen Einfluss könnten PD-1, PDL-1 und PDL-2 auf diese Zellen ausüben?*

Die Ergebnisse zeigen, dass in fortgeschrittenen Tumorstadien (UICC III/IV) im Vergleich zu frühen UICC-Stadien (I/II) eine deutlich vermehrte Anzahl regulatorischer T-Zellen im Tumor vorhanden ist. Es ist zu vermuten, dass die verstärkte PD-1 Expression auf CD4+ Zellen und die PDL-1- und PDL-2-Expression auf Tumorzellen den regulatorischen T-Zellen hilfreiche kostimulatorische Signale zur Regulation von T-Effektorzellen vermitteln. Das wiederum würde sich fördernd auf das weitere Tumorwachstum auswirken.

*5. Welche unterschiedlichen Expressionsmuster für IL-10 und IFN- $\gamma$  werden stadienabhängig beobachtet?*

Das Zytokin IL-10 wird in höheren Stadien (UICC III/IV) sowohl immunhistologisch als auch molekulargenetisch vermehrt nachgewiesen. IL-10 wirkt blockierend auf die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$ ). Es übt damit stadienabhängig einen zunehmend negativen Einfluß auf die anti-Tumor-Immunantwort aus. Das proinflammatorische Zytokin IFN- $\gamma$  ist dagegen in den fortgeschrittenen Stadien III und IV in verminderter Konzentration vorzufinden. Es ist auch hier davon auszugehen, dass IL-10 gegenüber IFN- $\gamma$  negativ-regulatorisch wirksam ist.

*6. Eröffnet sich für die Zukunft aus dem untersuchten Expressionsmuster für PD-1, PDL-1 und PDL-2 ein therapeutischer Ansatz für das kolorektale Karzinom?*

Die beschriebenen negativen Auswirkungen des PD-1-, PDL-1- und PDL-2- Signalwegs auf die anti-Tumor-Immunantwort könnten durch einen Antikörper gegen dieses Oberflächenmolekül bereits in frühen Stadien günstig beeinflusst werden. Dies würde die anti-Tumor-Immunantwort in ihrer Wirksamkeit stärken. Dominierende regulatorische T-Zellen in fortgeschrittenen Tumorstadien wären durch eine spezifische Blockade von PD-1, PDL-1 und PDL-2 durch Antikörper unter Umständen ebenso wirksam zu unterdrücken.

## 6. Diskussion

Das Programmed death-1 Signal (Programmierter Zelltod-1, PD-1) ist ein kostimulatorisches Molekül, welches inhibitorisch gegenüber T-Zellen wirken kann und so deren Aktivierung verhindert. Zwei Liganden für PD-1, PDL-1 (B7-H1) und PDL-2 (B7-DC) wurden als Zelloberflächen-Glykoproteine zugehörig zur B7-Familie identifiziert. Es konnte (wie oben erwähnt) in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass PD-1/PDL-1- sowie PD-1/PDL-2- Interaktionen zu einem Arrest des Zell-Zyklus' in der G0/G1-Phase führen und damit T-Zell-Wachstum und Zytokinausschüttung verhindern können.

Die Ergebnisse dieser Doktor-Arbeit zeigen, dass die Expression von PD-1 auf Tumorzellen in früheren Stadien (UICCI/II) des kolorektalen Karzinoms in höherem Maße detektierbar war als in späten Stadien (UICC III/IV), in denen die Expression von PD-1 erniedrigt nachgewiesen wurde. Hingegen waren sowohl die PDL-1-, als auch die PDL-2- Expression auf Tumorzellen in späten Tumorstadien signifikant erhöht. Diese Daten stimmen mit der Hypothese verschiedener Autoren (66, 78, 84) überein, dass die Expression sowohl von PDL-1 als auch von PDL-2 auf Tumorzellen helfen kann, der Zerstörung von Tumorgewebe durch reaktive T-Zellen aus dem Weg zu gehen und dies somit zu weiterer Progression des Tumors führen kann.

Die Ergebnisse befinden sich ebenfalls in Übereinstimmung mit Daten aus Tiermodellen, die die Inhibition von spezifischen gegen den Tumor gerichteten T-Zellen durch eine Expression von PDL-1 auf Tumorzellen zeigen. Tumorzellen, die PDL-1 exprimieren, wuchsen in Wildtyp-Mäusen, wurden aber in PD-1<sup>-/-</sup> Mäusen unterdrückt (78). Bei T-Zellen, die nicht den PD-1-Rezeptor exprimieren, kann über PDL-1 kein solches inhibitorisches Signal übertragen werden. Damit werden sie in ihrer anti-Tumor-Immunantwort nicht unterdrückt. T-Zellen, die kein PD-1 exprimieren, zeigen sowohl eine erhöhte Zytokinproduktion als auch eine gesteigerte Proliferation und zytolytische Aktivität gegen Tumorzellen verglichen mit T-Zellen, die *in vitro* PD-1 exprimieren. Außerdem kommt es zu einer Tumorregression *in vivo*, wenn auf T-Zellen kein PD-1 vorhanden ist (84). Diese Ergebnisse stützen die Annahme eines immunsuppressiven Effektes von PD-1/ PDL-1/ PDL-2 bezüglich der anti-Tumor-Immunantwort.

Die Expression von PDL-1 auf Tumorzellen fördert das Tumorwachstum und erhöht die Apoptoserate von tumorreaktiven T-Zellen (66). Tumorspezifische dendritische Zellen (DC) exprimieren in hohem Maße PDL-1. In Anwesenheit eines anti-PDL-1-Antikörpers waren T-Zellen, die mit myeloischen DC kultiviert wurden, verstärkt in der Lage, das Wachstum



autologer humaner Ovarial-Karzinome in NOD-SCID (Nonobese Diabetic-Severe Combined Immunodeficiency)-Mäusen einzuschränken (85). Gleichzeitig erhöhte die Applikation von anti-PDL-1-Antikörpern die Überlebensrate von Mäusen, denen PDL-1-exprimierende Tumorzellen injiziert wurden (86). Dies zeigt, dass die Hochregulation von PDL-1 auf Tumoren die anti-Tumor-Immunantwort herunterreguliert und dies hauptsächlich zur Progression des Tumors führt, wohingegen eine Blockierung von PDL-1 auf einigen in Studien untersuchten Tumoren, einen nachweislich positiven Effekt auf die anti-Tumor-Immunantwort hatte. Die erhöhte p53/PDL-1-Expression auf Tumorzellen in verschiedenen UICC-Stadien, der in dieser Arbeit untersuchten kolorektalen Karzinome lässt also vermuten, dass die PD1/PDL-1-Interaktion inhibitorische Signale zwischen Tumor und tumorspezifischen T-Zellen vermitteln könnte, die es dem Tumor ermöglichen, weiter zu wachsen.

Die Rolle von PDL-2 in der T-Zell-Regulation wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einige Autoren vertreten die Ansicht, dass PDL-2 ein inhibitorisches kostimulatorisches Molekül sei (74, 80, 87), wohingegen Andere von einem positiv-kostimulatorischen Molekül berichten, welches sich eines anderen Rezeptors als PD-1 bedient (72). In dieser Arbeit fanden sich Hinweise, dass es sich bei PDL-2, wie schon in anderen Studien angedeutet und auch für PDL-1 gezeigt, um ein negativ-kostimulatorisches Molekül handelt. In fortgeschrittenen Stadien (UICC III/IV) wurde PDL-2 im Tumorgewebe in größerem Umfang nachgewiesen. Dies lässt den Schluß zu, dass der Tumor anscheinend den inhibitorischen Effekt von PDL-2 gegenüber T-Effektorzellen zum eigenen Vorteil zu nutzen scheint.

Die Ko-Lokalisation von CD4+ T-Zellen mit einer PD-1-Expression wurde in dieser Arbeit in den UICC-Stadien III/IV verstärkt beobachtet, wobei die PDL-1- und PDL-2-Expression auf CD4+ T-Zellen zum Teil in frühen Stadien (I/II) nachweisbar war. Die Tatsache einer verstärkt nachweisbaren PD-1-Expression auf CD4+ T-Zellen in späten UICC-Stadien (III/IV) im Zusammenhang mit einer verstärkten Expression von PDL-1 und PDL-2 auf Tumorzellen ebenfalls in späten Stadien lässt vermuten, dass der Tumor als Reaktion auf die zunehmende PD-1-Expression der CD4+ T-Zellen in fortschreitenden Tumorstadien seinerseits vermehrt PDL-1 und PDL-2 exprimiert, um PD-1/PDL-1- bzw. PD-1/PDL-2-Interaktionen zwischen Tumorzelle und T-Zelle herbeizuführen. Dies hätte letztlich einen apoptotischen Tod, oder eine Inhibition im Zellzyklus der CD4+ T-Zelle zur Folge. Eine Erklärung für die vermindert nachgewiesenen Liganden PDL-1 und PDL-2 könnte man auch als einen eindeutigen Hinweis auf die zunehmende Ineffizienz der anti-Tumor-Immunantwort ansehen, da mit zunehmendem Tumorwachstum die CD4+ T-Zellen ihre Möglichkeiten einbüßen, mittels PDL-1 eine PD-1 exprimierende Tumorzelle negativ zu

beeinflussen. Molekulargenetisch wurde für fortgeschrittene Tumorstadien nachgewiesen, dass sich unter den CD4+ Zellen verstärkt regulatorische T-Zellen befinden. Man kann daher auch annehmen, dass das Malignom durch die vermehrte Expression von PDL-1 auf den Tumorzellen nicht mehr auf die Unterstützung von PDL-1 auf der Oberfläche regulatorischer T-Zellen zur effektiven Abwehr der Immunantwort angewiesen ist und es aus diesem Grunde zu einer nachlassenden Expression von PDL-1 und PDL-2 auf CD4+ Zellen kommt. Daher wäre eine verminderte Expression von PDL-1 und PDL-2 auf CD4+ Zellen vorstellbar. Schließlich könnte es sich bei den verstärkt nachweisbaren CD4+ Zellen in den Stadien III/IV auch um T-Helfer-Zellen handeln, welche durch das PD-1/PDL-1 Signal ausgehend von Tumorzellen, in ihrem Zellzyklus (G0/G1 Phase) arretiert werden und somit morphologisch zwar weiterhin nachweisbar sind, ihre Funktion aber nicht mehr in vollem Maße erfüllen können und somit für die anti-Tumor-Immunantwort ausfallen.

Die eigenen Ergebnisse zeigten, dass p53/PD-1 in fortgeschritteneren Stadien niedriger vorzufinden war, wobei in frühen Stadien eine vermehrte Expression nachgewiesen wurde. Wenn man die Beobachtungen zugrunde legt, die darlegen, dass es bei einer PD-1/PDL-1-Interaktion zu einer verstärkten IL-10-Sekretion (auch aus Tumorzellen!) kommt, was zur Folge hat, dass CD8+ CD56+ und Th1-Zellen in ihrer Aktivität eingeschränkt werden (70, 88, 89), welches also, wie oben schon angedeutet, antiinflammatorische Effekte aufweist, so ist in diesem Zusammenhang davon auszugehen, dass der Tumor mittels einer erhöhten PD-1-Expression (und der daraus folgenden Interaktion mit PDL-1 auf T-Zellen) eine verstärkte Sekretion von IL-10 herbeiführt und sich somit über diesen Weg die Wirkung des Zytokins IL-10 zum eigenen Überlebensvorteil zunutze macht (IL-10 Auswirkungen auf das T-Zell-Milieu s. *Abb. 18*). Stellt sich nur die Frage, warum der Tumor PD-1 in höheren Stadien dann vermindert exprimiert, wenn er davon ja anscheinend profitiert? Diese Frage ist nicht eindeutig zu beantworten. Vermutlich ist der Tumor auf die vorteilhaften Mechanismen, die mit einer Expression von PD-1 verbunden sind, bei fortschreitender Expansion nicht mehr angewiesen, da ihm dann scheinbar eine wirkungsvollere Waffe zur aktiven Abwehr und T-Zell-Zerstörung zur Verfügung steht. PDL-1 und PDL-2. Mit Hilfe dieser „molekularen Lanzen“, die der Tumor in fortgeschrittenen Stadien vermehrt exprimiert, eröffnet sich ihm, flankiert von regulatorischen T-Zellen, vermutlich die Möglichkeit, den Angriffen des Immunsystems wirkungsvoller auszuweichen.

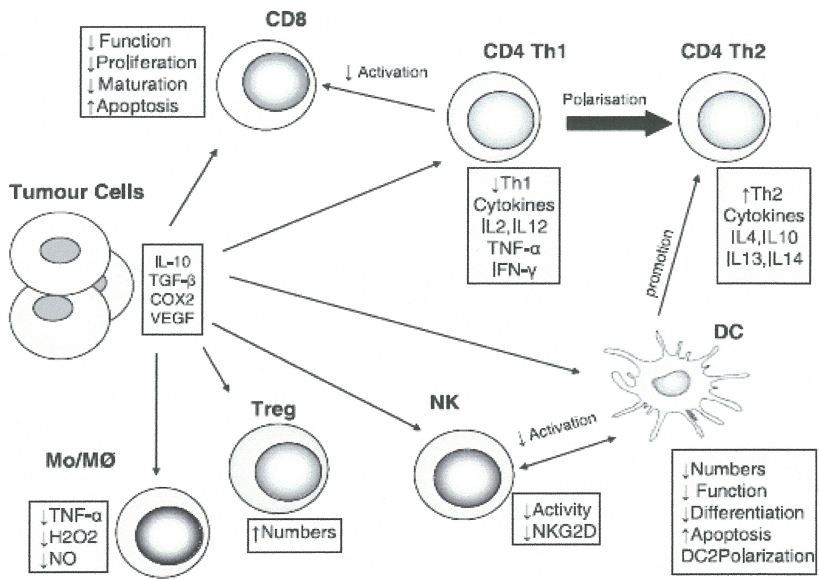


Abb.18: Darstellung von *Immune Escape* Mechanismen: Über verschiedene Mechanismen kann der Tumor dem Angriff des Immunsystems durch aktives Einwirken auf verschiedene Zellen der Immunabwehr entkommen. In diesem Zusammenhang sei insbesondere die Wirkung von IL-10 anzusprechen. Die Tumorzelle ist in der Lage, einerseits IL-10 selbst auszuschütten und andererseits die Ausschüttung von IL-10 in anderen T-Zellen zu induzieren. Beides übt einen inhibitorischen Effekt auf einige T-Zellen aus, die gegen den Tumor gerichtet sind. Ferner wirkt sich IL-10 positiv auf die Anzahl der regulatorischen T-Zellen aus. Sie besitzen einen suppressiven Effekt auf T-Effektorzellen (Quelle: Evans et al.. (89)).

Das Zytokin IL-10 ist unter anderem mit regulatorischen T-Zellen assoziiert. Es wird vermutet, dass sich IL-10 unmittelbar auf die Expression CTLA-4 von regulatorischen T-Zellen auswirkt (90). Die eigenen Ergebnisse deuten an, dass CTLA-4 in fortgeschrittenen Stadien verstärkt exprimiert wurde. In den Ergebnissen dieser Arbeit wird deutlich, dass die IL-10-Expression in kolorektalem Tumorgewebe fortgeschrittener Tumorstadien von Patienten signifikant erhöht war.

Weiterhin wurden die regulatorischen T-Zellen in kolorektalem Gewebe untersucht. Wie in Abbildung 18 aufgezeigt, sind regulatorische T-Zellen in der Lage, die Aktivität u.a. von CD4+ und CD8+ T-Zellen zu inhibieren. Sie scheinen daneben auch von Tumorzellen mittels PD-1 beeinflusst zu werden. Die Anzahl der infiltrierten regulatorischen T-Zellen mit dem charakteristischen positiven Phänotyp von CD4+CD25+CTLA-4 und Foxp3 (51, 52,

91) war in den Tumorgeweben der Patienten signifikant erhöht. Diese waren, wie in den eigenen Untersuchungen auch gesehen, insbesondere in fortgeschrittenen Krankheitsstadien (UICC III/IV) vermehrt nachweisbar. Diese regulatorischen T-Zellen können die Funktion von CD4+ und CD8+ T-Zellen unterdrücken und somit die anti-Tumorantwort weitgehend durch einen Mechanismus unterdrücken, der auf einem Zell-Zell-Kontakt und der Sekretion von Interleukinen beruht. Dabei besitzen regulatorische T-Zellen eine Spezifität für tumorassoziiertes Antigen (68). Aktiviertes Gefäßendothel generiert zudem alloantigen-spezifische CD4+CD25+Foxp3+ regulatorische T-Zellen, die die T-Zell-Proliferation *in vitro* und *in vivo* inhibieren können. Interessanterweise kann PDL-1 eine Aktivierung regulatorischer T-Zellen fördern (54). In derselben Studie wurde eine Expression von PDL-1 auf CD4+CD25+ T-Zellen gezeigt (54), was hier in den vorliegenden Ergebnissen bestätigt werden konnte. Außerdem wurde durch Horwitz et al. festgestellt, dass aktivierte T-Zellen sich in regulatorische T-Zellen differenzieren können, wenn sie mit IL-10 stimuliert werden (92). Der Tumor kann also fördernd auf die Anzahl an regulatorischen T-Zellen zum einen durch eine stärkere Expression an PDL-1 und zum anderen durch ein vermehrtes Ausschütten von IL-10 einwirken. Da diese regulatorischen T-Zellen in der eigenen Untersuchung in höheren Tumorstadien vermehrt im Tumorgewebe vorzufinden waren, ist davon auszugehen, dass der Tumor über diesen Weg der regulatorischen T-Zellen von einem weiteren Mechanismus profitiert, um der Erkennung und Zerstörung durch das Immunsystem zu entkommen.

In neueren Studien wird ein Oberflächenmolekül als verantwortlich angesehen, das eine Art Steuerungsfunktion aber auch Schutzfunktion der regulatorischen T-Zellen wahrnimmt und somit die starke Aktivität CD4+CD25+ regulatorischer T-Zellen regulieren kann. Dieses Molekül wurde als der *glucocorticoid induced tumor necrosis family-related gene receptor* (GITR, auch bekannt als TNFRSF18) identifiziert (93, 94). *In vitro*- und *in vivo*-Studien belegen, dass GITR einerseits die suppressive Wirkung der regulatorischen T-Zellen aufhebt, sowie andererseits eine Stimulation und Proliferation selbiger Zellen bewirkt (95, 96). Viele Funktionen sind aber weiterhin unklar. Aktuell wird davon ausgegangen, dass GITR sowohl einen pro- als auch anti-apoptischen Effekt über verschiedene intrazelluläre Mechanismen ausübt sowie die suppressive Aktivität der regulatorischen T-Zellen aufhebt. *In vivo* wurden Autoimmunerkrankungen über eine Stimulation von GITR gefördert. Andererseits verstärkte es aber auch die anti-Tumor-Immunantwort (97). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass GITR sowohl die Suppressor-Funktion der regulatorischen T-Zellen hemmt, ihre Proliferation fördert aber auch scheinbar widersprüchlich die Suppressor-Funktion verstärken kann.

Regulatorische T-Zellen stellen sich zusammen mit GITR als ein Modulations- oder Steuerungselement der Immunantwort dar. Man geht davon aus, dass diese verschiedenen Funktionen von GITR von verschiedenen experimentellen Modellen abhängig sind. GITR ist in der Lage, kostimulierend und aktivierend auf T-Effektorzellen einzuwirken und unterstützt damit ihre Funktion (96, 98). In dieser Arbeit wurde GITR im Tumorgewebe der Patienten der UICC-Stadien III/IV genetisch deutlich hoch exprimiert nachgewiesen. Es lässt sich also vermuten, dass in kolorektalen Karzinomen fortgeschrittener Stadien das Vorhandensein von GITR einen proliferationsfördernden Effekt auf regulatorische T-Zellen hat, da in gleichem Zuge die Anzahl regulatorischer T-Zellen in hohen Stadien nachgewiesen wurde. Dies könnte ein Teil einer *Feedback*-Schleife sein, da das Vorhandensein regulatorischer T-Zellen in fortgeschrittenen Krankheitsstadien offensichtlich teilweise über eine erhöhte Expression von GITR vermittelt wird. Dies würde weiterhin bedeuten, dass die Expression von GITR (über das vermehrte Vorkommen regulatorischer T-Zellen) einen fördernden Effekt auf das Tumorwachstum kolorektaler Karzinome hätte.

Während der Progression der Erkrankung (UICC III/IV) wurde in den Tumorgeweben eine starke Infiltration an CD4<sup>+</sup> T-Zellen gesehen. Die eigenen molekulargenetischen Untersuchungen deuten darauf hin, dass es sich bei den gemessenen CD4<sup>+</sup> Oberflächenmolekülen im Wesentlichen um regulatorische T-Zellen handelt. Hingegen wurde eine abnehmende genetische Expression für CD8<sup>+</sup> und CD56<sup>+</sup> Zellen gefunden, was zeigt, dass neben den vermutlich zytotoxischen CD8<sup>+</sup> Zellen, auch die NK(CD56<sup>+</sup>)-Zellen eine Apoptose erlitten, wobei ein direkter Zusammenhang bezüglich einer möglichen PD-1/ PDL-1/ PDL-2 Interaktion hier nicht explizit hergeleitet werden kann. Besonders im TUNEL-Assay wurde das Schicksal der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Form der Apoptose anschaulich dargestellt. Auch im Zusammenhang mit FAS und FAS-L lässt sich die starke Abnahme der CD8<sup>+</sup> oder NK (CD56<sup>+</sup>)-Zellen gut verfolgen. Der verminderte Nachweis an CD4<sup>+</sup>/FAS-Expression in höheren Stadien lässt den Schluss zu, dass es sich hier vornehmlich um CD4<sup>+</sup> T-Effektorzellen handelt und nicht um regulatorische T-Zellen, was auch unter den CD4<sup>+</sup> T-Zellen neben den CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen verstärkten Apoptose-Effekt im Zusammenhang mit einer FAS/FAS-L-Interaktion nahe legt. Stimulierte CTL's besitzen auf Ihrer Oberfläche CD95L (FAS-Ligand)-Proteine und sind damit in der Lage, alle Zellen, die FAS exprimieren, durch die Induktion der Apoptose zu vernichten. Eindeutig lässt sich in dieser Arbeit feststellen, dass in fortgeschrittenen Stadien auf CD8<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> Zellen FAS-L deutlich weniger exprimiert wird als in den frühen Stadien, was eine Abschwächung der Immunabwehr darstellt. Interessanterweise exprimieren Tumorzellen in Tumorgeweben hö-

herer Stadien zugleich vermehrt FAS-L. FAS wird dagegen in fortgeschrittenen Stadien weniger exprimiert. Somit wäre das Tumorgewebe selber mittels des FAS-Liganden gegenüber den infiltrierenden Immunzellen in der Lage, apoptotisch aktiv zu wirken. Damit würde es die Tumorummunantwort schwächen.

Andere Arbeitsgruppen zeigten, dass Interaktionen von PD-1 mit PDL-1 bzw. mit PDL-2 zu einer verminderten T-Zell-Proliferation sowie einer verminderten Ausschüttung von IFN- $\gamma$  führten. Die T-Zellen, die mit PDL-1, PDL-2 und PD-1 spezifischen Antikörpern behandelt wurden, wiesen eine höhere Ausschüttung an IFN- $\gamma$  auf, wobei aber die IL-10 Expression wenig variierte (76, 99). In einer anderen Studie wurde außerdem festgestellt, dass eine mangelhafte Expression an PDL-1 zu einer vermehrten Ausschüttung an IFN- $\gamma$  durch T-Zellen führt (100). In der eigenen Arbeit wurden diese Zusammenhänge bestätigt, da IFN- $\gamma$  in höheren UICC-Stadien auf CD4+ Zellen nur in geringeren Mengen nachgewiesen wurde, während ebenfalls bei CD4+ Zellen im selben Stadium eine vermehrte Expression an PD-1 zu beobachten war. In frühen Stadien ergab sich ein proportional entgegengesetztes Bild, da bei einer verminderten Expression an PD-1 auf CD4+ Zellen eine erhöhte Expression an IFN- $\gamma$  festzustellen war. Das zeigt, dass die in verschiedenen Studien beschriebene Beobachtung eines verminderten Nachweises von IFN- $\gamma$  während der Interaktion von PD-1 mit PDL-1 bzw. PDL-2 zwischen T-Zellen (oder zwischen der Tumorzelle und der T-Zelle), hier ihre Bestätigung findet. Das Zytokin IL-10 ist, wie oben angedeutet, in der Lage, die Synthese von pro-inflammatorischen Zytokinen durch Th1-Zellen zu hemmen, verhindert also damit auch die Produktion von IFN- $\gamma$  (*siehe Abb.18*) (81, 82). Es kann also ebenso davon ausgegangen werden, dass die verminderte Ausschüttung an IFN- $\gamma$  in höheren Stadien der hier untersuchten Tumoren mit der erhöhten Expression an IL-10 durch regulatorische T-Zellen oder durch den Tumor selbst zusammenhängt. IFN- $\gamma$  unterstützt bekanntlicherweise unter anderem die Differenzierung von T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen, die Zytotoxizität von NK-Zellen und trägt zur Makrophagenaktivierung bei. Damit weist es einen proinflammatorischen Effekt auf. Aus den hier vorliegenden Daten ist zu folgern, dass der Tumor anscheinend unter Anwendung verschiedener Mechanismen von der verminderten Ausschüttung an IFN- $\gamma$  in höheren Tumorstadien profitiert, da T-Zell-aktivierende Effekte über diesen Weg des Zytokins ausbleiben oder aber vermindert sind.

## 7. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, dass sowohl PD-1/PDL-1 als auch PD-1/PDL-2 vermittelte inhibitorische Signale dem Tumor zum Wachstum verhelfen, indem sie vor allem die CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zell-Antwort und NK-Zellen inhibieren und die Funktion regulatorischer T-Zellen erhöhen. Es kann somit festgestellt werden, dass eine Blockade der untersuchten Oberflächenmoleküle PDL-1 oder PDL-2 auf Tumorzellen humanen kolorektalen Karzinoms eine wertvolle Option in der Immuntherapie kolorektaler Tumoren darstellen könnte. Da sich eine fehlende Expression an PD-1 auf T-Zellen positiv auf das Überleben von T-Zellen auswirkt, wäre es möglich über eine Blockade von PD-1 auf T-Zellen die Tumor-Immunantwort zu verstärken. Angesichts der diskutierten Auswirkungen im Hinblick auf das Verhalten der regulatorischen T-Zellen in höheren Tumorstadien könnte sich eventuell eine Option daraus eröffnen, die regulatorischen T-Zellen mittels eines spezifischen Antikörpers gegen PDL-1 und/oder PDL-2 zu beeinflussen, um somit die hemmenden Auswirkungen gegenüber der anti-Tumor-Immunantwort zu verhindern oder zu revidieren. Zwar wird sicherlich noch einige Zeit intensiver Forschung vergehen müssen, aber vielleicht ist es schon in einigen Jahren durchaus möglich, einen therapeutischen Nutzen in dieser Richtung zu erzielen.

## 8. Zusammenfassung

Neueste Daten deuten darauf hin, dass maligne Tumoren der immunologischen Überwachung über eine Herunterregulierung der T-Zell-Aktivierung mittels eines PD-1 (programmed death 1)/ PDL-1-bzw. PD-1/PDL-2 Signals ausweichen. Dies führt offensichtlich zu einer herabgesetzten Immunantwort und kann somit das Tumorstadium fördern. Das Oberflächenmolekül PD-1, welches auf T- und B-Zellen, myeloischen Zellen und auf vielen menschlichen Karzinomen exprimiert wird, gehört zu der CD28 Familie, und PDL-1 (B7-H1) und PDL-2 (B7-DC) wurden als Liganden zu PD-1 beschrieben. Der CD28/B7 Signalweg gehört zu der Gruppe kostimulatorischer Signale, die beim Zustandekommen einer T-Zell-gerichteten Immunantwort als zweites kostimulatorisches Signal notwendig sind.

In dieser Arbeit wurde die molekulare Expression von PD-1-, PDL-1- und PDL-2, von Zytokinen und T-Zell-Subpopulationen im Tumorgewebe von 81 Patienten analysiert, die sich einer kurativen oder palliativen Operation (gemäß UICC-Stadien I-IV) eines primären kolorektalen Karzinoms unterzogen hatten. Es zeigte sich auf Protein- als auch auf molekularer Ebene erstmals, dass PDL-1 und PDL-2 im Tumorgewebe fortgeschrittener Tumorstadien (UICC III/IV) signifikant überexprimiert wurden, PD-1 dagegen erniedrigt exprimiert war. PD-1 wurde dagegen deutlich auf infiltrierenden CD4+ Zellen bei Patienten fortgeschrittener Tumorstadien (UICC III/IV) detektiert, wohingegen PDL-1 auf CD4+ Zellen in frühen Stadien gefunden wurde. Im Vergleich zu den frühen Stadien (UICC I/II) wurde eine größere Anzahl an T-Zellen mit regulatorischem Charakter in den Tumorstadien III/IV beobachtet. Letzteres würde dem Tumor im Bezug auf sein fortschreitendes Wachstum von Vorteil sein, da regulatorische T-Zellen T-Effektor-Zellen inhibieren können. Im Tumorgewebe fand sich zudem eine verminderte Expression an IFN- $\gamma$ , welches unter anderem T-Effektor-Zellen aktiviert und damit eine Immunantwort verstärkt. Das Zytokin IL-10, welches mit regulatorischen T-Zellen, aber auch mit T-Helfer (Th)2-Zellen und Tumorgewebe assoziiert ist und antiinflammatorische Eigenschaften besitzt, wurde in höheren Stadien verstärkt nachgewiesen. Dadurch verschafft es dem Tumor einen Überlebensvorteil.

Die Beobachtungen in dieser Arbeit zeigen, dass PDL-1 und PDL-2 eine Schlüsselrolle während der Tumorstadien zukommen. Regulatorische T-Zellen sind offensichtlich in den Prozess der Immunantwort gegen den Tumor mit eingebunden. Die deutliche PDL-1- und PDL-2-Expression auf T-Zellen insbesondere in frühen Tumorstadien lässt darauf schließen, dass die PD-1/PDL-1- bzw. PD-1/PDL-2- Interaktion inhibitorische Signale zwi-



schen Tumorzellen und den T-Zellen vermittelt. In fortgeschrittenen Stadien (UICC III/IV) waren diese kostimulatorischen Signale auf den T-Zellen nur vermindert vorzufinden. Dies hat zur Folge, dass der Tumor sein Wachstum ungehindert fortsetzen kann, da die anti-Tumor-T-Zell-Antwort, die den Tumor normalerweise in seiner Expansion beeinträchtigt, gestört ist.

Es wird somit festgestellt, dass eine Blockade der untersuchten Oberflächenmoleküle PDL-1 oder PDL-2 auf Tumorzellen eine wertvolle Option in der Immuntherapie des humanen kolorektalen Karzinoms darstellen könnte. Angesichts der diskutierten Tatsachen im Hinblick auf das Verhalten der regulatorischen T-Zellen in höheren Tumorstadien könnte sich eventuell eine Option damit eröffnen, die regulatorischen T-Zellen mittels eines spezifischen Antikörpers gegen PDL-1 und/oder PDL-2 zu beeinflussen, um somit die hemmenden Auswirkungen gegenüber der anti-Tumor-Immunantwort zu verhindern oder zu revidieren.

## 9. Literaturverzeichnis

1. Lee PP, Yee C, Savage PA, Fong L, Brockstedt D, Weber JS, Johnson D, Swetter S, Thompson J, Greenberg PD, Roederer M, Davis MM: Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat Med* 1999; 5(6):677-85
2. Molldrem JJ, Lee PP, Wang C, Felio K, Kantarjian HM, Champlin RE, Davis MM: Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat Med* 2000; 6(9):1018-23
3. Romero P, Dunbar PR, Valmori D, Pittet M, Ogg GS, Rimoldi D, Chen JL, Lienard D, Cerottini JC, Cerundolo V: Ex vivo staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigen-experienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 1998; 188(9):1641-50
4. Hanson HL, Donermeyer DL, Ikeda H, White JM, Shankaran V, Old LJ, Shiku H, Schreiber RD, Allen PM: Eradication of established tumors by CD8+ T cell adoptive immunotherapy. *Immunity* 2000; 13(2):265-76
5. Lehnert T, Golling M, Buchholz J: [Locally recurrent rectal carcinoma]. *Chirurg* 2004; 75(1):38-44
6. Parkin DM, Muir CS: Cancer Incidence in Five Continents. Comparability and quality of data. *IARC Sci Publ* 1992(120):45-173
7. Coleman MP, Esteve J, Damiecki P, Arslan A, Renard H: Trends in cancer incidence and mortality. *IARC Sci Publ* 1993(121):1-806
8. Eddy DM: Screening for colorectal cancer. *Ann Intern Med* 1990; 113(5):373-84
9. Cucino C, Buchner AM, Sonnenberg A: Continued rightward shift of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2002; 45(8):1035-40
10. Weir HK, Thun MJ, Hankey BF, Ries LA, Howe HL, Wingo PA, Jemal A, Ward E, Anderson RN, Edwards BK: Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2000, featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(17):1276-99
11. Wei EK, Giovannucci E, Wu K, Rosner B, Fuchs CS, Willett WC, Colditz GA: Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. *Int J Cancer* 2004; 108(3):433-42
12. Lewin MH, Bailey N, Bandaletova T, Bowman R, Cross AJ, Pollock J, Shuker DE, Bingham SA: Red meat enhances the colonic formation of the DNA adduct O6-carboxymethyl guanine: implications for colorectal cancer risk. *Cancer Res* 2006; 66(3):1859-65
13. van den Brandt PA, Goldbohm RA: Nutrition in the prevention of gastrointestinal cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20(3):589-603
14. Offit K: Genetic prognostic markers for colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342(2):124-5
15. Burt RW, DiSario JA, Cannon-Albright L: Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk. *Annu Rev Med* 1995; 46:371-9
16. Lynch HT, Lynch J: Lynch syndrome: genetics, natural history, genetic counseling, and prevention. *J Clin Oncol* 2000; 18(21 Suppl):19S-31S
17. Broome U, Lofberg R, Veress B, Eriksson LS: Primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis: evidence for increased neoplastic potential. *Hepatology* 1995; 22(5):1404-8
18. Shetty K, Rybicki L, Brzezinski A, Carey WD, Lashner BA: The risk for cancer or dysplasia in ulcerative colitis patients with primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94(6):1643-9

19. Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61(5):759-67
20. 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
21. Grady WM: Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23(1-2):11-27
22. Fearon ER: K-ras gene mutation as a pathogenetic and diagnostic marker in human cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85(24):1978-80
23. Kirsch DG, Kastan MB: Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. *J Clin Oncol* 1998; 16(9):3158-68
24. Lane DP: Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358(6381):15-6
25. Dukes CE: The surgical pathology of rectal cancer. *Am J Surg* 1950; 79(1):66-71, illust; Disc, 94
26. Dukes CE: The relation of histology to spread in intestinal cancer. *Br J Cancer* 1950; 4(1):59-62
27. Astler VB, Coller FA: The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954; 139(6):846-52
28. Hermanek P, Wittekind C, Seib HJ: [Current TNM aspects. 5. TNM classification and stage grouping]. *Zentralbl Chir* 1997; 122(10):934-7
29. Hermanek P: The superiority of the new International Union Against Cancer and American Joint Committee on Cancer TNM staging of gastric carcinoma. *Cancer* 2000; 88(8):1763-5
30. Hermanek P, Jr., Wiebelt H, Riedl S, Staimmer D, Hermanek P: [Long-term results of surgical therapy of colon cancer. Results of the Colorectal Cancer Study Group]. *Chirurg* 1994; 65(4):287-97
31. Riedl SJ, Salvesen GS: The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(5):405-13
32. Kwiatkowski DJ: Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11(1):103-8
33. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X: Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15:269-90
34. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y: An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 2002; 277(37):34287-94
35. Ashkenazi A, Dixit VM: Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11(2):255-60
36. Li H, Yuan J: Deciphering the pathways of life and death. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11(2):261-6
37. Wang S, Bajorath J, Flies DB, Dong H, Honjo T, Chen L: Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction. *J Exp Med* 2003; 197(9):1083-91
38. Harty JT, Twinnereim AR, White DW: CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:275-308
39. Kam CM, Hudig D, Powers JC: Granzymes (lymphocyte serine proteases): characterization with natural and synthetic substrates and inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1477(1-2):307-23
40. Moulian N, Berrih-Aknin S: Fas/APO-1/CD95 in health and autoimmune disease: thymic and peripheral aspects. *Semin Immunol* 1998; 10(6):449-56

41. Ghosh P, Komschlies KL, Cippitelli M, Longo DL, Subleski J, Ye J, Sica A, Young HA, Wiltrout RH, Ochoa AC: Gradual loss of T-helper 1 populations in spleen of mice during progressive tumor growth. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87(19):1478-83
42. Romagnani S: T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 2000; 85(1):9-18; quiz 18, 21
43. Chtanova T, Mackay CR: T cell effector subsets: extending the Th1/Th2 paradigm. *Adv Immunol* 2001; 78:233-66
44. Leung DY: Atopic dermatitis: the skin as a window into the pathogenesis of chronic allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96(3):302-18; quiz 319
45. Adris S, Klein S, Jasnis M, Chuluyan E, Ledda M, Bravo A, Carbone C, Chernajovsky Y, Podhajcer O: IL-10 expression by CT26 colon carcinoma cells inhibits their malignant phenotype and induces a T cell-mediated tumor rejection in the context of a systemic Th2 response. *Gene Ther* 1999; 6(10):1705-12
46. Belardelli F: Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *Apmis* 1995; 103(3):161-79
47. Mashino K, Sadanaga N, Tanaka F, Ohta M, Yamaguchi H, Mori M: Effective strategy of dendritic cell-based immunotherapy for advanced tumor-bearing hosts: the critical role of Th1-dominant immunity. *Mol Cancer Ther* 2002; 1(10):785-94
48. Hawrylowicz CM, O'Garra A: Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(4):271-83
49. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY: Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4(4):330-6
50. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S: Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299(5609):1057-61
51. Shevach EM: CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(6):389-400
52. Ramsdell F: Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? *Immunity* 2003; 19(2):165-8
53. Maloy KJ, Powrie F: Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001; 2(9):816-22
54. Krupnick AS, Gelman AE, Barchet W, Richardson S, Kreisel FH, Turka LA, Colonna M, Patterson GA, Kreisel D: Murine vascular endothelium activates and induces the generation of allogeneic CD4+25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2005; 175(10):6265-70
55. Walker LS, Chodos A, Eggena M, Dooms H, Abbas AK: Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo. *J Exp Med* 2003; 198(2):249-58
56. Fisson S, Darrasse-Jeze G, Litvinova E, Septier F, Klatzmann D, Liblau R, Salomon BL: Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med* 2003; 198(5):737-46
57. Bluestone JA, Abbas AK: Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(3):253-7
58. 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
59. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F: Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65(6):2457-64
60. Okita R, Saeki T, Takashima S, Yamaguchi Y, Toge T: CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with breast cancer and non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2005; 14(5):1269-73

61. Loddenkemper C, Schernus M, Noutsias M, Stein H, Thiel E, Nagorsen D: In situ analysis of FOXP3+ regulatory T cells in human colorectal cancer. *J Transl Med* 2006; 4:52
62. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T: Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *Embo J* 1992; 11(11):3887-95
63. Nishimura H, Honjo T: PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. *Trends Immunol* 2001; 22(5):265-8
64. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, Thompson CB, Bluestone JA: CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1994; 1(5):405-13
65. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T: Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999; 11(2):141-51
66. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon VA, Celis E, Chen L: Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002; 8(8):793-800
67. Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, Sullivan EL, Munoz O, Wood CR, Greenfield EA, Freeman GJ: Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol* 2003; 170(3):1257-66
68. Chen YH, Chiu NM, Mandal M, Wang N, Wang CR: Impaired NK1+ T cell development and early IL-4 production in CD1-deficient mice. *Immunity* 1997; 6(4):459-67
69. Winterle S, Schreiner B, Mitsdoerffer M, Schneider D, Chen L, Meyermann R, Weller M, Wiendl H: Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis. *Cancer Res* 2003; 63(21):7462-7
70. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L: B7-H1, a third member of the B7 family, costimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 1999; 5(12):1365-9
71. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T: Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000; 192(7):1027-34
72. Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky JE, Pai SI, Shalabi A, Shin T, Pardoll DM, Tsuchiya H: B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med* 2001; 193(7):839-46
73. Kroner A, Mehling M, Hemmer B, Rieckmann P, Toyka KV, Maurer M, Wiendl H: A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2005; 58(1):50-7
74. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ: PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2001; 2(3):261-8
75. Pfistershammer K, Klauser C, Pickl WF, Stockl J, Leitner J, Zlabinger G, Majdic O, Steinberger P: No evidence for dualism in function and receptors: PD-L2/B7-DC is an inhibitory regulator of human T cell activation. *Eur J Immunol* 2006; 36(5):1104-13
76. Seo SK, Seo HM, Jeong HY, Choi IW, Park YM, Yagita H, Chen L, Choi IH: Co-inhibitory role of T-cell-associated B7-H1 and B7-DC in the T-cell immune response. *Immunol Lett* 2006; 102(2):222-8

77. Wang S, Chen L: T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. *Cell Mol Immunol* 2004; 1(1):37-42
78. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N: Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(19):12293-7
79. Radhakrishnan S, Nguyen LT, Ciric B, Flies D, Van Keulen VP, Tamada K, Chen L, Rodriguez M, Pease LR: Immunotherapeutic potential of B7-DC (PD-L2) cross-linking antibody in conferring antitumor immunity. *Cancer Res* 2004; 64(14):4965-72
80. Zhang Y, Chung Y, Bishop C, Daugherty B, Chute H, Holst P, Kurahara C, Lott F, Sun N, Welcher AA, Dong C: Regulation of T cell activation and tolerance by PDL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(31):11695-700
81. Gleissner CA, Zastrow A, Klingenberg R, Kluger MS, Konstandin M, Celik S, Haemmerling S, Shankar V, Giese T, Katus HA, Dengler TJ: IL-10 inhibits endothelium-dependent T cell costimulation by up-regulation of ILT3/4 in human vascular endothelial cells. *Eur J Immunol* 2007; 37(1):177-92
82. Shkoda A, Ruiz PA, Daniel H, Kim SC, Rogler G, Sartor RB, Haller D: Interleukin-10 blocked endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells: impact on chronic inflammation. *Gastroenterology* 2007; 132(1):190-207
83. Fickenscher H, Hor S, Kupers H, Knappe A, Wittmann S, Sticht H: The interleukin-10 family of cytokines. *Trends Immunol* 2002; 23(2):89-96
84. Blank C, Brown I, Peterson AC, Spiotto M, Iwai Y, Honjo T, Gajewski TF: PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells. *Cancer Res* 2004; 64(3):1140-5
85. Curiel TJ, Wei S, Dong H, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Krzysiek R, Knutson KL, Daniel B, Zimmermann MC, David O, Burov M, Gordon A, Dhurandhar N, Myers L, Berggren R, Hemminki A, Alvarez RD, Emilie D, Curiel DT, Chen L, Zou W: Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med* 2003; 9(5):562-7
86. Strome SE, Dong H, Tamura H, Voss SG, Flies DB, Tamada K, Salomao D, Cheville J, Hirano F, Lin W, Kasperbauer JL, Ballman KV, Chen L: B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63(19):6501-5
87. Cai G, Karni A, Oliveira EM, Weiner HL, Hafler DA, Freeman GJ: PD-1 ligands, negative regulators for activation of naive, memory, and recently activated human CD4+ T cells. *Cell Immunol* 2004; 230(2):89-98
88. Gastl GA, Abrams JS, Nanus DM, Oosterkamp R, Silver J, Liu F, Chen M, Albino AP, Bander NH: Interleukin-10 production by human carcinoma cell lines and its relationship to interleukin-6 expression. *Int J Cancer* 1993; 55(1):96-101
89. Evans C, Dalgleish AG, Kumar D: Review article: immune suppression and colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24(8):1163-77
90. Bharat A, Fields RC, Trulock EP, Patterson GA, Mohanakumar T: Induction of IL-10 suppressors in lung transplant patients by CD4+25+ regulatory T cells through CTLA-4 signaling. *J Immunol* 2006; 177(8):5631-8
91. Sakaguchi S: Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:531-62
92. Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD: The role of the combination of IL-2 and TGF-beta or IL-10 in the generation and function of CD4+ CD25+ and CD8+ regulatory T cell subsets. *J Leukoc Biol* 2003; 74(4):471-8
93. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S: Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002; 3(2):135-42

94. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, Byrne MC: CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002; 16(2):311-23
95. Ronchetti S, Zollo O, Bruscoli S, Agostini M, Bianchini R, Nocentini G, Ayroldi E, Riccardi C: GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations. *Eur J Immunol* 2004; 34(3):613-22
96. Nocentini G, Riccardi C: GITR: a multifaceted regulator of immunity belonging to the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Eur J Immunol* 2005; 35(4):1016-22
97. Negrini S, Fenoglio D, Balestra P, Fravega M, Filaci G, Indiveri F: Endocrine regulation of suppressor lymphocytes: role of the glucocorticoid-induced TNF-like receptor. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1069:377-85
98. Stephens GL, McHugh RS, Whitters MJ, Young DA, Luxenberg D, Carreno BM, Collins M, Shevach EM: Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* 2004; 173(8):5008-20
99. Saunders PA, Hendrycks VR, Lidinsky WA, Woods ML: PD-L2:PD-1 involvement in T cell proliferation, cytokine production, and integrin-mediated adhesion. *Eur J Immunol* 2005; 35(12):3561-9
100. Latchman YE, Liang SC, Wu Y, Chernova T, Sobel RA, Klemm M, Kuchroo VK, Freeman GJ, Sharpe AH: PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(29):10691-6

## 10. Abbildungsverzeichnis

*Abb. 1:* Adenom-Karzinom-Sequenz: Der Verlust der p53-Gens ist der entscheidende Schritt vom Adenom hin zur Entwicklung eines Karzinoms

*Abb. 2:* Morphologische Darstellung der Entstehung des Kolon-Ca

*Abb. 3:* Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms nach UICC (überarbeitetes Schema von 2003)

*Abb. 4:* <http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Apoptose-german.png>

*Abb. 5:*

<http://www.zum.de/Faecher/Materialien/hupfeld/index.htm?/Faecher/Materialien/hupfeld/Cytologie/Apoptose/apoptose.html>

*Abb. 6:* Eigens angepasst nach Modell: [http://www.infochembio.ethz.ch/links/immunologie\\_immunantwort.html](http://www.infochembio.ethz.ch/links/immunologie_immunantwort.html)

*Abb. 7:* Eigens angepasst aus der Publikation: Wang S, Chen L; T Lymphocyte Co-Signaling Pathways of the B7-CD28 Family; Cellular & Molecular Immunology. 2004 Feb, Vol.1, No.1, pp.37-42

*Abb. 8:* Bearbeitet nach <http://www.euroimmun.de/immunflu.htm>

*Abb. 9:* Äußerst anschauliche Animationen im Internet unter:

<http://croptechnology.unl.edu/whatsNew.cgi> (letzte Kontrolle: 30.05.07) oder

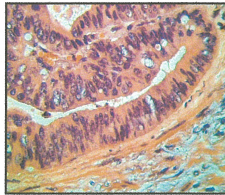
[http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/RTPCR/RT\\_PCR.html](http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/RTPCR/RT_PCR.html)

*Abb. 10:* <http://emile.uni-graz.at/pub/05W/2005-12-0042.pdf>

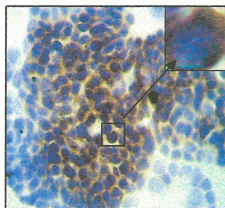
*Abb. 18:* aus der Publikation: Evans C, Dalglish AG, Kumar D: Review article: immune suppression and colorectal cancer. Aliment Pharmacol Ther 2006; 24(8):1163-77



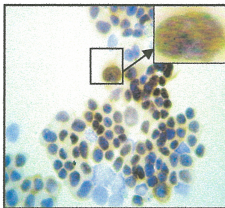
## 11. Anhang



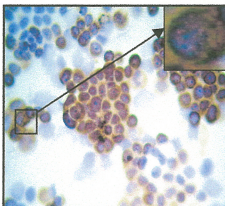
HE Kolon-Ca



PDL-1



p53



CK 20

*Abb. 19:* Zytospins der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29. Die HE (Hämatoxylin-Eosin)-Färbung von Kolongewebe zeigt einen deutlichen Nachweis kolorektalen Karzinoms. In Kolon-Ca-Zelllinien (HT 29) zeigte sich eine verstärkte Expression von PDL-1, p53 und CK 20. Immunhistochemie: DAB, braune Farbe, Hä-malaun, nukleäre Gegenfärbung.

## 12. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung(en)
APC	Antigen präsentierende Zelle
bzw.	beziehungsweise
CD	Differenzierungscluster auf Zellen, engl. cluster of differentiation
CTLA-4	cytotoxic T-Lymphocyte-associated protein 4
COX	Cyclooxygenase
Cy5	Cyanine 5
Cy3	Cyanine 3
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DC	Dendritische Zellen
Fa.	Firma
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
Foxp3	Forkhead box protein 3
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KRK	Kolorektales Karzinom
MHC	Major Histokompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
mAk	monoklonaler Antikörper
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PD-1	Programmed death-1
PDL-1/2	Programmed death Ligand-1/2
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
TCR	T-Cell-Rezeptor
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
Treg	regulatorische T-Zelle
TGF	transforming growth factor
TNF	tumour necrosis factor
UICC	International Union Against Cancer
VEGF	vascular endothelial growth factor

## **Danksagung**

Herrn Professor Dr. med. A. Thiede, dem Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Bayerischen Julius-Maximilian-Universität zu Würzburg, danke ich dafür, dass er mir die Durchführung des praktischen Teils dieser Arbeit im Labor ermöglichte.

Danken möchte ich ganz besonders meiner Doktor-Mutter Frau Prof. Dr. rer. nat. A. M. Waaga-Gasser für die hilfreiche Anleitung zur selbstständigen wissenschaftlichen Tätigkeit und der allzeit währenden großen Unterstützung. Jederzeit ansprechbar, hatte sie immer ein offenes Ohr und stand mir, nicht nur in fachlichen Belangen, mit Rat und Tat zur Seite und holte mich in schwierigen Phasen meiner Arbeit aus so manchem Tal wieder hervor. Vielen Dank!

Herrn PD Dr. med. Martin Gasser möchte ich für die sehr differenzierten und konstruktiven Diskussionen und Erörterungen meiner Ergebnisse danken, welche mir bei der Interpretation sehr geholfen haben und wichtige Sachverhalte beleuchteten.

Auch möchte ich Herrn Dr. med. dent. Martin Grimm ebenfalls herzlich für seine Unterstützung und die nützlichen Ratschläge in der Immunhistologie danken, die zum Gelingen dieses Werkes beigetragen haben.

Ebenso gilt mein Dank dem ganzen Team der Molekularen Onkoimmunologie, insbesondere Frau Andrea Trumpfheller und ihrer unermüdlichen Umsorgung.

Allen Mitdotorandinnen und Mitdotoranden möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit und die Kameradschaft danken, die das Arbeiten, selbst zu später Stunde so angenehm gestaltet hat.

Mein herzlicher und ganz besonderer Dank gilt meinen liebevollen Eltern und meiner mir immer zur Seite stehenden und verständnisvollen Frau Anita!



## Lebenslauf von Matthias Königshausen

### Persönliche Daten

Geburtsdatum	15.01.1979
Geburtsort	Düsseldorf
Nationalität	deutsch

### Schulische Ausbildung

1985 - 1989	Grundschule Florenzstraße in Düsseldorf
1989 - 1999	Görres-Gymnasium in Düsseldorf
April 1999	Abitur

### Wehrdienst

Juli 1999- Juli 2000	Grundwehrdienst im 1. Stabs- und Fernmelderegiment 310, Jäger im Sicherungszug des Heeresführungskommandos in Koblenz.
----------------------	--

### Medizinstudium

Wintersemester 2000	Beginn des Medizinstudiums an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
---------------------	--

August 2002	Ärztliche Vorprüfung
August 2003	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August 2005	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
November 2006	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

28. November 2006	Approbation
-------------------	-------------

## Praktika und Famulaturen

- August-Oktober 2000      Pflegepraktikum am EVK in Düsseldorf
- März 2003                      Chirurgie:  
Dr.med. D. Leder, St Hedwigs KH, Akademisches  
Lehrkrankenhaus der Charité; Berlin
- Februar 2004                      Radiologie:  
Univ.- Prof. Dr. med. R. Fotter  
Universitäts Klinikum Graz; Graz, Österreich
- August 2004                      Plastische Chirurgie:  
Brustzentrum des Gerresheimer KH  
Prof. Dr.med. Audretsch und PD Dr.med. Andree, Kliniken  
der Landeshauptstadt Düsseldorf, Lehrkrankenhaus der  
Heinrich- Heine- Universität zu Düsseldorf
- September 2004                      Unfallchirurgie/ Chirurgie (Notaufnahme):  
Dr.med. Roger o. Rodriguez, Allgemeinchirurgie  
Hospital San Rafael, San Salvador; El Salvador,  
Mittelamerika
- Ausbildung im Praktischen Jahr (PJ)
- Oktober- Januar 2005/2006      Chirurgie/ Unfallchirurgie:  
Prof. Dr.med. J. Klinger Roitman  
Hospital Gustavo Fricke, Lehrkrankenhaus der Universität  
von Valparaiso; Viña del Mar, Chile  
Während dieses Tertials: (20.-23.Nov.2005) Teilnahme am  
chilenisch/ internationalen Chirurgenkongress in Pucon  
(Chile)
- Februar- März 2006                      Gynäkologie:  
Dra.med. Chami, Hospital van Buren;  
Universitätsklinikum von Valparaiso; Valparaiso, Chile
- April- Mai 2006                      Gynäkologie:  
Univ. -Prof. Dr.med. Dietl  
Frauenklinik der Julius-Maximilian-Universität zu  
Würzburg; Würzburg, Bayern
- 2006 Juni-Sept.                      Innere Medizin (Nephrologie)/ Transplantationschirurgie/  
Plastische Chirurgie  
Barbara Murphy, M.D. Associate Professor, Nephrology  
Mount Sinai School of Medicine, Mount Sinai Medical  
Center; New York, N.Y., USA

## Experimentelle Dissertation

Molekulare Onkoimmunologie der Chirurgie  
des Universitätsklinikums zu Würzburg  
Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. A. Thiede  
Thema: PD-1/ PDL-1/ PDL-2 Expression und infiltrierende  
T-Zellen in Kolorektalem Karzinom verschiedener UICC-  
Stadien und seine Auswirkung auf die Immunantwort.  
In Betreuung bei Prof. Dr. rer. nat. A.-M. Waaga-Gasser

## Jetzige Tätigkeit

Seit 1. August 2007

Assistenzarzt in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik  
Berufsgenossenschaftliches Universitätsklinikum  
Bergmannsheil, Ruhr-Universität Bochum  
Direktor: Prof. Dr. med. G. Muhr

## Originalarbeiten

Gasser M, Hom S, Grimm M, Bueter M, Nichiporuk E, **Koenigshausen M**, Gerstlauer C, Thalheimer A, Thiede A, Gassel H-J, Meyer D, Waaga-Gasser AM.  
Assessment of relevant prognostic tumor markers involved in apoptosis in patients with colorectal cancer. *Langenbecks Arch Chir* 2005.

Grimm M\*, **Koenigshausen M\***, Gasser M, Lutz J, Lebedeva T, Nichiporuk E, Thiede A, Heemann U, Meyer D, Waaga-Gasser AM.  
PD-1/PD-L1 expression in colorectal cancer and its implications for tumor immune evasion. *Brit J Cancer* 2007 (in press) - \***Co-Erstauthor**

## Buchbeiträge

Gasser M, Hom S, Grimm M, Bueter M, Nichiporuk E, **Koenigshausen M**, Gerstlauer C, Thalheimer A, Thiede A, Gassel H-J, Meyer D, Waaga-Gasser AM.  
Assessment of relevant prognostic tumor markers involved in apoptosis in patients with colorectal cancer.  
*In: Chirurgisches Forum 2005 für Experimentelle und Klinische Forschung. (Ed. A. Encke), Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hong Kong, London, Milan, Paris, Singapur, Tokyo.*

## Zitierfähige Abstracts

Gasser M, Bueter M, Gassel AM, Meyer D, Mueller A, Schramm N, Trumpfheller A, Mueller S, Hom S, Gerstlauer C, **Koenigshausen M**, Thiede A, Waaga-Gasser AM  
Comparison of p53 antibody status and carcinoembryonic antigen (CEA) levels and their clinical impact as diagnostic markers in colorectal cancer patients  
*The International Journal of Biological Markers* 2004;19(3):22

Gasser M, Grimm M, Hom S, Bueter M, **Koenigshausen M**, Thalheimer A, Mueller S, Thiede A, Gassel HZ-J, Meyer D, Waaga-Gasser AM  
Relevant prognostic markers involved in apoptosis in colorectal cancer  
*96<sup>th</sup> Annual Meeting Proceedings, American Association for Cancer Research (AACR) 2005;46:529*

Gasser M, Bueter M, Grimm M, Hom S, **Koenigshausen M**, Thalheimer A, Mueller S, Thiede A, Gassel H-J, Meyer D, Waaga-Gasser AM  
Relevant prognostic markers involved in apoptosis in colorectal cancer  
*Annual Meeting Proceedings, American Society of Clinical Oncology (ASCO) 2005;24*

Gasser M, Grimm M, Nichiporuk E, Bueter M, Lutz J, Lebedeva T, **Koenigshausen M**, Thiede A, Heemann U, Meyer D, Waaga-Gasser AM  
PD-1/PDL-1 expression in colorectal cancer and its implications for tumor immune evasion.  
*Journal of Clinical Oncology, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol 24, No. 18S (June 20 Supplement), 2006: 10046.*

### Poster Präsentationen

Gasser M, Bueter M, Gassel AM, Meyer D, Mueller A, Schramm N, Trumpfheller A, Mueller S, Hom S, Gerstlauer C, **Koenigshausen M**, Thiede A, Waaga-Gasser AM  
Comparison of p53 antibody status and carcynoembryonic antigen (CEA) levels and their clinical impact as diagnostic markers in colorectal cancer patients  
*3rd International EORTC-NCI Meeting on Cancer Molecular Markers from Discovery to Clinical Practice, Brussels, Belgium, 18.04. – 20.04.2004*

Gasser M, Grimm M, Bueter M, Hom S, Nichiporuk E, Gerstlauer C, Thalheimer A, **Koenigshausen M**, Thiede A, Meyer D, Waaga-Gasser AM  
Assessment of relevant prognostic tumor markers involved in apoptosis in patients with colorectal cancer  
*13th International AEK/AIO Cancer Congress, Würzburg, 13.03. - 16.03.2005*

Gasser M, Grimm M, Hom S, Bueter M, **Koenigshausen M**, Thalheimer A, Mueller S, Thiede A, Gassel HZ-J, Meyer D, Waaga-Gasser AM  
Relevant prognostic markers involved in apoptosis in colorectal cancer  
*96<sup>th</sup> Annual Meeting, American Association for Cancer Research (AACR), Anaheim, CA, 16.04. – 20.04.2005*

### Fremdsprachen

Englisch	(fließend in Wort und Schrift)
Spanisch	(Gute Kenntnisse)
Latein	(Grosses Latinum, 7 Jahre im Gymnasium)
Alt-Griechisch	(Graecum, Leistungskurs, 5 Jahre im Gymn.)



## Weitere akademische Erfahrungen neben dem Medizinstudium

WS 2003- WS 2006/07      Zweitstudium (5 Semester): Studium der Politischen  
Wissenschaft an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität  
zu Würzburg  
Hierbei: Vorträge/ Referate/ Präsentationen, schriftliche  
Ausarbeitungen, Seminarteilnahmen

## Mitgliedschaften

Seit April 2005              Membership in the Academy of Political Science, 475 Riverside  
Drive, New York, NY, USA  
Seit Februar 2005          Im Arbeitskreis Außen- und Sicherheitspolitik Würzburg aktiv  
Seit Oktober 2003          Aktives Mitglied Deutsche-Atlantische Gesellschaft e.V.  
Seit 1999                      Mitglied im Verein für Kriegsgräber- und Volksfürsorge e.V.  
1989 - 1999                  Kirchenchor St.Andreas mit Konzerten im In- und Ausland

Düsseldorf, den 31.08.07

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'J. Königshausen', written in a cursive style.





