

Aus der Klinik und Poliklinik für
Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie
Chirurgische Klinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Christoph-Thomas Germer
Molekulare Onkoimmunologie
Prof. Dr. rer. nat. Ana Maria Waaga-Gasser

Die Bedeutung von tumorzellassoziierter CD137L-
Aktivierung für das Proliferationsverhalten und das
Proteinexpressions- und -sekretionsprofil von
humanen Kolonkarzinomzellen

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Simone Caroline Osterholt, geb. Callies
aus Geesthacht

Würzburg, März 2022

Referent: Prof. Dr. med. Martin Gasser
Korreferentin: Prof. Dr. med. Michael Hudecek
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Oktober 2022

Die Promovendin ist Ärztin.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Grimmig T, Gasser M, Moench R, Zhu LJ, Nawalaniec K, **Callies S**, Wagner M, Polat B, Mothi SS, Luo Y, Ribas CM, Malafaia O, Hsiao LL, Waaga-Gasser AM (2019). Expression of Tumor-mediated CD137 ligand in human colon cancer indicates dual signaling effects. *Oncoimmunology*, 8(12): e1651622. doi: 10.1080/2162402X.2019.1651622

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das kolorektale Karzinom	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Ätiologie	2
1.1.3	Klinische Klassifikation	2
1.1.4	Therapie	3
1.2	Immunsystem	3
1.2.1	Angeborene (nicht-spezifische) Immunantwort	3
1.2.2	Erworbene (spezifische, adaptive) Immunantwort	4
1.2.3	T-Zellen und T-Zell-Rezeptoren	4
1.2.4	CD137 und CD137L	7
1.3	Tumorimmunologie	9
1.3.1	Tumorentstehung	9
1.3.2	Tumorprogression	9
1.3.3	Metastasierung	10
1.4	Fragestellungen der Arbeit	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.1.1	Zellkulturlinien	13
2.1.2	Vorgefertigte Nährmedien, Puffer und Reagenzien	13
2.1.3	Selbst-angesetzte Puffer	15
2.1.4	Antikörper	15
2.1.4.1	Primärantikörper	15
2.1.4.2	Sekundärantikörper	16
2.1.5	Laborgeräte	16
2.1.6	Verbrauchsmaterialien	17
2.1.7	Software	18
2.2	Methodik	18
2.2.1	Zellkultur	18
2.2.1.1	Auftauen der Zellen	18
2.2.1.2	Kultivieren der Zellen	18
2.2.1.3	Färben und Zählen der Zellen	19
2.2.1.4	CD137-Stimulation der Zellen	19
2.2.1.5	Hypoxie-Behandlung der Zellen	20

2.2.2	Gelelektrophorese und Western Blot.....	20
2.2.2.1	Aussaat der Zellen und Herstellung der Zelllysate	20
2.2.2.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	21
2.2.2.3	Western Blot.....	21
2.2.2.4	Immundetektion.....	21
2.2.3	MTS-Zellproliferationsassay	22
2.2.4	Luminex Multiplex-Assays	22
2.3	Statistische Analysen.....	23
3	Ergebnisse.....	24
3.1	Das Proliferationsverhalten nach CD137L-Stimulation	24
3.2	Die Proteinexpression von Vimentin nach CD137L-Stimulation	26
3.3	Die Proteinexpression von TLR7 nach CD137L-Stimulation.....	27
3.4	Die PDGF- und VEGF-Sekretion nach CD137L-Stimulation.....	28
3.4.1	Die Sekretion von PDGF.....	28
3.4.2	Die Sekretion von VEGF	29
3.5	Die CD137-Proteinexpression nach Hypoxiebehandlung	30
3.6	Beantwortung der Fragen	31
4	Diskussion.....	34
4.1	Auswirkungen der CD137L-Stimulation auf die Zellproliferation.....	34
4.2	Auswirkungen der CD137L-Stimulation auf das Proteinexpressions- und -sekretionsprofil der Zellen	35
4.2.1	Vimentin.....	35
4.2.2	TLR7	36
4.2.3	VEGF und PDGF	38
4.2.3.1	VEGF und Metastasierung	40
4.2.3.2	PDGF und Metastasierung	41
4.3	Einfluss von Hypoxie.....	42
4.4	Limitationen	43
4.5	Klinische Bedeutung und Ausblick	44
5	Zusammenfassung.....	46
6	Literaturverzeichnis.....	47
I.	Abkürzungsverzeichnis	
II.	Abbildungsverzeichnis	
III.	Tabellenverzeichnis	
IV.	Danksagung	

V. Lebenslauf

VI. Eigene Veröffentlichungen

1 Einleitung

Krebserkrankungen stellen eine der häufigsten Todesursachen weltweit dar (Weltgesundheitsorganisation, 2018). Nachdem die onkologische Therapie lange aus den drei Säulen der operativen Therapie, Chemo-, sowie Strahlentherapie aufgebaut war, kommen zur Optimierung der Ergebnisse seit einigen Jahren immer neue Therapieansätze hinzu. Besonders die Interaktionen zwischen Tumorzellen und der Tumormikroumgebung bzw. des Immunsystems spielen diesbezüglich eine entscheidende Rolle, da sie im Rahmen der neuartigen Immuntherapien verschiedene vielversprechende Ansatzpunkte für eine medikamentöse Beeinflussung bieten. In diesem Zusammenhang rückte aktuell unter anderem das Rezeptor-Liganden-Paar CD137/CD137L in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses, da es maßgeblich an der Regulation dieser Interaktionen beteiligt ist (Chester et al., 2016; Marin-Acevedo et al., 2018).

Im Rahmen des kolorektalen Karzinoms (CRC, engl. *colorectal cancer*), welches eine der häufigsten malignen Neoplasien weltweit darstellt, zeigen sich bislang nur in bestimmten Subgruppen therapeutische Erfolge von Immuntherapien (Lichtenstern et al., 2020), über die Rolle des Liganden CD137L auf den Tumorzellen und somit auch über potenzielle Möglichkeiten einer medikamentösen Beeinflussung dieses Proteins ist allerdings noch kaum etwas bekannt. Daher soll es das Ziel dieser Arbeit sein, mehr Einblicke in die Funktion von CD137L auf Kolonkarzinomzellen und dessen Beeinflussung der Proliferation und des Proteinexpressions- und -sekretionsprofil der Tumorzellen zu bekommen.

1.1 Das kolorektale Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts (RKI) war Darmkrebs im Jahr 2016 in Deutschland für 11,1 % der Krebsneuerkrankungen bei Frauen und 12,5 % bei Männern verantwortlich. (Der nicht-melanotische Hautkrebs war von der Statistik ausgenommen.) Im selben Jahr war er zudem die Ursache von knapp 25.000 Todesfällen in Deutschland und belegte damit bei beiden Geschlechtern Platz drei der krebsbedingten Sterbefälle. Krebserkrankungen des Dickdarms bilden hierbei mit einem Anteil von fast zwei Dritteln die häufigste Darmkrebsentität (Robert Koch-Institut, 2019).

Trotz insgesamt sinkender Inzidenz trug die demographische Entwicklung dazu bei, dass die Anzahl der Neuerkrankungen zwischen 2003 und 2012 lediglich minimal sank. Langfristig ist zu befürchten, dass die Fallzahlen des kolorektalen Karzinoms aufgrund der veränderten Altersstruktur der Bevölkerung und einer Zunahme der Risikofaktoren Übergewicht und Adipositas in Zukunft eher wieder ansteigen werden (Nowossadeck et al., 2014).

1.1.2 Ätiologie

Über 90 % aller kolorektalen Karzinome sind Adenokarzinome, von denen die meisten sporadisch entstehen. Den größten Risikofaktor für die Entstehung eines solchen Karzinoms stellt das Alter dar (Marmol et al., 2017).

Mittlerweile sind weitere Risikofaktoren bekannt: Vor allem Übergewicht, Adipositas, Nikotin- und Alkoholkonsum und bestimmte Ernährungsweisen mit besonders fett- und fleischreicher und ballaststoffarmer Diät sind hier zu nennen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass nicht nur kolorektale Adenome, sondern auch chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED), v.a. die Colitis ulcerosa das Darmkrebsrisiko erhöhen (Haggart et al., 2009). Andererseits scheinen körperliche Bewegung, eine fettarme, vitamin- und ballaststoffreiche Ernährung, eine regelmäßige und langjährige Einnahme von Nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) oder auch eine postmenopausale Hormonersatztherapie protektive Effekte hinsichtlich des kolorektalen Karzinoms aufzuweisen (Recio-Boiles et al., 2017).

Neben den sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinomen sind auch genetische Prädispositionen für Darmkrebs bekannt. Hier sind die – eine Keimbahnmutation im APC-Gen aufweisende – familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre non-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC), auch als Lynch-Syndrom bezeichnet, zu nennen (Boland et al., 2018).

1.1.3 Klinische Klassifikation

Wie bei jeder soliden Tumorerkrankung gibt es für das kolorektale Karzinom eine TNM-Klassifikation, welche im Anschluss an ein Staging die lokale Tumorausdehnung, den Lymphknotenbefall und den Metastasierungsstatus beschreibt. Anhand dieser Klassifikation erfolgt dann die Stadieneinteilung der UICC (*Union internationale contre le cancer*) in Stadium I bis IV. Mittels dieser Einteilung lassen sich prognostische Aussagen und häufig auch Therapieentscheidungen treffen (Rodriguez-Bigas et al., 2017).

1.1.4 Therapie

Bei der Therapie des lokal begrenzten kolorektalen Karzinoms stellt die chirurgische Exzision des kompletten Tumors und der dazugehörigen Gefäße und Lymphabflussstationen die einzige kurative Maßnahme dar. Eine zytostatische Chemotherapie kann zusätzlich in (neo-) adjuvanter oder, als Alternative zur chirurgischen Intervention, in palliativer Intention sinnvoll sein. Eine Radiatio wird routinemäßig nur bei einer Lokalisation des Tumors im Rektum, nicht aber im Kolon durchgeführt (Rodriguez-Bigas et al., 2017).

Da die relative 5-Jahres-Überlebensrate trotzdem bei nur 62 % (bei Männern) bzw. 63 % (bei Frauen) lag (Robert Koch-Institut, 2019), ist es notwendig, neue zusätzliche oder alternative Wege der Therapie einzuschlagen.

Seit einigen Jahren wird daher intensiv an neuen Ansätzen der Anti-Tumorthherapie geforscht. Ein vielversprechendes Gebiet ist die Immuntherapie, die spezifisch in das menschliche Immunsystem eingreift und dieses so beeinflusst, dass es selbst effektiver gegen die entarteten Zellen vorgehen kann. Verschiedene Mechanismen wie die onkolytische Virustherapie, die adoptive T-Zell-Therapie, Impfungen oder Immun-*Checkpoint*-Blockaden fallen unter den Begriff der onkologischen Immuntherapie (Farkona et al., 2016). Diese verschiedenen Therapieformen werden bereits bei einigen malignen Erkrankungen eingesetzt und zeigen vielversprechende Ergebnisse. Allerdings ist es notwendig, einzelne Schritte der Interaktion zwischen Tumorzellen und dem Immunsystem noch besser zu verstehen, um bei verschiedenen Tumorentitäten jeweils selektiv die entarteten Zellen angreifen zu können.

1.2 Immunsystem

Das Immunsystem hat die Aufgabe, den menschlichen Körper vor Pathogenen jeglicher Art (Toxine, Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten) zu schützen. Dies soll es möglichst tun, ohne dabei körpereigenen Strukturen zu schaden. Seine Funktion beruht auf zwei verschiedenen, aber synergistisch agierenden Systemen: der angeborenen, nicht-spezifischen und der erworbenen, spezifischen Immunantwort. In beiden Systemen gibt es auf der einen Seite positive *Feedback*-Schleifen, welche die Immunreaktion verstärken, auf der anderen Seite aber auch regulatorische Mechanismen, die eine überschießende oder fehlgeleitete Immunantwort verhindern sollen (Abbas et al., 2018)

1.2.1 Angeborene (nicht-spezifische) Immunantwort

Die angeborene Immunantwort erfolgt sofort, nachdem die Pathogene in den Körper eingedrungen sind, und es kommt innerhalb der ersten Stunden bis Tagen zu einer

Abwehrreaktion. Typischerweise resultiert diese schnelle Immunantwort in einer Entzündungsreaktion (Inflammation), die entweder zellulär (Phagozyten, Leukozyten) oder durch das Komplementsystem induziert ist. Die eindringenden Mikroorganismen, die *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) an ihrer Oberfläche aufweisen, werden mithilfe von *pattern recognition receptors* (PRRs) auf den Immunzellen des angeborenen Immunsystems als fremd erkannt und lösen die schnelle Immunreaktion aus, die den Erreger oder die infizierte Zelle dann zerstört. Ein Beispiel für PRRs sind die Toll-Like-Rezeptoren (TLRs), die sich auf vielen Immunzellen, vor allem auf Makrophagen und Dendritischen Zellen finden (Abbas et al., 2018; Kumar et al., 2011). Aber auch auf Tumorzellen wurde mittlerweile eine verstärkte TLR-Expression nachgewiesen (Grimm et al., 2010; Mai et al., 2013; Zhao et al., 2014). Nach ihrer Aktivierung leiten TLRs verschiedene proinflammatorische Signalwege ein, die zum Beispiel zu einer verstärkten Zytokinexpression und der Aktivierung des erworbenen Immunsystems führen. Eine TLR-assoziierte inflammatorische Immunreaktion erfordert aber nicht zwangsläufig eine vorangegangene Infektion, sie kann auch Folge einer endogenen Zellschädigung sein. In einem solchen Fall erkennen die PRRs sogenannte DAMPs (engl. *damage-associated molecular patterns*), die auf geschädigten oder sterbenden (Tumor-) Zellen exprimiert werden (Lotze et al., 2007).

1.2.2 Erworbene (spezifische, adaptive) Immunantwort

Die nicht-spezifische Immunreaktion ist unter anderem dadurch gekennzeichnet, dass sie bei wiederholter, gleicher Erregerexposition nahezu identisch abläuft. Das Gegenteil hiervon ist bei der erworbenen Immunität der Fall, die eine immer stärker ausgeprägte und meist effektivere Immunreaktion auslöst, je häufiger das Immunsystem mit dem gleichen Antigen in Kontakt kommt. Getragen wird die erworbene Immunität von den B- und den T-Lymphozyten, wobei im Folgenden nur auf die T-Lymphozyten, auch T-Zellen genannt, eingegangen werden soll (Abbas et al., 2018).

1.2.3 T-Zellen und T-Zell-Rezeptoren

Zu den T-Zellen gehören die CD4-positiven (CD4⁺) T-Helfer-Zellen (T_H-Zellen), die CD8-positiven (CD8⁺) zytotoxischen T-Zellen (CTL, engl. *cytotoxic T lymphocyte*), die CD4⁺ regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) und die Natürlichen Killer-T-Zellen (NKT), die alle dazu beitragen, Pathogene zu eliminieren. Die T_H-Zellen sezernieren nach Erkennung eines Pathogens Zytokine, die wiederum Makrophagen und weitere T- und B-Lymphozyten aktivieren und die Lymphozyten zu Proliferation und Differenzierung anregen, während die CTL direkt eine infizierte, ebenso wie eine tumorös entartete Zelle erkennen und

vernichten können (Abbas et al., 2018). Auf die anderen Subtypen soll im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen werden.

Gemein ist beiden beschriebenen T-Zell-Typen, dass sie keine frei zirkulierenden Antigene erkennen, sondern darauf angewiesen sind, dass ihnen Antigene der pathogenen Mikroorganismen oder auch Tumorantigene zellulär präsentiert werden. Dies erfolgt mittels sogenannter MHC- (engl. *major histocompatibility complex*) I oder II-Moleküle auf der Oberfläche verschiedener Zellen. MHC I-Moleküle werden von nahezu allen Zellen mit einem Zellkern exprimiert, MHC II findet man hingegen nur auf sogenannten „professionellen“ Antigen-präsentierenden Zellen (APC, engl. *antigen presenting cell*, z.B. Dendritische Zellen (DCs), B-Lymphozyten, Makrophagen) und ein paar wenigen anderen Zelltypen. APC verarbeiten fremde Antigene und präsentieren diese Peptide dann MHC II-gekoppelt auf ihrer Oberfläche den Lymphozyten. Hierauf reagieren CD4-positive Zellen und leiten die angemessene Immunantwort ein bzw. verstärken sie, indem sie andere Effektorzellen stimulieren. CD8⁺ Zellen hingegen reagieren auf Antigene, die ihnen mittels MHC I-Molekülen präsentiert werden. Hierdurch erkennen sie infizierte oder tumorös entartete körpereigene Zellen und töten diese als Konsequenz ab (Abbas et al., 2018).

Um allerdings mit den MHC-Molekülen zu interagieren, benötigen die T_H-Zellen und die CTL passende Rezeptoren, die T-Zell-Rezeptoren (TZR) mit den dazugehörigen Corezeptoren CD4 bzw. CD8. Das alleinige Signal des mit einem Antigen beladenen MHC-Moleküls am TZR und dem Corezeptor reicht allerdings nicht aus, um die entsprechende naive T-Zelle zu aktivieren. Hierzu werden zusätzlich costimulatorische Signale der APC benötigt. Erst wenn eine solche costimulatorische Liganden-Rezeptor-Fusion stattgefunden hat, geschieht eine Signaltransduktion über den T-Zell-Rezeptor. Am besten charakterisiert sind die costimulatorischen B7-Proteine, die man auf T-Zell-stimulierenden Zellen findet, und deren entsprechende Rezeptoren der CD28-Familie auf den T-Zellen (Zou et al., 2008).

Aber nicht nur aktivierende Signale werden über den costimulatorischen Signalweg der T-Zelle vermittelt, sondern auch inhibitorische. Im Fokus des wissenschaftlichen Interesses war zuletzt vor allem der inhibitorische Rezeptor *programmed cell death protein 1* (PD1) mit seinen Liganden PDL1 und PDL2. PD1 limitiert auf verschiedenen Ebenen die Aktivität der T-Zellen und trägt somit als sogenannter Immun-*Checkpoint* zu einer Regulation der Immunantwort bei. Eine überschießende Immunantwort wird verhindert und die Selbsttoleranz gefördert (Francisco et al., 2010; Keir et al., 2006; Pardoll, 2012; Postow et al., 2015).

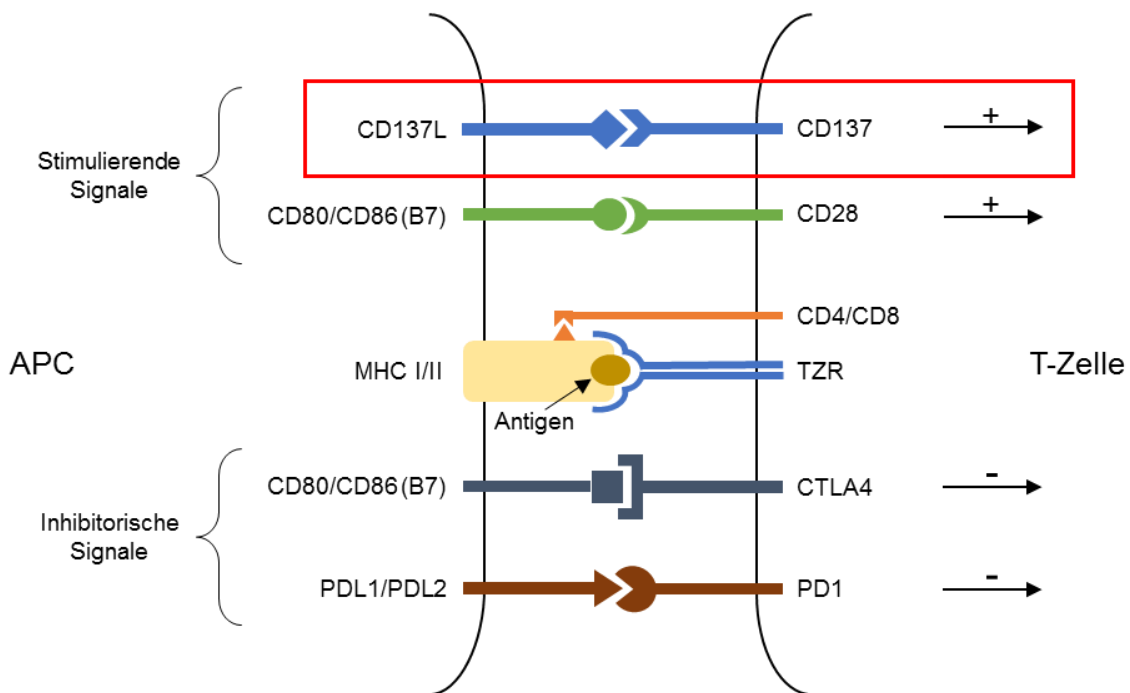


Abb. 1 Schematische Darstellung ausgewählter costimulatorischer bzw. -inhibitorischer Interaktionen zwischen APC und T-Zellen (erstellt nach Pardoll, 2012).

Damit über einen TZR ein Signal vermittelt bzw. eine T-Zelle stimuliert wird, ist zum einen die Bindung des TZR an den antigenpräsentierenden MHC I/II-Komplex notwendig. Als Corezeptor für diese Bindung fungiert CD4 (bei MHC I) oder CD8 (bei MHC II). Aber noch weitere costimulatorische oder -inhibitorische Interaktionen beeinflussen die Signaltransduktion in die T-Zelle. Inhibitorische Wirkung entfaltet z.B. eine Aktivierung des CTLA4- oder des PD1-Rezeptors, während eine Aktivierung von CD137 oder CD28 zu einer verstärkten Stimulation der T-Zelle führt. APC, Antigen-präsentierende Zelle; CD, cluster of differentiation; CD137L, CD137-Ligand; CTLA4, cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4; MHC, Major Histocompatibility Complex; PD, Programmed cell death protein; PDL, PD-Ligand; TZR, T-Zell-Rezeptor

Einige der vielen mittlerweile bekannten Rezeptor-Liganden-Paare, die costimulatorische oder -inhibitorische Effekte bei der T-Zell-Stimulation ausüben, sind in Abb. 1 noch einmal schematisch dargestellt.

Die costimulatorischen Signalwege bieten interessante und vielversprechende Ansatzpunkte für die therapeutische Beeinflussung des menschlichen Immunsystems. Zum Beispiel wird versucht, die Stimulation der inhibitorischen Rezeptoren, die eine angeborene Bremse der T-Zell-Aktivierung darstellen, außer Kraft zu setzen und hierdurch die Immunantwort zu verstärken. Dieser Therapieansatz kommt bereits in Form von monoklonalen Antikörpern gegen CTLA4 (Ipilimumab) oder auch PD1 (z.B.

Pembrolizumab, Nivolumab) bei der Behandlung verschiedener Tumorerkrankungen zur Anwendung (Hodi et al., 2010; Tunger et al., 2018).

Zusätzlich zur Blockade der inhibitorischen Signalwege wird ebenfalls versucht, die T-Zell-stimulatorischen Signale medikamentös zu verstärken. Eine wichtige Rolle scheinen in diesem Zusammenhang Mitglieder der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor- (TNFR-) Familie zu spielen (Croft, 2003). Auf ein konkretes Rezeptor-Liganden-Paar dieser Familie soll im Folgenden noch etwas genauer eingegangen werden: CD137 und CD137L.

1.2.4 CD137 und CD137L

CD137 (auch 4-1BB, TNFRSF9 oder ILA) ist ein Mitglied der TNFR-Familie (Schwarz et al., 1993) und wirkt als costimulatorischer Rezeptor vor allem auf zytotoxische T-Zellen. Die Induktion dieses Rezeptors führt zur T-Zell-Proliferation und -Aktivierung (Cooper et al., 2002), vermehrten Zytokinproduktion (Shuford et al., 1997), sowie Hochregulation anti-apoptotischer Gene (H. W. Lee et al., 2002). Eine somit gesteigerte T-Zell-Reaktion gegen Tumorzellen ist mehrfach nachgewiesen worden. Die Anwendung von agonistischen Antikörpern gegen CD137 ist daher bereits in der Vergangenheit in den Fokus onkologischer Forschung gerückt. Aktuell befinden sich zum Beispiel monoklonale Antikörper gegen CD137 (Urelumab und Utomilumab) im Rahmen der Anti-Tumortherapie des Non-Hodgkin-Lymphoms, sowie diverser solider Tumore in der klinischen Testung (Chester et al., 2017; Foster et al., 2021; Sanmamed et al., 2019; Ying et al., 2019)

Neben seiner Existenz auf diversen Immunzellen, konnte CD137 auch auf den Endothel- und Gefäßmuskelzellen von Tumoren (Broll et al., 2001; Wang et al., 2008), sowie auf der Oberfläche von Tumorzellen zum Beispiel des Pankreas- (Glorieux et al., 2019) und Bronchial-Karzinoms (G. B. Zhang et al., 2007), sowie von Leukämie- (Palma et al., 2004) und Lymphomzellen (Ho et al., 2013) nachgewiesen werden. In den Kolonkarzinomzelllinien HT-29, HCT 116, SW480 und SW620 zeigte sich in Versuchen unserer Arbeitsgruppe bei der fluoreszenzzytometrischen Untersuchung keine CD137-Expression auf der Zelloberfläche der Tumorzellen. Auf Gen- und Proteinebene hingegen gelang der Nachweis von CD137-RNA bzw. CD137 (T. Grimmig et al., 2019; Wagner, 2018).

Über die genaue Funktion von CD137-Protein in diesen Zellen ist jedoch bislang noch nicht viel bekannt und auch über die Diskrepanz zwischen der Protein- und der Oberflächenexpression kann bislang nur gemutmaßt werden.

CD137L (auch 4-1BBL oder TNFSF9), der einzige bekannte natürliche Ligand von CD137, gehört zur Familie der Tumornekrosefaktoren und wird vor allem von APC, wie dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen exprimiert. Die Aktivierung dieser Zellen geht einher mit einer verstärkten Expression von CD137L. Neben seiner Funktion als Aktivator von CD137 moduliert CD137L selbst Immunantworten mittels *reverse signaling*. CD137L fungiert somit nicht nur als Ligand, sondern gleichzeitig auch selbst als Rezeptor, welcher wiederum durch CD137 stimuliert wird (Shao et al., 2011). In Monozyten ist bekannt, dass über diesen Signalweg eine Aktivierung der Zellen mit gesteigerter Proliferation (Langstein et al., 1999) und Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF α stattfindet. Des Weiteren sezernieren die Zellen weniger antiinflammatorisches IL-10 und neigen zu gesteigerter Migration (Langstein et al., 1998). In aktivierten B- und T-Lymphozyten hingegen ist die CD137L-vermittelte Verringerung der Proliferation und Induktion von Apoptose bekannt (Shao et al., 2011).

Wie mehrere Studien und Versuche u.a. auch unserer Arbeitsgruppe zeigten, wird CD137L außerdem auf einigen Tumorzellen, z.B. des Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC, engl. *Non-small cell lung cancer*) (Qian et al., 2015), des Prostatakarzinoms (Zhu et al., 2019) und des Kolonkarzinom exprimiert (T. Grimmig et al., 2019; Salih et al., 2000). Auch im Tumorgewebe von Kolonkarzinompatienten und -patientinnen zeigen Daten unserer Arbeitsgruppe signifikant mehr CD137L-mRNA als im Normalgewebe und eine Assoziation dieser vermehrten Expression mit einer schlechteren Prognose und einem vermehrten Auftreten von Fernmetastasen. In den PBMC (engl. *peripher blood mononuclear cells*) zeigte sich mit zunehmendem UICC-Stadium hingegen signifikant weniger CD137L, sodass der Anstieg im Tumorgewebe nicht durch das Vorhandensein vieler eingewanderter PBMC erklärbar ist (T. Grimmig et al., 2019). Da eine Stimulation der T-Zellen durch CD137L aber eine für das Fortbestehen des Tumorzellverbandes eher nachteilige Steigerung der Immunantwort zur Folge hat, sind die Bedeutung der Expression sowie die Effekte einer reversen Signalgebung in die Tumorzelle hinein noch weitestgehend unklar. Um diese Bedeutung von CD137L für die Tumorzellen zu verstehen und auch CD137L eventuell als mögliche neue therapeutische Zielstruktur zu etablieren, sind hier noch genauere Untersuchungen notwendig.

1.3 Tumorimmunologie

1.3.1 Tumorentstehung

Die Grundlage der Tumorentstehung ist die Entartung einer einzelnen Zelle. Eine solche Veränderung wird normalerweise durch verschiedene Kontrollmechanismen des menschlichen Immunsystems erkannt, woraufhin unter Einbezug sowohl der angeborenen als auch der erworbenen Immunität die entsprechende Zelle eliminiert wird. Trotzdem können immer wieder einige Zellen sich dieser Immunüberwachung (engl. *immunosurveillance*) entziehen, sich teilen und die Grundlage einer Tumorformation bilden. Mittlerweile wurde die Reaktion des Immunsystems auf Tumorzellen von der *immunosurveillance* erweitert zum *immunoediting*. Denn das Immunsystem kann nicht nur einerseits die Tumorformation verhindern, es kann auch andererseits bewirken, dass Tumorzellen mit geringerer Immunogenität selektiert werden. Hierdurch ermöglicht es diesen Zellen, der Immunüberwachung und damit der Eliminierung zu entgehen und sich anschließend unkontrolliert auszubreiten (Dunn et al., 2002).

Daher entwickeln sich vor allem Tumore, die entweder kaum vom Immunsystem erkannt werden oder solche, die Mechanismen entwickelt haben, die Immuneffektorfunktionen zu unterbinden. Solche sogenannten *immune escape*-Vorgänge können zum Beispiel die Ausschüttung immunsuppressiver Mediatoren (z.B. TGF- β oder VEGF) (Batlle et al., 2019; Tamura et al., 2019), die Aktivierung von T-Zellen mit immunsuppressiven Funktionen (z.B. T_{reg}-Zellen) (Kudo-Saito et al., 2009) oder die Modulation von Immun-*Checkpoints* sein (Y. Zhang et al., 2020).

1.3.2 Tumorprogression

Für die Expansion der Tumoren spielt letztlich also die Tumormikroumgebung (engl. *tumor microenvironment*) eine wichtige Rolle. Sie ist gekennzeichnet durch das Stroma und die Extrazellulärmatrix (EZM), sowie in das Tumorgewebe eingewanderte gesunde Zellen, die malignen Tumorzellen und ihre jeweiligen Interaktionen miteinander. Unter anderem CD137L scheint eine wichtige Rolle dabei zu spielen, diese Tumormikroumgebung von einer immunstimulativen hin zu einer immunsuppressiven zu verändern (S. W. Kang et al., 2017). Die Tumoren an sich weisen außerdem typische Charakteristika auf, die Hanahan et. al. (2011) zusammengefasst haben. Hierzu zählt, dass es den Tumorzellen gelingt, proliferative Signale aufrechtzuerhalten, sich Wachstumssuppressoren des Immunsystems zu entziehen und anti-apoptotische Gene zu exprimieren. Durch diese Mechanismen können die Zellen eine nahezu unbegrenzte

Anzahl an Zellteilungen erreichen. Des Weiteren spielt die Angiogenese, also die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßstrukturen, eine wichtige Rolle, an der verschiedene Wachstumsfaktoren, z.B. der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und der *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) beteiligt sind. Hierdurch wird dem Tumor zum einen eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen und zum anderen eine hämatogene Metastasierung entlang dieser Gefäßstrukturen ermöglicht (Hanahan et al., 2011).

1.3.3 Metastasierung

Die Fähigkeit, zu metastasieren, ist ein typisches Zeichen hochmaligner Tumoren. Damit aus einem soliden Tumor entfernte Metastasen entstehen können, sind jedoch viele einzelne Schritte notwendig. Neben dem Vorhandensein der entsprechenden Mikroumgebung muss mindestens eine Zelle es schaffen, sich vom Tumorverband zu lösen, die Basalmembran zu durchdringen und in das umgebene Stroma und darin befindliche Gefäße einzuwandern. Die Epithelzellen in Karzinomen müssen für diese Invasion und Intravasation einen komplexen molekularen Prozess durchlaufen, in welchem sie ihre Zellpolarität und die Zell-Zell-Kontakte verlieren und stattdessen einen motilen, mesenchymalen Phänotyp annehmen. Erst durch diese Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) wird es den Zellen ermöglicht, sich von ihrer Ausgangsposition zu lösen, in umgebende Gewebe und Gefäße einzudringen und in entfernten Geweben Metastasen zu bilden (siehe Abb. 2) (Thiery, 2002).

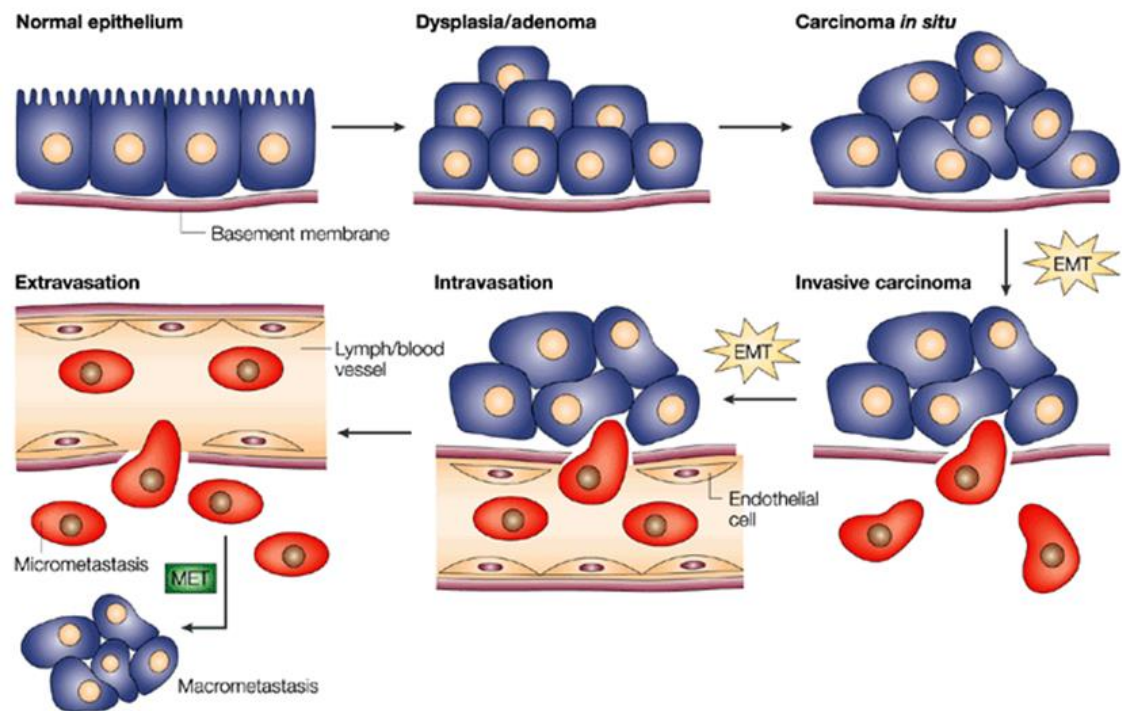


Abb. 2: Die einzelnen Schritte der Metastasierung, inkl. der EMT.

Aus gesunden Epithelzellen, die einer Basalmembran aufsitzen, kann durch lokale Proliferation eine Dysplasie bzw. ein Adenom entstehen. Nach weiteren Mutationen und epigenetischen Veränderungen entsteht hieraus ein Carcinoma *in situ*. Durch den Schritt der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) nehmen die Epithelzellen einen motilen mesenchymalen Phänotyp an, der es ihnen ermöglicht, die Basalmembran zu durchdringen (Invasion). Die Tumorzellen dringen auch in nahegelegene Blutgefäße ein (Intravasation), mit Hilfe derer sie entfernt liegende Gewebe erreichen. Dort bilden aus dem Gefäßsystem wieder ausgewanderte Tumorzellen (Extravasation) nicht nachweisbare Mikrometastasen, bevor sie sich zu soliden Makrometastasen formieren. EMT, epithelial-mesenchymale Transition; MET, mesenchymal-epitheliale Transition

(Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature (Thiery, 2002))

1.4 Fragestellungen der Arbeit

Die Funktionen von CD137L auf Antigen-präsentierenden Zellen sind mittlerweile gut bekannt. CD137L bindet an CD137 auf den T-Zellen und diese Interaktion führt zu einer verstärkten Stimulation der T-Zelle durch die APC und verstärkt somit die Immunantwort. Auf Tumorzellen ist über die Rolle von CD137L allerdings noch kaum etwas bekannt. Vor allem die Effekte einer reversen Signalgebung in die Tumorzelle hinein sind wenig verstanden. Auch im kolorektalen Karzinom weisen viele Tumorzellen CD137L auf ihrer Oberfläche auf, die Effekte einer CD137L-Stimulation auf Kolonkarzinomzellen wurden bislang jedoch noch nicht untersucht.

Daher ist es das Ziel dieser Arbeit, die Auswirkungen einer reversen Signalgebung durch CD137L auf das Proliferationsverhalten und das Proteinexpressions- sowie -sekretionsprofil von Kolonkarzinomzellen zu untersuchen.

Hierzu wurden Proliferationsassays durchgeführt, mit Hilfe derer die Proliferation von CD137L-stimulierten im Vergleich zu nicht-stimulierten Zellen bestimmt werden konnte. Außerdem wurde die Expression und Sekretion verschiedener an Tumorwachstum und -progression beteiligter Proteine mittels Western Blot bzw. Luminex Multiplex-Assay untersucht.

Folgende Fragen werden im Rahmen dieser Arbeit weitergehend bearbeitet:

1. Wie wirkt sich eine CD137L-vermittelte Stimulation auf das Proliferationsverhalten von humanen Kolonkarzinomzellen aus? Zeigen sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien?
2. Welche Unterschiede im Proteinexpressionsprofil der CD137L-stimulierten Kolonkarzinomzellen im Vergleich zu dem der nicht-stimulierten Zellen werden beobachtet? Welche Proteine werden vermehrt exprimiert?
3. Wie verändert sich das Sekretionsverhalten der Kolonkarzinomzellen bezüglich der beiden Wachstumsfaktoren PDGF und VEGF nach Stimulation von CD137L?
4. Wie verändert sich die CD137-Expression von Kolonkarzinomzellen unter Hypoxiebedingungen?
5. Welche Erkenntnisse leiten sich aus den *in vitro* gewonnenen Ergebnissen für den costimulatorischen Signalweg CD137 und dessen Liganden CD137L im kolorektalen Karzinom für die Klinik ab?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkulturlinien

Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden die humanen Kolonkarzinomzelllinien HT-29, HCT 116, SW480 und SW620 von ATCC (Manassas, VA, USA) verwendet. Während es sich bei SW480, HT-29 und HCT 116 um Primäriumzelllinien aus kolorektalen Adenokarzinomen handelt, entstammt die SW620-Linie aus einer Lymphknotenmetastase des Tumors, aus dem die SW480-Zellen gewonnen wurden. Im Gegensatz zu den übrigen Zelllinien weisen die HCT 116-Zellen eine Mikrosatelliteninstabilität auf. Die Zellen wurden kultiviert und passagiert wie weiter unten angegeben.

2.1.2 Vorgefertigte Nährmedien, Puffer und Reagenzien

Tab. 1: Verwendete vorgefertigte Nährmedien, Puffer und Reagenzien

Produkt	Hersteller
AccutaseR Solution	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Bovine serum albumin, BSA	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
CellTiter 96R AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)	Promega Corporation (Madison, WI, USA)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Fetal Bovine Serum	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Luminex® Sheath Fluid	Merck Millipore (Burlington, MA, USA)
Magermilchpulver	PanReac AppliChem
McCoy's 5A	ATCC (Manassas, VA, USA)
MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel Kit HCYTOMAG-60K	Merck Millipore (Burlington, MA, USA)
NuPage 4-12 % Bis-Tris Gel	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
NuPage Antioxidant	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

Produkt	Hersteller
NuPage LDS Sample Buffer (4x)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
NuPage MOPS SDS Running Buffer (20x)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
NuPage Sample Reducing Agent (10x)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set V, 50x	Merck Millipore (Burlington, MA, USA)
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Protease Inhibitor Cocktail Set III	Merck Millipore (Burlington, MA, USA)
Recombinant Human 4-1BB/TNFRSF9/CD137 Fc Chimera	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
Recombinant Human IgG1 Fc	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
Roti ^R -Quant 5x Konzentrat	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
RPMI-1640 Medium	ATCC (Manassas, VA, USA)
Sodium chloride (NaCl)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Sodium deoxycholate (NaDOC)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Sodium fluoride (NaF)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Tris Buffered Saline (TBS-10X)	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)
Trisaminomethane hydrochloride (Tris-HCl)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Trypan Blue solution	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %/0,02 %)	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)
Tween 20	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)

2.1.3 Selbst-angesetzte Puffer

Tab. 2: Verwendete selbst-angesetzte Puffer

RIPA (Radioimmunoprecipitationassay) - Puffer:	20 mM Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % (v/v) IGEPAL CA-630 1 % (m/v) NaDOC 1 % (m/v) SDS 5 mM (m/v) NaF Zugabe unmittelbar vor Verwendung: Phosphatase Inhibitor Cocktail (1:50) Protease Inhibitor Cocktail (1:200) DTT (1:1000)
TBS-T (Tris Buffered Saline-Tween):	10 % TBS 0,1 % Tween in destilliertem Wasser
Blockierungslösung:	5 % (m/v) Magermilchpulver in TBS-T - Oder - 5 % (m/v) BSA in TBS-T

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Primärantikörper

Tab. 3: Verwendete Primärantikörper

Target und Seriennummer	Klonalität	Spezies	Konjugat	Hersteller
CD137 ab89085	monoklonal	Maus	-	Abcam (Cambridge, GBR)
Phospho-Akt CS#4060	monoklonal	Kaninchen	-	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)
Toll-like Receptor 7 (TLR7) CS#5632	monoklonal	Kaninchen	-	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)
Vimentin CS#3932	polyklonal	Kaninchen	-	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)

Target und Seriennummer	Klonalität	Spezies	Konjugat	Hersteller
Cofilin CS#8503	monoklonal	Kaninchen	HRP (horseradish peroxidase)	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)
β-Aktin CS#4970	monoklonal	Kaninchen	-	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)

2.1.4.2 Sekundärantikörper

Tab. 4: Verwendete Sekundärantikörper

Target und Seriennummer	Konjugat	Hersteller
Anti-rabbit IgG CS#7074	HRP	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)
Goat-anti-mouse IgG-HRP sc-2005	HRP	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)

2.1.5 Laborgeräte

Tab. 5: Verwendete Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Biofuge fresco	Kendro (Langenselbold, Deutschland)
Cellometer Auto T4	Nexcelom Bioscience (Lawrence, MA, USA)
ChemiDoc™ Touch Imaging System	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Consort Electrophoresis Power Supply E835	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
DYNAL ^R Sample Mixer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Heraeus Multifuge 3 S-R	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
iBlot Dry Blotting System	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Inkubator Function Line	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Mikroskop Axiovert 40C	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Molecular Devices ThermoMax Microplate Reader	GMI (Ramsey, MN, USA)
Multipipette M4	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipetten (10, 200, 1000 µl)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettierhelfer accu-jet ^R pro	Brand GmbH (Wertheim, Deutschland)
Präzisionswaage CP 4201	Sartorius (Göttingen, Deutschland)

Gerät	Hersteller
Scanner CanonScan9000F	Canon (Tokio, Japan)
Schüttler Unimax 1010	Heidolph Instruments GmbH (Schwabach, Deutschland)
Sicherheitswerkbank Herasafe KS	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Sonopuls Homogenisator HD2070	Bandelin (Berlin, Deutschland)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Vortex Mixer Gene2	Scientific Instruments (Gilching, Deutschland)
Luminex® 200™	Merck Millipore (Burlington, MA, USA)
Wasserbad	Memmert (Schwabach, Deutschland)
XCell Sure Lock Kammer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Bio Photometer V1.35	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Tab. 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Cellometer SD100 Zählkammern	Nexcelom Bioscience (Lawrence, MA, USA)
Combitips advanced (2, 5, 10 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Einfrierröhrchen Cryo.s	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Filterspitzen (10 µl)	nerbe plus GmbH (Winsen/Luhe, Deutschland)
Filterspitzen (200, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, Deutschland)
iBlot Gel Transfer Stacks	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Parafilm ^R M Verschlussfolie	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Reagiergefäße SafeSeal (1,5 und 2 ml)	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, Deutschland)
Serologische Pipetten CELLSTAR (2, 5, 10, 25 ml)	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
UV-Küvette mikro	Brand GmbH (Wertheim, Deutschland)
Zellkulturflaschen CELLSTAR 75 cm ²	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Zellkulturtestplatten (6-, 96-Well)	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zellschaber	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen Polypropylen Cellstar (15, 50 ml)	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)

2.1.7 Software

Tab. 7: Verwendete Software

Software	Hersteller
EndNote X7	Thomson Reuters (New York City, NY, USA)
Endnote 20	Clarivate Analytics (Philadelphia, PA, USA)
IBM SPSS Statistics 24	IBM Deutschland GmbH (Ehningen, Deutschland)
ImageJ	National Institutes of Health (NIH) (Rockville, MD, USA)
ImageLab Touch Software	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Microsoft Office 2013 und Microsoft Word für Mac, Version 16.58	Microsoft Corporation (Albuquerque, NM, USA)
Milliplex® Analyst 5.1	Merck Millipore (Burlington, MA, USA)
SoftMaxPro 5.4	Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA)
XnViewMP	Gougelet Pierre-Emmanuel (Reims, Frankreich)

2.2 Methodik

2.2.1 Zellkultur

Alle Zellkulturschritte wurden unter aseptischen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank durchgeführt und alle Nährmedien und Reagenzien wurden vor ihrer Verwendung auf 37° C erwärmt.

2.2.1.1 Auftauen der Zellen

Die kryokonservierten Zellen wurden für maximal eine Minute im 37° C warmen Wasserbad aufgetaut, bevor sie in vorgewärmtem Nährmedium verdünnt und in ein 50 ml-Röhrchen überführt wurden. Anschließend folgte ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt (300 x g), wonach der Überstand verworfen wurde. Das Zellpellet wurde in 1000 µl resuspendiert und in eine 75 cm²-Zellkulturflasche mit 10-15 ml vorgewärmtem Nährmedium überführt.

2.2.1.2 Kultivieren der Zellen

SW480- und SW620-Zellen wurden in mit 10 % (v/v) Fetalem Kälberserum (FBS) und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) versetztem RPMI-Medium kultiviert. Als Nährmedium für die HT-29- und HCT 116-Zellen wurde McCoy's 5A verwendet, welches

ebenfalls mit 10 % (v/v) FBS und 1 % (v/v) Pen/Strep versetzt wurde. Die Inkubation erfolgte bei 37° C und in einer Atmosphäre von 5 % CO₂.

Zum Ablösen der adhärennten Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit 10 ml DPBS gewaschen. Um Adhäsionsproteine zu spalten und somit die Zellen vom Flaschenboden zu lösen, folgte dann die Inkubation der Zellen bei 37° C mit 5 ml Trypsin pro Kulturflasche für ca. 3 (HT-29-, HCT 116-, SW620-Zellen) bzw. 7 Minuten (SW480-Zellen). Nach dieser Zeit wurde die Reaktion mit 10 ml Nährmedium gestoppt und die Suspension in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (300 x g) von 10 Minuten wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml Nährmedium resuspendiert.

Zum Passagieren wurde 1 ml (bei 1:10 Verdünnung) der jeweiligen Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche ausgesät und mit 10-15 ml vorgewärmtem Nährmedium verdünnt.

2.2.1.3 Färben und Zählen der Zellen

Nach dem Waschen und Ablösen der Zellen wurden 20 µl Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit der Trypanblau-Lösung gemischt und die Anzahl der lebenden Zellen pro ml im Cellometer gemessen. Dieser automatische Zellzähler erkennt lebende Zellen, da diese im Gegensatz zu toten Zellen kein Trypanblau aufnehmen. Hiernach wurde die Zellkonzentration in der Suspension mit Nährmedium auf die für den entsprechenden Versuch erforderliche Konzentration eingestellt.

2.2.1.4 CD137-Stimulation der Zellen

Die Induktion des *reverse signaling* durch CD137L auf der Oberfläche der Tumorzellen erfolgte durch die Stimulation der Zellen mit CD137-Fc, einem rekombinanten Fusionsprotein. Es besteht aus der extrazellulären Domäne von CD137, welche mit dem konstanten Fc-Teil von IgG₁ verbunden wurde. Als Kontrolle diente das humane IgG₁-Fc, um Veränderungen, welche auf den Fc-Teil des CD137-Fc zurückzuführen sind, auszuschließen (Qian et al., 2015).

Die 6-Well-Zellkulturplatten wurden vor Aussaat der Zellen einmal mit je 500 µl DPBS pro Well gewaschen und dann über Nacht bei 4° C mit je 300 µl CD137-Fc bzw. IgG₁-Fc (Konzentration im Well jeweils 10 µg/ml) beschichtet. Um eine Austrocknung der Wells zu verhindern, wurden ein paar Milliliter DPBS in das Reservoir der Platten gegeben und jede einzelne Platte mit Paraffin verschlossen.

Bei den 96-Well-Platten, die für die Proliferationsassays verwendet wurden, erfolgte das gleiche Vorgehen mit einem angepassten Volumen für den Waschschrift von ca. 100 µl

DPBS pro Well. Anschließend wurden die Wells mit 30 µl CD137-Fc bzw. IgG₁-Fc-Lösung beschichtet. Die Endkonzentrationen von IgG₁-Fc bzw. CD137-Fc pro Well betragen ebenfalls 10 µg/ml.

2.2.1.5 Hypoxie-Behandlung der Zellen

Um die Auswirkung von Hypoxie auf die Proteinexpression von CD137 zu untersuchen, wurden zunächst 2×10^6 Zellen in 10 ml Nährmedium in luftdicht verschlossenen Zellkulturflaschen ausgesät. Ab dem nächsten Tag wurden sie für 48 Stunden in der Hypoxiekammer der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universität Würzburg hypoxischen Bedingungen ausgesetzt, bevor sie in Zellkulturplatten ausgesät und später lysiert wurden (siehe Abschnitt 2.2.2.1).

2.2.2 Gelelektrophorese und Western Blot

Zur Untersuchung des Einflusses von CD137-Stimulation bzw. von Hypoxie auf die Proteinbiosynthese der Kolonkarzinomzellen, wurde der Western Blot genutzt.

2.2.2.1 Aussaat der Zellen und Herstellung der Zelllysate

Die über Nacht beschichteten Platten wurden zweimal mit 2 ml DPBS pro Well gewaschen.

Nach dem Waschen und Ablösen der Zellen durch Zugabe von Accutase und Inkubation für 4 - 8 Minuten (je nach Zelllinie) wurden sie wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben gezählt und $1,5 \times 10^6$ Zellen in je 1,5 ml Nährmedium pro Well ausgesät. Es folgte ein Inkubationsschritt von 24, 48 bzw. 72 Stunden bei 37° C und 5 % CO₂ und ab 24 Stunden ein täglicher Nährmediumswechsel.

Zur Herstellung der Zelllysate wurde das Nährmedium aus den Wells entfernt und bis zur Verwendung für die Luminex Multiplex-Assays (siehe Abschnitt 2.2.4) bei -80° C gelagert. Die Wells wurden zweimal mit je 2 ml DPBS gewaschen. Nun folgte die Zugabe von je 100 µl RIPA-Puffer inklusive DTT, Protease- und Phosphataseinhibitor (siehe Abschnitt 2.1.3) pro Well und die sofortige Abschabung der Zellen mittels eines Zellschabers. Nachdem die Proben unter Rotation für 30 Minuten bei 4° C inkubiert wurden, wurden sie jeweils 30 Sekunden lang sonifiziert und anschließend 15 Minuten bei 4° C zentrifugiert (1300 x g). Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und direkt für die Gelelektrophorese verwendet oder bei -80° C eingelagert.

2.2.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Proteinbestimmung der Zellysate wurde Roti-Quant-Konzentrat in einem Verhältnis von 1:5 mit Wasser verdünnt und hiermit der photometrische Bradford-Test durchgeführt. Danach wurden die Proben mit Wasser auf eine Endkonzentration von 4,1 µg/µl verdünnt, nach Anweisung des Herstellers mit *NuPage LDS Sample Buffer* und *NuPage Sample Reducing Agent* vermischt und für 10 Minuten bei 70° C inkubiert, um die Proteine zu denaturieren. Anschließend wurden die Proteine mittels der Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Hierzu wurden die *NuPage Bis-Tris* Gele verwendet, wobei jede Tasche mit 80 µg Protein (in 30 µl) beladen wurde. Als Laufpuffer diente der *NuPage MOPS SDS Running Buffer* mit einer Konzentration von 1:20, welcher vor der Gelbeladung mit 500 µl *NuPage Antioxidant* versetzt wurde. Zur genauen Größenbestimmung der Proteine wurden 6 µl *PageRuler* als Marker in die jeweils erste Tasche der Gele pipettiert. Die SDS-PAGE wurde nun bei 4° C, 200 V, 250 mA und 100 W für ca. 60 Minuten durchgeführt, bis die farbliche Lauffront das untere Ende der Laufkammer erreicht hatte.

2.2.2.3 Western Blot

Für den Elektrotransfer wurde das *iBlot Dry Blotting System* mit den dazugehörigen *iBlot Gel Transfer Stacks* nach Protokoll des Herstellers verwendet und die Proteine innerhalb von 7 Minuten auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Zum Nachweis der erfolgreichen Proteinübertragung erfolgte eine temporäre Färbung mit Ponceau S, welche dann mittels TBS-T wieder ausgewaschen wurde. Um eine weitere Proteinbindung auf der Membran zu verhindern, wurde die Membran bei Raumtemperatur für eine Stunde mit 5 %-iger Magermilch in TBS-T auf dem Schüttler geblockt. Anschließend erfolgte die Immundetektion der einzelnen Proteine.

2.2.2.4 Immundetektion

Über Nacht wurden die Membranen bei 4° C mit den Primärantikörpern gegen CD137, Cofilin, ACTB, Vimentin und TLR7 in den vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen in 5 %-igem BSA inkubiert. Am nächsten Tag folgten 3 Waschschrte à 8 Minuten mit TBS-T bei Raumtemperatur, bevor der HRP-konjugierte Sekundärantikörper in 5 %-iger Magermilch für eine Stunde hinzugegeben wurde (Ausnahme: Wegfall dieses Schrittes bei dem bereits HRP-gekoppeltem Antikörper gegen ACTB). Nach erneutem dreimaligem Waschen der Membranen in TBS-T wurde die Chemolumineszenzreaktion mit der Zugabe von 8 ml ECL (*enhanced chemoluminescence*) -Lösung in Form von *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* begonnen. Mittels des

ChemiDoc™ Touch Imaging Systems erfolgte die Belichtung und Digitalisierung der Proteinbanden, welche dann mit Hilfe der *ImageLab Touch Software* ausgewertet wurden. Hierbei wurden die Banden des Targetproteins auf die Banden der Proteinladekontrolle (je nach Versuch ACTB oder Cofilin) normiert und anschließend die IgG₁-Fc-Zellen als Kontrolle mit den CD137L-stimulierten Zellen verglichen.

2.2.3 MTS-Zellproliferationsassay

Um die Auswirkungen einer CD137-Stimulation auf das Proliferationsverhalten humaner Kolonkarzinomzellen zu untersuchen und zu quantifizieren, wurden Zellproliferationsassays durchgeführt.

Die Aussaat der Zellen für die Proliferationsassays erfolgte analog zur Durchführung im Rahmen der Western Blots (siehe Abschnitt 2.2.2.1), allerdings in 96-Well-Platten und mit 8000 (SW480, SW620, HT-29) bzw. 5000 (HCT 116) Zellen in 50 µl Nährmedium pro Well. Alle 24 Stunden erfolgte eine Zugabe von 50 µl frischem Nährmedium, falls der MTS-Test nicht am selben Tag durchgeführt wurde.

Zur kolorimetrischen Bestimmung der lebenden Zellen, wurde das *CellTiter 96 Aqueous One Solution Assay* verwendet. Hierbei wird die farblose Tetrazolium-Verbindung MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] durch metabolisch aktive Zellen zum roten Formazan reduziert, welches in Zellnährmedien löslich ist. Die Farbintensität korreliert direkt proportional mit der Zellviabilität, also dem Lebendzellanteil in der gemessenen Probe. Das Extinktionsmaximum von Formazan liegt bei 490 nm.

Nach einer Inkubation und Proliferation von 24, 48 oder 72 Stunden wurde das MTS-Reagenz in einem Verhältnis von 1:5 zum Nährmedium hinzugegeben und die Platten wurden nochmals eine Stunde bei 37° C inkubiert. Anschließend erfolgte eine sofortige Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm mittels des *ThermoMax Microplate Readers* und die Bestimmung der relativen Proliferation von CD137-stimulierten bzw. nicht-stimulierten Zellen.

2.2.4 Luminex Multiplex-Assays

Zur quantitativen Analyse der sekretorischen Proteine PDGF-AB/BB und VEGF-A, welche von den (un-) stimulierten Zellen ins Nährmedium abgegeben werden, wurden auf der Durchflusszytometrie beruhende Luminex Multiplex-Assays verwendet.

Als Proben wurden die 48 h- und 72 h-Nährmediumsüberstände von den mit CD137- bzw. IgG₁- stimulierten Zellen (siehe Abschnitt 2.2.2.1) verwendet. Die Assays wurden

nach Protokoll des Herstellers durchgeführt und die Ergebnisse mittels der *Milliplex Analyst 5.1 Software* ausgewertet.

2.3 Statistische Analysen

Die statistische Datenanalyse erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel 2016 und IBM SPSS Statistics 24. Zwei unabhängige Messgruppen wurden mittels des Welch-Tests auf signifikante Unterschiede untersucht, wobei ein p-Wert kleiner als 0,05 als statistisch signifikant gewertet wurde. Die gemessenen Werte wurden auf eine Nachkommastelle gerundet und werden in der Regel als Mittelwerte (\pm Standardabweichung) angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Das Proliferationsverhalten nach CD137L-Stimulation

Um zu untersuchen, ob sich die Proliferation humaner Kolonkarzinomzellen nach Stimulation von auf der Oberfläche exprimiertem CD137L verändert, wurden MTS-Proliferationsassays über einen Zeitraum von 24, 48 und 72 Stunden durchgeführt.

Zu fast jedem Zeitpunkt zeigte sich in allen vier Zelllinien eine signifikant verringerte Proliferation der CD137L-stimulierten Zellen im Vergleich zu den mit IgG₁-Fc behandelten Kontrollzellen. Lediglich in den SW620-Zellen konnte nach 48 Stunden kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Die Reduktion der Proliferation betrug in den HT-29-Zellen 8,4 % ($\pm 7,2$ %) [24 h], 8,5 % ($\pm 7,7$ %) [48 h] bzw. 9,6 % ($\pm 7,9$ %) [72 h], in den HCT 116-Zellen 3,4 % ($\pm 1,6$ %), 7,4 % ($\pm 6,9$ %) bzw. 4,2 % ($\pm 2,2$ %) und in den SW480-Zellen 10,6 % ($\pm 8,9$ %), 8,2 % ($\pm 7,6$ %) bzw. 12,9 % ($\pm 7,3$ %). Die Proliferation der SW620-Zellen nahm um 6,5 % ($\pm 5,4$ %) [24 h] bzw. 9,8 % ($\pm 7,7$ %) [72 h] ab (siehe Abb. 3).

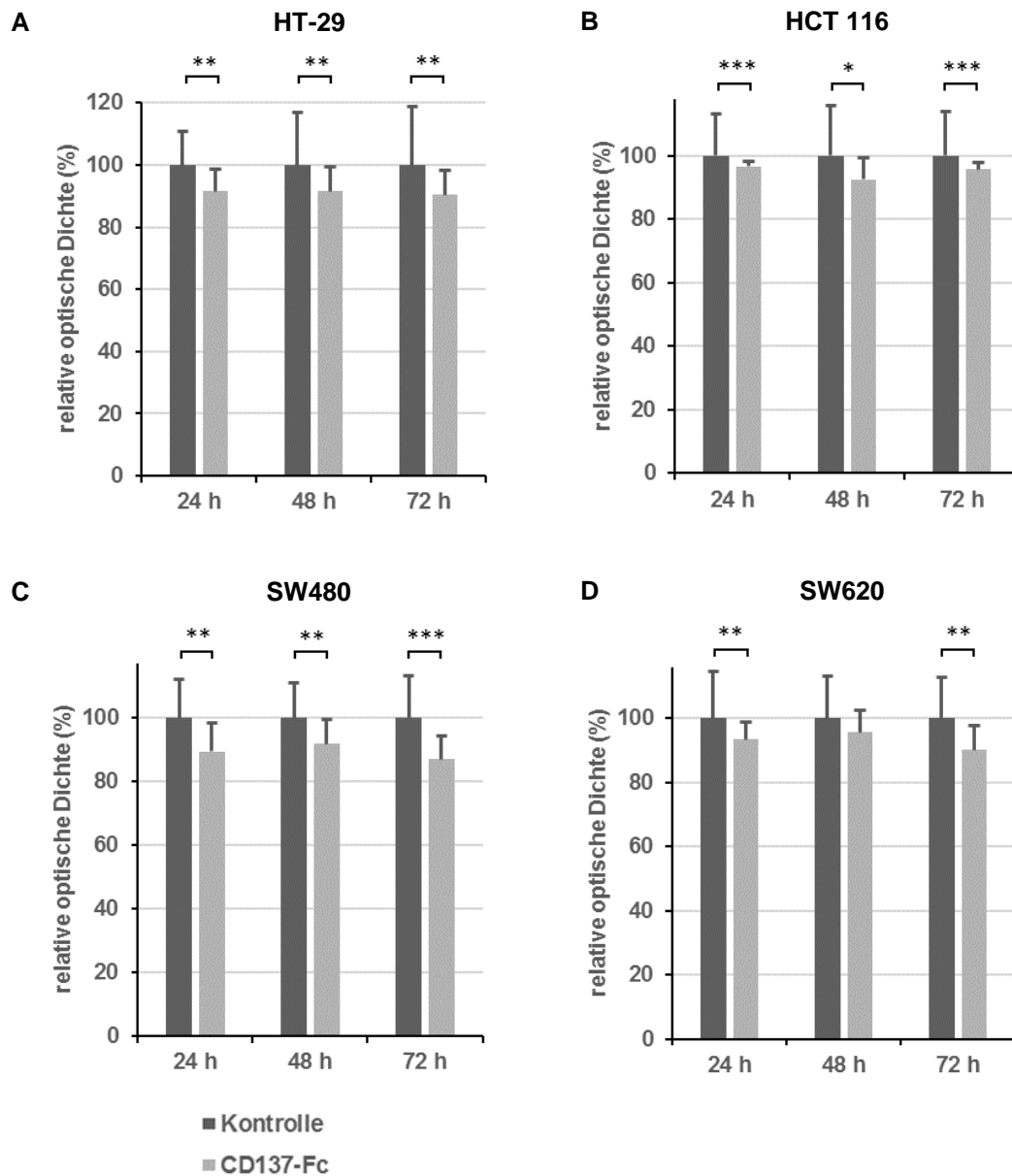


Abb. 3: Darstellung der zeitabhängigen Proliferation von humanen Kolonkarzinomzellen nach CD137L-Stimulation

(A) HT-29-Zellen zeigten sowohl nach 24 Stunden (n = 7) als auch nach 48 und 72 Stunden (jeweils n = 8) eine signifikant reduzierte Proliferation nach CD137L-Stimulation im Vergleich zur IgG₁-Fc-Kontrolle. (B) HCT 116-Zellen zeigten ebenfalls in insgesamt 18 Versuchen (jeweils n = 6) zu jedem gemessenen Zeitpunkt unter Stimulation eine signifikante Reduktion der Proliferation. (C) Stimulierte SW480-Zellen proliferierten signifikant weniger als die Kontrollzellen (jeweils n = 10). (D) In insgesamt 27 Versuchen (jeweils n = 9) zeigte sich bei den SW620-Zellen wie in den anderen Zelllinien nach 24 und nach 72 Stunden ein reduziertes Proliferationsverhalten der stimulierten Zellen. Lediglich nach 48 Stunden konnte diese Veränderung nicht nachgewiesen werden. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

3.2 Die Proteinexpression von Vimentin nach CD137L-Stimulation

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der CD137L-Expression und einer vermehrten Migration und Invasion zu untersuchen, wurde die Proteinexpression des an der Metastasierung beteiligten Intermediärfilamentes Vimentin bestimmt.

Bei den SW480-Zellen zeigte sich bei mehrmaligem Durchführen des Versuches kein einheitliches Ergebnis, bei den HT-29-, HCT 116- und SW620-Zellen jedoch konnte eine vermehrte Vimentin-Proteinexpression in den CD137L-stimulierten im Vergleich zu den nicht-stimulierten Zellen beobachtet werden. Ähnlich zur Expression von TLR7 zeigte sich bzgl. Vimentin in den verschiedenen Zelllinien zu unterschiedlichen Zeitpunkten eine gesteigerte Expression, während davor oder danach die Proteinexpression wieder auf dem Niveau der Kontrollzellen oder etwas darunter lag.

In Abb. 4 sind die Ergebnisse nach 48-stündiger CD137L-Stimulation dargestellt.

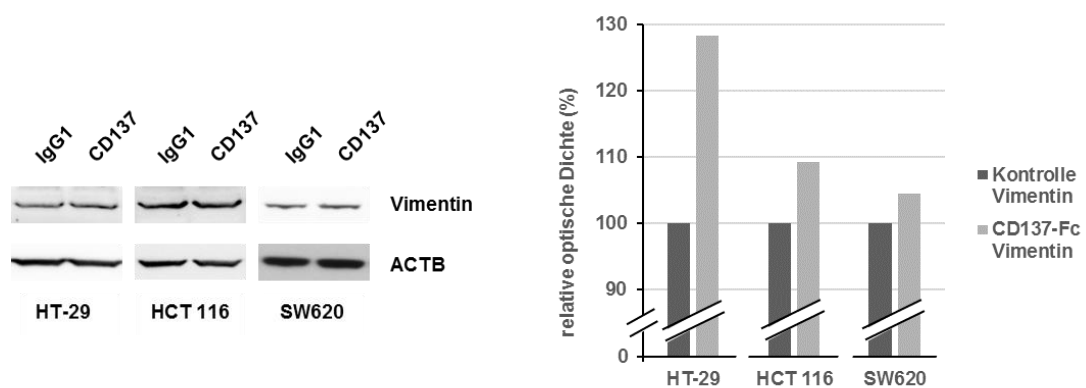


Abb. 4: Western Blot-Darstellung der Vimentin-Proteinexpression in CD137L-stimulierten HT-29-, HCT 116- und SW620-Zellen nach 48 h.

In den HT-29- (n = 1), HCT 116- (n = 1) und SW620-Zellen (n = 2) zeigte sich nach Stimulation der Zellen eine gesteigerte Expression des Vimentin-Proteins. Bei den HT-29-Zellen war dies nach 24 und 48 h zu erkennen, während bei den HCT 116- und den SW620-Zellen die Expressionsspitzen zu den Zeitpunkten 48 und 72 h auffielen. ACTB wurde als Proteinladekontrolle verwendet.

3.3 Die Proteinexpression von TLR7 nach CD137L-Stimulation

Da für TLR7 in vorherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe ein Zusammenhang mit Tumorgenese und -progression belegt wurde (Grimm et al., 2010), sollten hier die Auswirkungen einer CD137L-Stimulation auf die TLR7-Proteinexpression von Kolonkarzinomzellen mittels Western Blot untersucht werden.

Während nach 24 Stunden noch keine einheitlichen Ergebnisse erkennbar waren, zeigte sich in den Zelllinien HT-29, SW480 und SW620 nach 48 bzw. 72 Stunden konstant ein Anstieg der TLR7-Proteinexpression nach CD137L-Stimulation. Die Zeitpunkte der maximalen Expression variierten hierbei zwischen den einzelnen Zelllinien. Der Übersicht halber werden in der Graphik ausschließlich die Ergebnisse nach 72-stündiger Stimulation mit CD137-Fc dargestellt (siehe Abb. 5).

Bei den HCT 116-Zellen zeigte sich eine vermehrte TLR7-Expression durch die stimulierten Zellen nach 24 Stunden. Zu den Zeitpunkten 48 h und 72 h ergab sich bei Wiederholen des Experiments jedoch kein eindeutiges Bild bezüglich der TLR7-Expression.

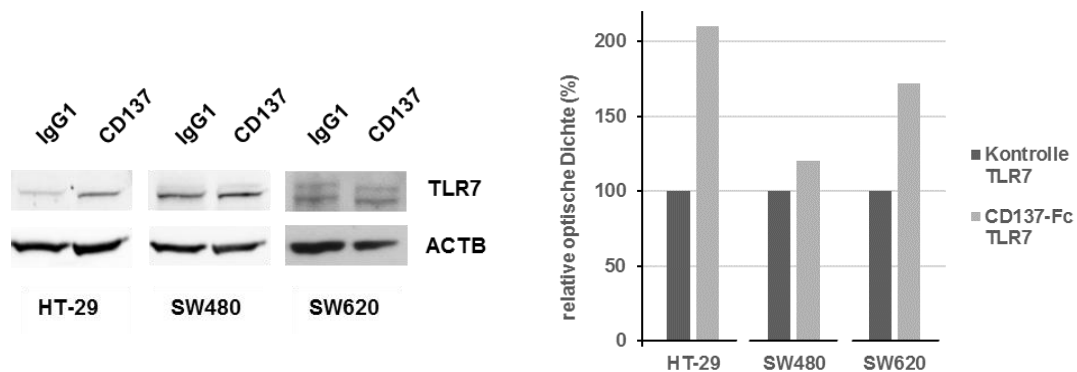


Abb. 5: Western Blot-Darstellung der TLR7-Proteinexpression in CD137L-stimulierten HT-29-, SW480- und SW620-Zellen nach 72 h.

In den HT-29- (n = 1), SW480- (n = 2) und SW620-Zellen (n = 2) zeigte sich nach 72-stündiger Stimulation der Zellen mit CD137-Fc eine gesteigerte Expression des TLR7-Proteins. ACTB wurde als Proteinladekontrolle verwendet.

3.4 Die PDGF- und VEGF-Sekretion nach CD137L-Stimulation

Wachstumsfaktoren sind für die Progression und die Migration von Tumoren unerlässlich. Die Auswirkungen einer CD137L-Stimulation auf die Sekretion der Wachstumsfaktoren PDGF und VEGF durch Karzinomzellen wurden untersucht, indem PDGF und VEGF im Nährmediumsüberstand der stimulierten Zellen gemessen wurden.

3.4.1 Die Sekretion von PDGF

Im Vergleich zwischen CD137L-stimulierten und nicht-stimulierten Zellen zeigte sich bei den HT-29-, HCT 116- und SW480-Zellen zu beiden Zeitpunkten jeweils signifikant mehr PDGF in den Proben der stimulierten Zellen. HT-29: 210,4 % ($\pm 15,5$ %) [48 h], bzw. 255,2 % ($\pm 14,5$ %) [72 h]; HCT 116: 174,3 % ($\pm 17,1$ %) bzw. 248,3 % ($\pm 29,8$ %); SW480: 168,9 % ($\pm 3,4$ %) bzw. 278,5 % ($\pm 6,5$ %). In den Proben der SW620-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen stimulierten und nicht-stimulierten Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 6).

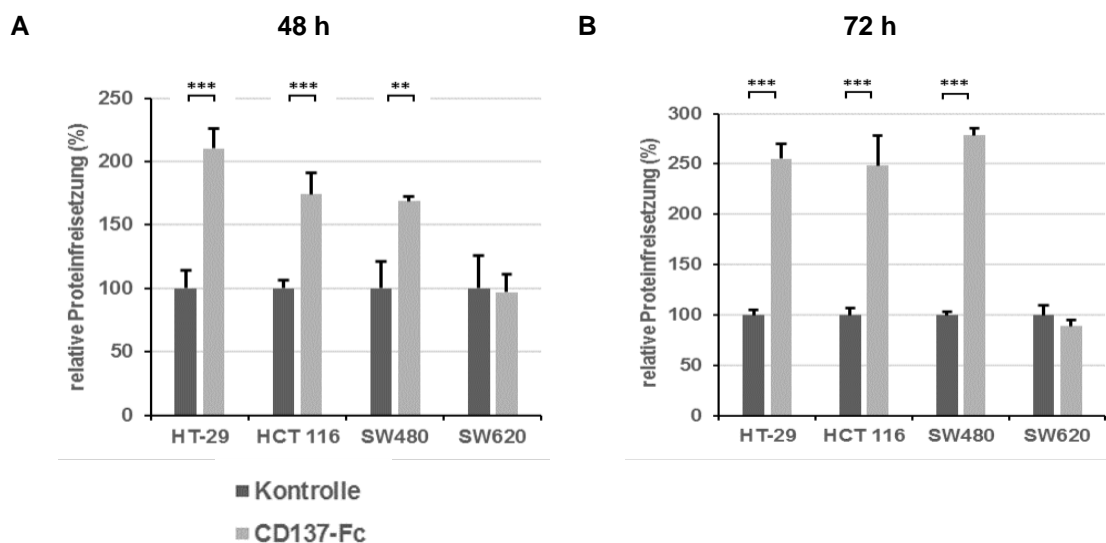


Abb. 6: PDGF-Sekretion von CD137L-stimulierten Kolonkarzinomzellen nach 48 und 72 Stunden.

In den Zelllinien HT-29 (n = 3), HCT 116 (n = 4) und SW480 (n = 3) zeigte sich eine deutliche Zunahme der Sekretion von PDGF nach Stimulation der Zellen mit CD137-Fc. Die Daten wurden mittels Luminex Multiplex-Assay gewonnen und mit Hilfe der Milliplex Analyst Software ausgewertet. ** p < 0,01; *** p < 0,001.

3.4.2 Die Sekretion von VEGF

Während nach 48 Stunden bei keiner Zelllinie ein signifikanter Unterschied der VEGF-Freisetzung zwischen den nicht-stimulierten und den stimulierten Zellen erkennbar war, konnte nach 72 Stunden in den HT-29- (132,9 % ± 9,3 %), HCT 116- (134,1 % ± 2,8 %) und SW480-Zellen (130,9 % ± 1,7 %) eine signifikant gesteigerte VEGF-Sekretion in den CD137L-stimulierten Zellen nachgewiesen werden. Analog zur Messung der PDGF-Sekretion konnte in der Zelllinie SW620 bzgl. der VEGF-Freisetzung kein Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen festgestellt werden (siehe Abb. 7).

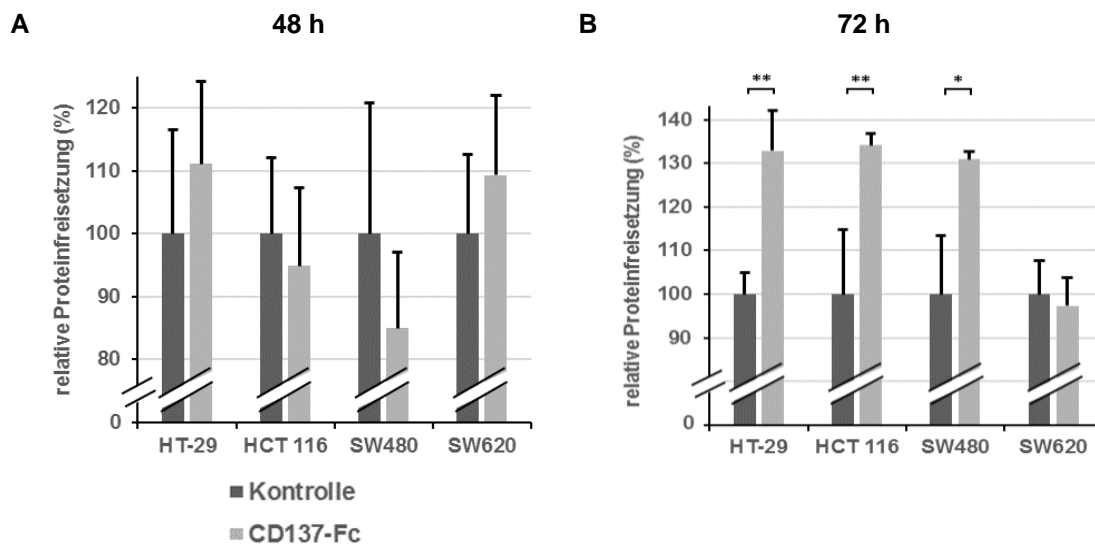


Abb. 7: VEGF-Sekretion von CD137L-stimulierten Kolonkarzinomzellen nach 48 und 72 Stunden.

(A) Nach 48 Stunden konnte noch kein signifikanter Unterschied zwischen den stimulierten Zellen und den Kontrollen beobachtet werden. **(B)** Nach 72-stündiger Stimulation der Zellen mit CD137-Fc zeigte sich in den Zelllinien HT-29 (n = 3), HCT 116 (n = 4) und SW480 (n = 3) jedoch eine deutliche Zunahme der Sekretion von VEGF. Die Daten wurden mittels Luminex Multiplex-Assay gewonnen und mit Hilfe der Milliplex Analyst Software ausgewertet. * p < 0,05; ** p < 0,01.

3.5 Die CD137-Proteinexpression nach Hypoxiebehandlung

Anders als CD137L konnte das membranständige CD137 in vorangegangenen Durchflusszytometrie (FACS, engl. *Fluorescence activated cell sorting*) -Analysen unserer Arbeitsgruppe bislang nicht auf den vier untersuchten Kolonkarzinomzelllinien nachgewiesen werden. Auf Proteinebene war es uns hingegen möglich, mittels Western Blot-Untersuchungen CD137-Protein in diesen Zellen nachzuweisen (T. Grimmig et al., 2019; Wagner, 2018). Es ist bekannt, dass neben der Oberflächen-Isoform auch eine lösliche Isoform des CD137 ohne Transmembrandomäne existiert (Michel et al., 1998). Dieses sCD137 (engl. *soluble CD137*) wird von einigen Tumorzellen vermehrt unter hypoxischen Bedingungen sezerniert (Labiano et al., 2016). Daher war nun die Auswirkung von Hypoxie auf die Proteinexpression von CD137 in den Kolonkarzinomzelllinien von Interesse.

Im Western Blot zeigten alle vier untersuchten Zelllinien nach einer 48-stündigen Hypoxiebehandlung eine deutlich geringere Proteinexpression von CD137 verglichen mit der CD137-Expression unter normoxischen Bedingungen (siehe Abb. 8).

Diese Reduktion betrug 37 % in den HT29-, 52 % in den HCT 116-, 26 % in den SW480- und 29 % in den SW620-Zellen.

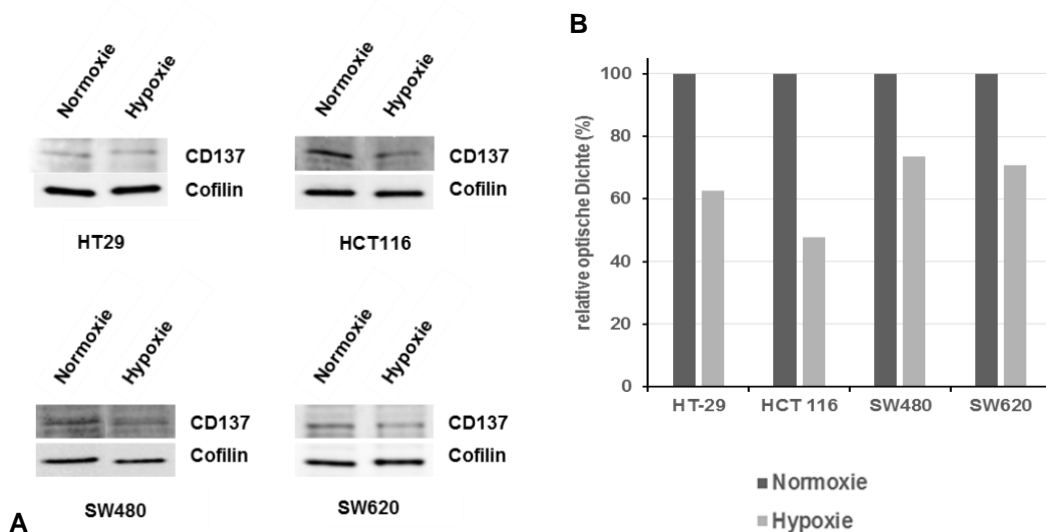


Abb. 8: CD137-Proteinexpression nach 48-stündiger Hypoxiebehandlung in den Zellkulturen HT-29, HCT 116, SW480 und SW620.

(A) Dargestellt ist die CD137-Proteinexpression unter hypoxischen vs. normoxischen Bedingungen in allen vier Zelllinien mittels Western Blot. Cofilin wurde als Proteinladekontrolle verwendet. **(B)** Unter hypoxischen im Vergleich zu normoxischen Bedingungen zeigt sich eine verminderte CD137-Proteinexpression in allen vier Zelllinien (jeweils n = 1). Die relative optische Dichte wurde mittels *ImageLab Touch Software* bestimmt.

3.6 Beantwortung der Fragen

1. Wie wirkt sich eine CD137L-Stimulation auf das Proliferationsverhalten von humanen Kolonkarzinomzellen aus? Zeigen sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien?

In den durchgeführten MTS Zellproliferationsassays zeigte sich nach 24-, 48- und 72-stündiger CD137L-Stimulation eine deutliche Abnahme der Proliferation der stimulierten im Vergleich zu den nicht-stimulierten Zellen. Die gemessenen Veränderungen waren, bis auf den Zeitpunkt von 48 Stunden in den SW620-Zellen, zu allen anderen Zeitpunkten und in allen Zelllinien signifikant. Im Vergleich der einzelnen Zelllinien zueinander zeigte sich ein recht homogenes Bild mit einer mittleren Reduktion der Proliferation um 3 % bis 13 %.

2. Welche Unterschiede im Proteinexpressionsprofil der CD137L-stimulierten Kolonkarzinomzellen werden im Vergleich zu dem der nicht-stimulierten Zellen beobachtet? Welche Proteine werden vermehrt exprimiert?

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression des als Marker für die Zellmigration geltenden Proteins Vimentin (Ivaska, 2011; Strouhalova et al., 2020; Toiyama et al., 2013) und des Proteins TLR7 bestimmt. Sowohl Vimentin als auch TLR7 wurden von jeweils drei der vier untersuchten Zelllinien nach CD137L-Stimulation vermehrt exprimiert. Hierbei zeigte sich je nach Zelllinie zu unterschiedlichen Zeitpunkten die maximale Expression. Nach 48-stündiger Stimulation mit CD137-Fc zeigten die HT-29-, HCT 116- und SW620-Zellen verglichen mit den nicht-stimulierten Zellen jedoch alle eine gesteigerte Vimentin-Expression. Bezüglich TLR7 konnte nach 72 Stunden in drei der vier CD137L-stimulierten Zelllinien eine Steigerung der Expression beobachtet werden. In den HCT 116-Tumorzellen zeigte sich zu diesem Zeitpunkt keine Zunahme der Expression nach Stimulation der Zellen. Aufgrund der bei einigen Tumorzelllinien fehlenden Wiederholungen der Versuchsansätze (Mindestanzahl von $n = 3$ Western Blot-Ansätzen nicht erreicht) werden die Ergebnisse entsprechend ohne weitere statistische Datenanalyse beschrieben und eine Interpretation der Ergebnisse ist nur eingeschränkt möglich.

3. Wie verändert sich das Sekretionsverhalten der Kolonkarzinomzellen bezüglich der beiden Wachstumsfaktoren PDGF und VEGF nach Stimulation von CD137L?

Alle Zellen sezernierten die Wachstumsfaktoren PDGF und VEGF, welche in den Überständen der untersuchten Zellen quantitativ gemessen werden konnten. In Hinblick auf PDGF zeigte sich in den HT-29-, den HCT 116- und den SW480-Zellen eine ausgeprägte Zunahme der Sekretion nach sowohl 48- als auch 72-stündiger CD137L-Stimulation. Auch VEGF wurde in diesen Zellen nach 72 Stunden Stimulation signifikant mehr sezerniert. In den SW620-Zellen hingegen veränderte sich zu keinem der untersuchten Zeitpunkte die Sekretion von PDGF oder VEGF signifikant.

4. Wie verändert sich die CD137-Expression von Kolonkarzinomzellen unter Hypoxiebedingungen?

Im durchgeführten Western Blot zeigte sich nach einer 48-stündigen Hypoxiebehandlung eine deutliche Abnahme der CD137-Proteinexpression. Diese Veränderung war in allen vier untersuchten Zellreihen nachweisbar.

Auch hier sind aufgrund der fehlenden Wiederholungen des Versuchsansatzes die Ergebnisse ohne weitere statistische Datenanalyse beschrieben und nur eingeschränkt zu interpretieren.

5. Welche Erkenntnisse leiten sich aus den *in vitro* gewonnenen Ergebnissen für den costimulatorischen Signalwege CD137 und dessen Liganden CD137L im kolorektalen Karzinom für die Klinik ab?

Bislang ist kaum bekannt, welche Rolle das Rezeptor-Liganden-Paar CD137/CD137L im Rahmen des Kolonkarzinoms spielt. Vor allem die Funktion einer reversen Signaltransduktion mittels CD137L in die Tumorzelle hinein ist zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit und der Publikation der Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe in einem internationalen Fachjournal für das CRC noch nicht untersucht. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass eine Stimulation der Tumorzelle durch CD137, welches sich zum Beispiel auf aktivierten T-Zellen befindet, zum einen zu einer Abnahme der Proliferation der Kolonkarzinomzellen führt. Zum anderen ergeben sich Hinweise darauf, dass die Stimulation eine Zunahme der Proteine Vimentin, TLR7, VEGF und PDGF vermittelt, welche wichtige Rollen im Prozess der Metastasierung einnehmen. Eine gesteigerte Immunantwort mit Zunahme der aktivierten T-Zellen bewirkt somit

möglicherweise eine Größenabnahme des Primärtumors im Kolon, während sie gleichzeitig die Metastasierung der Tumorzellen fördern könnte.

4 Diskussion

4.1 Auswirkungen der CD137L-Stimulation auf die Zellproliferation

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung einer CD137L-Stimulation auf die Proliferation humaner Kolonkarzinomzelllinien untersucht. Alle vier untersuchten Zelllinien zeigten eine Verringerung der Proliferation nach 24-, 48-, bzw. 72-stündiger Stimulation mit CD137-Fc. Diese Beobachtung deckt sich mit der von Lymphozyten und NSCLC-Tumorzellen. Auch diese Zellen reagieren auf die CD137L-Stimulation mit einer Abnahme der Proliferation und Zunahme der Apoptose (Qian et al., 2015; Schwarz et al., 1996; Shao et al., 2011), während in Monozyten und in Zellen des kutanen T-Zell-Lymphoms eine CD137L-Aktivierung mit einer gesteigerten Proliferation einhergeht (Kamijo et al., 2018; Langstein et al., 1999).

Da CD137L nicht nur via *reverse signaling* Signale in die Zelle hinein vermittelt, sondern gleichzeitig auch als Ligand von CD137 T-Zellen costimuliert, bewirkt eine CD137-CD137L-Bindung zwischen Tumor- und T-Zelle im CRC folglich zwei verschiedene Effekte. Zum einen wird die Aktivierung der T-Zelle verstärkt, sodass sie eine effektivere Immunreaktion bewirken kann. Zum anderen wirkt die Liganden-Rezeptor-Bindung mittels des *reverse signaling* retrograd in die Tumorzelle hinein, bremst dort die Proliferation und verstärkt möglicherweise auch die Apoptose. Somit resultiert die Stimulation in einer verstärkten Immunantwort und zugleich in einem reduzierten Wachstum der entarteten Zelle. Beide Effekte zusammen bewirken also auf den ersten Blick eine für den Fortbestand des Tumors nachteilige Gesamtsituation. Folglich könnte man davon ausgehen, dass Tumoren, die viel CD137L auf ihrer Oberfläche aufweisen, weniger stark wachsen, vom Immunsystem effektiver attackiert werden und daher für die erkrankten Personen insgesamt mit einer besseren Prognose einhergehen. Kürzlich publizierte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen jedoch genau den gegenteiligen Effekt. Während im UICC-Stadium I nur 25 % der untersuchten Tumoren eine hohe Genexpression von CD137L aufwiesen, waren es im UICC-Stadium IV 72 %. Diese hohe Expression ging im Vergleich zu einer niedrigen Expression mit einem deutlich kürzeren Gesamtüberleben einher (T. Grimmig et al., 2019). Auch Barderas et al. (2013) konnten einen direkten Zusammenhang zwischen erhöhter CD137L-mRNA und schlechterer Gesamtprognose beim CRC nachweisen. Daher stellt sich die Frage, worin diese Verschlechterung der Prognose mit zunehmender CD137L-Expression begründet liegt, wenn doch die Proliferation der Tumorzellen nach CD137L-Stimulation abnimmt.

Aufgrund der ebenfalls positiven Korrelation der CD137L-Expression mit dem Vorhandensein von Fernmetastasen deuten die Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe diesbezüglich auf einen Zusammenhang zwischen CD137L und der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen hin, welcher auch von weiteren Arbeitsgruppen jüngst nachgewiesen wurde (Barderas et al., 2013; Ge et al., 2020; T. Grimmig et al., 2019; Kamijo et al., 2018). Dies könnte bedeuten, dass CD137L zwar die Proliferation der Tumorzellen reduziert, gleichzeitig jedoch Signalwege der Migration und Invasion von Tumorzellen beeinflusst. Um mehr Aufschluss über die genauen Auswirkungen reverser Signalgebung durch CD137L zu bekommen, wurden daher zusätzlich zur Proliferation die Expression bzw. Sekretion einiger Proteine, die an der Tumorprogression und der Migration von Tumorzellen beteiligt sind, untersucht.

4.2 Auswirkungen der CD137L-Stimulation auf das Proteinexpressions- und -sekretionsprofil der Zellen

4.2.1 Vimentin

Nach CD137L-Stimulation zeigte sich in drei der vier untersuchten Kolonkarzinomzelllinien eine erhöhte Expression des Proteins Vimentin, was auf einen direkten CD137L-stimulatorischen Effekt auf die EMT (siehe Abschnitt 1.3.3) und die nachfolgende Metastasierung im Kolonkarzinom hinweist. In mehreren Studien konnte bereits eine Überexpression des Intermediärfilaments Vimentin durch epitheliale Tumoren nachgewiesen werden, welche mit der Aggressivität der malignen Tumoren korrelierte. Vor allem zeigte sich auch im CRC eine Assoziation einer hohen Vimentin-Expression mit dem Vorhandensein von Lymphknoten- und Lebermetastasen (Satelli et al., 2011; Toiyama et al., 2013).

Vimentin, welches unter physiologischen Bedingungen für die Plastizität mesenchymaler Zellen zwingend notwendig ist, wird physiologischerweise nur unter speziellen Bedingungen (z.B. während der Embryogenese und Neonatalperiode) auch von epithelialen Zellen exprimiert, ansonsten ist seine Expression auf mesenchymale Zellen beschränkt (Pagan et al., 1996; Strouhalova et al., 2020). Eine Hochregulation der Expression signalisiert somit eine Entwicklung von einem epithelialen hin zu einem mesenchymalen Phänotyp der Zelle (Battaglia et al., 2018). Im Rahmen pathologischer Prozesse ermöglicht diese Veränderung es Tumorzellen, durch die EZM zu migrieren und in Lymph- oder Blutgefäße zu gelangen und stellt demnach den ersten Schritt der Metastasierung dar (Acloque et al., 2009).

Die EMT ist durch eine Abnahme des epithel-spezifischen E-Cadherin und der Zytokeratine und durch eine Zunahme der mesenchymalen Marker wie Vimentin, N-Cadherin und Fibronectin gekennzeichnet (Noman et al., 2014; Thiery, 2002). Das hochregulierte Vimentin scheint dabei aber nicht nur ein Marker der EMT, sondern vielmehr eine wichtige Voraussetzung für die Induktion der EMT-assoziierten Migration zu sein, indem sie pro-migratorische Prozesse initiiert und die Bildung von für die EMT erforderlichen Transkriptionsfaktoren stimuliert (Gay et al., 2017; Ivaska, 2011). Eine Hemmung von Vimentin birgt somit die Möglichkeit, die Zellmigration und -invasion maligner Zellen zu verringern (Strouhalova et al., 2020).

Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigte Zunahme der Vimentin-Expression nach CD137L-Stimulation weist folglich darauf hin, dass das von den Tumorzellen exprimierte CD137L unter anderem über das Protein Vimentin direkt die EMT und die nachfolgende Metastasierung im Kolonkarzinom stimulatorisch beeinflusst. Dass die Vimentin-Expression nicht zu allen untersuchten Zeitpunkten erhöht ist, sondern sich eher Vimentin-Expresionsspitzen mit vorheriger oder nachfolgender Verminderung des Vimentin-Proteins zeigen, ist hierbei nicht überraschend, da Faktoren, die andere Gene regulieren, häufig schnell wieder abgebaut werden, um ein „Überschießen“ des Signals zu vermeiden. Eine erweiterte Untersuchung mit teilweiser Wiederholung der Versuchsansätze und einer anschließenden statistischen Auswertung wäre erstrebenswert, um die Ergebnisse dieser Arbeit bei aktuell kleiner Stichprobengröße statistisch zu untermauern.

4.2.2 TLR7

Im Rahmen der Karzinogenese scheinen TLRs durch die Auslösung einer Inflammationsreaktion in verschiedenen Tumoren zwei gegensätzliche Effekte zu vermitteln. Während in einigen Karzinomen antitumorale Wirkungen der TLRs bekannt sind (Asprodites et al., 2008; T. Grimmig, 2015), zeigen sich in anderen Tumorentitäten hingegen tumorprogressionsfördernde Wirkungen. Durch die TLR-vermittelte Hochregulation der NF- κ B-Kaskade, Expression antiapoptotischer Proteine und Sekretion von Zytokinen entsteht hierbei eine inflammatorische Mikroumgebung im Tumor, die mit einer verstärkten Immuntoleranz und Tumorprogression assoziiert ist (Sato et al., 2009). Im kolorektalen Karzinom sowie entsprechenden Zellkulturlinien konnte durch Teile unserer Arbeitsgruppe bereits eine erhöhte Expression von TLR7 und TLR8 nachgewiesen werden (Grimm et al., 2010; T. Grimmig, 2015). Eine hohe Expression korrelierte hierbei im Vergleich zu einer niedrigen Expression mit einer verstärkten Tumorprogression und einem verringerten krebspezifischen Überleben des betroffenen

Patienten bzw. der betroffenen Patientin. Auffällig war außerdem, dass im UICC-Stadium IV, welches das Vorliegen von Fernmetastasen beschreibt, 100 % aller untersuchten Tumoren eine hohe Expression von TLR7 aufwiesen (Grimm et al., 2010). In den hier vorgestellten Untersuchungen zeigten sich erstmals Hinweise darauf, dass diese Proteinexpression von TLR7 in Kolonkarzinomzellen durch eine CD137L-Stimulation noch gesteigert werden kann. Dies könnte bedeuten, dass die im Vergleich zum Normalgewebe erhöhte TLR7-Expression im CRC im direkten Zusammenhang mit der vermehrten CD137L-Expression und -aktivierung steht und könnte erklären, dass sowohl eine hohe CD137L- als auch eine hohe TLR7-Expression mit einer insgesamt schlechteren Prognose für den Patienten oder die Patientin einhergeht (Grimm et al., 2010; T. Grimmig et al., 2019). Für diese Prognoseverschlechterung gibt es mehrere Erklärungsansätze. Zum einen könnte eine Hochregulation von TLR7 dazu führen, dass die gezeigte CD137L-vermittelte Reduktion der Proliferation wieder aufgehoben wird und es doch zu einer Tumorprogression kommt. Dazu passen Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, die zeigen, dass die Proliferation der Kolonkarzinomzellen nach Stimulation mit dem TLR7-Agonisten Resiquimod anstieg, am deutlichsten nach vorheriger Stimulation der Zellen mit CD137-Fc (T. Grimmig et al., 2019). Zum anderen könnte die erhöhte TLR7-Expression zu einer Steigerung der Migrations- und Invasionsaktivität der Kolonkarzinomzellen mit konsekutiver Metastasierung führen. Eine solche Beteiligung der TLR-Signalwege am invasiven Tumorwachstum und an der Metastasierung maligner Tumoren konnte bereits in einigen Studien gezeigt werden (Chatterjee et al., 2014; Cherfils-Vicini et al., 2010; Dajon et al., 2019; Gonzalez-Reyes et al., 2010; O'Leary et al., 2012; Ochi et al., 2012; Park et al., 2017). So konnten zum Beispiel Dajon et al. (2019) sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigen, dass Tumorzellen des NSCLC TLR7 exprimieren und eine Stimulation mit einem TLR7-Agonisten im Mausmodell zu einer deutlichen Tumorprogression sowie gesteigerten Metastasierung führt. Darüber hinaus zeigte sich, dass NSCLC-Tumoren, die hohe Spiegel an TLR7 exprimieren, einen EMT-typischen Phänotyp (siehe Abschnitt 1.3.3) mit einer hohen Expression von Vimentin, sowie einer niedrigen von E-Cadherin aufweisen (Dajon et al., 2019) und auch in unseren Ergebnissen zeigte sich neben der gesteigerten TLR7-Expression eine solche Zunahme der Vimentin-Expression.

Passend zu den Ergebnissen bezüglich Vimentin, VEGF und PDGF könnte somit auch die Hochregulation von TLR7 zur Metastasierung der Tumorzellen beitragen.

4.2.3 VEGF und PDGF

VEGF und PDGF sind als sogenannte proangiogenetische Wachstumsfaktoren zusammen mit Zytokinen beide entscheidend an der physiologischen Angiogenese, also der Bildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßstrukturen, beteiligt. Diese läuft zum Beispiel im Rahmen der Embryogenese, des weiblichen Zyklus oder der Wundheilung ab (Breier et al., 1992; Carmeliet et al., 1996; Goede et al., 1998; Li et al., 2003; Risau et al., 1992). Aber auch im Rahmen von Tumorerkrankungen zeigte sich oft eine erhöhte Expression von VEGF und PDGF durch Tumorzellen im Vergleich zum Normalgewebe (Andrae et al., 2008; Farooqi et al., 2015; Ferrara et al., 1997; S.-M. Kang et al., 1997; Moench et al., 2016; Nakata et al., 1998).

Die VEGF-Familie umfasst eine Gruppe von VEGF-A, -B, -C, -D, -E und dem *placenta growth factor* (PlGF), die zum Teil in verschiedenen Isoformen vorliegen können (Matsumoto et al., 2001). Im Rahmen maligner Tumore scheint vor allem VEGF-A eine entscheidende Rolle zu spielen (Fan et al., 2005; George et al., 2001). VEGF-A bindet an die VEGF-Rezeptoren VEGFR-1 und -2, die sich vorrangig auf der Oberfläche von Gefäßendothelzellen befinden (Ferrara et al., 2003; Matsumoto et al., 2001; Mendelsohn et al., 2008), aber mittlerweile auch in Tumorgefäßen und auf Tumorzellen nachgewiesen worden sind (Doi et al., 2012; Fan et al., 2005; Matsumoto et al., 2001; Partanen et al., 1999).

PDGF in seiner aktiven Form liegt stets als ein Homo- oder Heterodimer aus den Isoformen PDGF-A, -B, -C oder -D vor und bindet an die PDGF-Tyrosinkinase-Rezeptoren $\alpha\alpha$, $\beta\beta$ und $\alpha\beta$ (PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\beta\beta$, PDGFR- $\alpha\beta$) (Carmeliet, 2005). Physiologischerweise ist PDGF maßgeblich an der Wundheilung beteiligt (Pierotti et al., 2010) und spielt eine wichtige Rolle bei der Blutgefäßbildung während der Embryogenese (Fredriksson et al., 2004). Im Rahmen von Karzinomen wird es jedoch auch von den Tumorzellen direkt exprimiert und sezerniert und bindet an seine Rezeptoren, welche von Stromazellen, Perizyten, sowie Tumorzellen exprimiert werden (Cao, 2013; Lindmark et al., 1993).

In den von uns durchgeführten Versuchen zeigte sich eine VEGF- und PDGF-Sekretion durch die untersuchten Kolonkarzinomzellen. Dies deckt sich mit Angaben in der Literatur, dass im CRC im Vergleich zum Normalgewebe eine deutlich gesteigerte VEGF-, sowie PDGF-Expression nachweisbar ist (S.-M. Kang et al., 1997; Moench et al., 2016; Nakata et al., 1998). Auffällig war, dass in den Überständen der CD137L-stimulierten HT-29-, HCT 116- und SW480-Zellen signifikant höhere Konzentrationen der Wachstumsfaktoren VEGF und PDGF messbar waren als in den Überständen der nicht-

stimulierten Zellen. Diese CD137L-vermittelte Zunahme der Sekretion von Wachstumsfaktoren weist auf eine gesteigerte Malignität der Tumorzellen hin, denn während Mohamed et al. (2017) zeigten, dass die Expression von VEGF im CRC mit der Tumorgroße, einem fortgeschritteneren Tumorstadium, sowie einer schlechteren Gesamtprognose korreliert, zeigte sich in anderen Untersuchungen eine Korrelation von VEGF-Expression der Tumoren mit lymphatischer und hepatischer Metastasierung, sowie einem schlechteren Gesamtüberleben (George et al., 2001; Ishigami et al., 1998; S.-M. Kang et al., 1997). Die PDGF-Expression ist ebenfalls mit Tumorwachstum und -ausbreitung, Therapieresistenz und schlechtem klinischen *Outcome* assoziiert (Kitadai et al., 2006; Lindmark et al., 1993; Manzat Saplacan et al., 2017; Steller et al., 2013). Wichtig ist es daher, die genauen Auswirkungen einer auf eine CD137L-Stimulation folgenden gesteigerten VEGF- bzw. PDGF-Sekretion im Kolonkarzinom zu verstehen.

Ein Vorteil für die Tumorzellen wäre eine gesteigerte Proliferationsaktivität. Da sie in Pankreaskarzinomzellen nach Stimulation der Tumorzellen mit den untersuchten Wachstumsfaktoren eine Aktivierung des proliferationsfördernden PI3K/Akt/mTOR-Signalweges sahen, vermuteten Teile unserer Arbeitsgruppe eine autoregulative Selbstinduktion von VEGF- und PDGF-Rezeptoren auf den Tumorzellen (T. Grimmig et al., 2016). Dass VEGF und PDGF zum Teil über autokrine Signalwege wirken, konnten auch andere Arbeitsgruppen bereits zeigen (Doi et al., 2012; Heldin, 2012; S. Lee et al., 2007). Mittels Western Blot untersuchte unsere Arbeitsgruppe daher in den Kolonkarzinomzellen die Proteine Akt und Erk, welche in phosphorylierter Form (pAkt, pErk) Schlüsselproteine der VEGF- und PDGF-nachgeschalteten Signalwegen MAPK und PI3K/Akt/mTOR sind (Cargnello et al., 2011; Heldin et al., 1999). Da nach CD137L-Stimulation sowohl pAkt als auch pErk vermindert waren, ist eine autokrine Wirkung von VEGF bzw. PDGF über diese Signalwege mit nachfolgend gesteigerter Proliferation unwahrscheinlich (T. Grimmig et al., 2019). Dies könnte erklären, warum die Proliferation der Kolonkarzinomzellen trotz VEGF- und PDGF-Erhöhung nicht gesteigert ist.

Jedoch könnte die Hochregulation der untersuchten Wachstumsfaktoren neben den Ergebnissen bzgl. Vimentin und TLR7 einen weiteren Hinweis auf eine Zunahme der pro-metastatischen Eigenschaften der Kolonkarzinomzellen nach CD137L-Stimulation darstellen. Diese Vermutung liegt nahe, da VEGF und PDGF wichtige Proteine der Angiogenese sind, welche einen wichtigen Aspekt der Metastasierung darstellt.

4.2.3.1 VEGF und Metastasierung

Bezüglich VEGF fördert eine Rezeptor-Liganden-Bindung die Proliferation, das Überleben und die Chemotaxis von Endothelzellen, sowie die Gefäßpermeabilität und bewirkt dadurch die Formation neuer Blutgefäße aus vorbestehenden Blutkapillaren der Tumormikroumgebung (Carmeliet, 2005; Ramakrishnan et al., 2014). Auch die Sekretion und Aktivierung von Enzymen, die die extrazelluläre Matrix abbauen, wird durch VEGF induziert und erleichtert somit zusätzlich die Neubildung von Blutgefäßen (Carmeliet, 2005; Thomas, 1996). Des Weiteren induziert VEGF die Sekretion anti-apoptotischer Faktoren, welche die Apoptose der neu gebildeten Gefäßstrukturen verhindern (Alon et al., 1995). All diese genannten Effekte werden vor allem durch eine Bindung von VEGF-A, welches auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, an VEGFR-2 vermittelt (Fan et al., 2005; Ferrara et al., 1997). Durch eine parakrine Wirkung des von den Tumorzellen sezernierten VEGF auf die Endothelzellen der Tumormikroumgebung werden demnach wichtige Schritte der Angiogenese beeinflusst. Hierzu passen die Ergebnisse von Nakata et al. (1998) und Kang et al. (1997), in denen eine hohe VEGF-Expression im Kolonkarzinom mit einer hohen Anzahl an Mikrogefäßen im Tumor korrelierte. Darüber hinaus zeigte sich immunhistochemisch eine starke VEGF-Expression vor allem auf den Tumorzellen, welche in die Mikrogefäße einwanderten. Nakata et al. (1998) schlussfolgerten, dass VEGF zum einen die Angiogenese in der Tumormikroumgebung, zum anderen die Metastasierung via Mikrogefäßen fördert. Denkbar ist daher auch eine autokrine Auswirkung der Wachstumsfaktoren auf die Migrations- und Invasionseigenschaften der Tumorzellen, denn in Endothelzellen ist bereits lange bekannt, dass VEGF die Migration und Invasion steigert (Yoshida et al., 1996). Rund zehn Jahre später konnten Fan et al. (2005) den gleichen Effekt in CRC-Zelllinien nachweisen. Zwar führte eine Stimulation von HT-29- sowie SW480-Zellen, die auch in der hier vorliegenden Arbeit verwendet wurden, mit VEGF-A zu keiner gesteigerten Proliferation, dafür aber zu einer gesteigerten Invasion und Migration der Tumorzellen. Unter Zugabe eines Antikörpers gegen den VEGFR-1 konnte der oben geschilderte Effekt einer VEGF-Stimulation nicht mehr nachgewiesen werden. Mit dieser Beobachtung übereinstimmend konnte in sieben untersuchten CRC-Zelllinien VEGFR-1-, jedoch kein VEGFR-2- oder VEGFR-3-Protein nachgewiesen werden (Fan et al., 2005). Eine solche positive Auswirkung einer VEGFR-1-Stimulation auf die Migration von Zellen konnte auch in Monozyten bereits gezeigt werden (Barleon et al., 1996).

Somit ist denkbar, dass das von den CD137L-stimulierten Kolonkarzinomzellen sezernierte VEGF VEGFR-2-vermittelt eine gesteigerte Angiogenese in der Tumormikroumgebung bewirkt, während VEGFR-1-vermittelt die Migration und Invasion der Tumorzellen in die neuen Mikrogefäße stimuliert wird. In der Gesamtschau bahnt es somit den Weg der Metastasierung der Karzinomzellen.

4.2.3.2 PDGF und Metastasierung

Ähnliche Überlegungen lassen sich bezüglich PDGF anstellen. Auch hier könnte die vermehrte CD137L-vermittelte PDGF-Sekretion der Kolonkarzinomzellen pro-metastastische Effekte vermitteln. So konnten Nakamura et al. (2008) zeigen, dass eine von der Arbeitsgruppe etablierte PDGF-exprimierende Kolonkarzinomzelllinie *in vitro* eine signifikant höhere Invasion und Migration aufweist als die dazugehörige Kontroll-Zelllinie und *in vivo* eine hohe PDGF-Expression in Kolonkarzinomen mit der Gefäßinvasion und insgesamt einer schlechteren Überlebensrate einhergeht.

Solche Effekte könnten analog zu der Wirkung von VEGF sowohl parakrin als auch autokrin vermittelt werden. Parakrin werden durch das von den Tumorzellen sezernierte PDGF die PDGFR-exprimierenden mikrovaskulären Perizyten der Tumormikroumgebung stimuliert, endotheliale Vorläuferzellen zu angiogenetischen Gefäßen rekrutiert und proangiogenetische Faktoren wie FGF (Fibroblasten-Wachstumsfaktor, engl. *fibroblast growth factor*) und VEGF aktiviert, wodurch die Gefäßendothelzellproliferation und -migration stimuliert wird (siehe Abschnitt 4.2.3.1) (Cao, 2013; Kitadai et al., 2006; Lindmark et al., 1993; Sundberg et al., 1993). Im Kolonkarzinom zeigte sich in der Tat eine starke Korrelation zwischen der PDGF-Expression von Tumorzellen und der Vaskularisierung des Tumors (Hsu et al., 1995), sowie zwischen der PDGFR-Expression im Stroma und dem metastatischen Potential der Tumoren (Kitadai et al., 2006).

PDGFR werden jedoch nicht ausschließlich von den Stromazellen und Perizyten exprimiert. Mittlerweile gelang auch der Nachweis einer PDGFR-Expression durch Tumorzellen, zum Beispiel denen des CRC. Der Rezeptor wird auf Tumorzellen aber nicht konstitutiv exprimiert, sondern die Fähigkeit der Expression wird im Rahmen der EMT erworben (Campbell et al., 2011; Jechlinger et al., 2003; Jechlinger et al., 2006; Steller et al., 2013). Eine autokrine PDGFR-Stimulation, welche durch Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren und mesenchymaler Gene zur Aufrechterhaltung der EMT weiter beiträgt (Jechlinger et al., 2006; Steller et al., 2013), scheint also im engen Zusammenhang mit Migration, Invasion und letztlich Metastasierung von Tumorzellen

zu stehen. So zeigte sich speziell im CRC, dass PDGFR im Mausmodell die Formierung von Lebermetastasen vermittelt (Steller et al., 2013).

Auffällig war bei den von uns vorgestellten Ergebnissen, dass sich im Gegensatz zu den drei untersuchten Primarius-Zelllinien bei den SW620-Zellen, welche ursprünglich aus einer Lymphknotenmetastase gewonnen wurden, keine signifikanten Veränderungen der VEGF- oder PDGF-Sekretion nach CD137L-Stimulation zeigten. Dies deckt sich jedoch mit Ergebnissen aus der Literatur, dass eine hohe PDGFR-Expression im Primärtumor mit Metastasierung korreliert, auf bereits bestehenden Metastasen sich jedoch keine erhöhte PDGFR-Expression befindet. Die Autoren und Autorinnen der Studie schlussfolgerten, dass PDGFR vor allem bezüglich der Formation neuer, nicht jedoch einer Wachstumsförderung bereits existierender Metastasen eine Rolle spielt (Steller et al., 2013).

Zusammenfassend könnte dies bedeuten, dass die Tumorzellen nach CD137L-Stimulation vermehrt PDGF sezernieren, um den Prozess der EMT und somit der Metastasierung voranzutreiben. Dies geschieht zum einen über eine parakrine Stimulation von Stromazellen und Perizyten und somit Beeinflussung der Tumormikroumgebung und zum anderen über eine autokrine Stimulation der Tumorzellen mit Aufrechterhaltung der EMT. Im Rahmen unserer Messungen wurde allerdings nicht zwischen den beiden Isoformen PDGF-AB und PDGF-BB unterschieden. Da diesen in der Literatur zum Teil unterschiedliche Wirkungen im Rahmen der Tumorgenese zugeschrieben werden (Manzat Saplacan et al., 2017), wäre für nachfolgende Untersuchungen noch die exakte Bestimmung der von den Zellen sezernierten PDGF-Isoform interessant.

4.3 Einfluss von Hypoxie

Besonders im Kern eines Tumors oder einer Metastase bestehen häufig hypoxische Bedingungen. Dies ist meist auf eine hohe Stoffwechselaktivität und eingeschränkte Vaskularisierung des Tumors zurückzuführen. Die Hypoxie fördert das Tumorwachstum, die Angiogenese und trägt zur EMT-assoziierten Tumorzellmigration und somit insgesamt zum Fortschreiten der Tumorerkrankung bei (Muz et al., 2015; Noman et al., 2014). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung von Hypoxie auf das Rezeptor-Liganden-Paar CD137/CD137L auf Kolonkarzinomzellen untersucht. Hier zeigte sich im Western Blot der Hinweis auf eine Abnahme des CD137-Proteins nach 48-stündiger Hypoxiebehandlung der Zellen. Da wir in vorangegangenen FACS-Analysen unserer Arbeitsgruppe in keiner der vier untersuchten Zelllinien CD137 auf der

Zelloberfläche nachweisen konnten und auch Immunfluoreszenz-Färbungen eher auf ein intrazelluläres Vorkommen von CD137 hindeuteten (T. Grimmig et al., 2019), liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Protein um intrazelluläres CD137 handelt, welches aufgrund der Hypoxiebehandlung von der Zelle freigesetzt wird und demnach im Zelllysate nicht mehr messbar ist. Diese Vermutung deckt sich mit *in vitro*-Analysen, die zeigten, dass einige murine Tumorzellen lösliches CD137 (sCD137, engl. *soluble CD137*) sezernieren und zwar passend zu den hier dargestellten Ergebnissen vermehrt dann, wenn die Zellen hypoxischen Bedingungen ausgesetzt sind (Labiano et al., 2016).

Bereits 1998 wurde entdeckt, dass eine solche nicht-membrangebundene Isoform von CD137 von aktivierten T-Zellen freigesetzt wird (Michel et al., 1998). Mittlerweile konnte sCD137 auch im Serum und in Tumorphomogenisaten von u.a. Patienten und Patientinnen mit CRC nachgewiesen werden (Dimberg et al., 2006); die klinische Relevanz dieser Beobachtung ist bis dato jedoch noch nicht eindeutig geklärt. Vorstellbar ist jedoch, dass sCD137 von den Tumoren im Rahmen eines *immune escape*-Mechanismus sezerniert wird. Indem sCD137 an das membranständige CD137L der APC bindet, verhindert es die Costimulation der T-Zelle und die Tumorzelle kann sich hierdurch im Rahmen der Hypoxie der verstärkten Immunantwort entziehen (Labiano et al., 2016). Bislang ist jedoch wenig darüber bekannt, wie sCD137 darüber hinaus die reverse Signalgebung in die Tumorzelle hinein beeinflusst. Denkbar wäre eine stimulatorische Wirkung mit migrations- oder invasionsfördernden Signalen (z.B. durch Einleitung der EMT, siehe Abschnitt 1.3.3). Dazu passt der schon oft nachgewiesene Zusammenhang zwischen Tumorphoxie und vermehrter Metastasierung. Einzelne Studien weisen hingegen darauf hin, dass zumindest in murinen T-Zellen auch diese reverse Signaltransduktion durch sCD137 eher inhibiert wird (Luu et al., 2020; Shao et al., 2008). Der von unserer Arbeitsgruppe kürzlich gezeigte Anstieg von sCD137 im Überstand von Kolonkarzinomzellen nach CD137L-Stimulation (T. Grimmig et al., 2019), könnte somit auf eine negative Rückkopplung hinweisen, indem das sCD137 eine Überstimulation der Tumorzelle via CD137L und so zum Beispiel eine zu starke Reduktion der Proliferation verhindert.

4.4 Limitationen

Alle der hier vorgestellten Versuche wurden unter artifiziellen Zellkulturbedingungen durchgeführt. Auch wenn die untersuchten Zellen humane Kolonkarzinomzellen waren, können die gewonnenen Ergebnisse nicht eins-zu-eins auf das Krankheitsgeschehen

des Kolonkarzinoms im Menschen übertragen werden. Vor allem die Abwesenheit der verschiedenen Bestandteile des Immunsystems muss bedacht werden. Da die Tumorzellen sehr von der Tumormikroumgebung beeinflusst werden bzw. auf diese mit verschiedenen (z.B. *immune escape*-) Mechanismen reagieren, ist es möglich, dass die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse unter Einfluss des aktiven Immunsystems sich anders präsentieren würden. Um die Situation *in vivo* besser abzubilden, würden sich daher für die Zukunft auf unsere Ergebnisse aufbauende Versuche in Cokulturen der Tumorzellen mit T-Zellen anbieten.

Die Ergebnisse unserer Proteinexpressionsanalysen deuten darauf hin, dass nach CD137L-Stimulation von den Kolonkarzinomzellen verschiedene Proteine exprimiert oder sezerniert werden, die an wichtigen Schritten der Metastasierung von Tumorzellen beteiligt sind. Da jedoch lediglich die Proteinexpression untersucht wurde, sind nun, um den Verdacht eines direkten Einflusses der CD137L-Stimulation auf die Migration und Invasion der Tumorzellen zu bestätigen, neben Versuchen mit erhöhter Fallzahl auch weiterführende Migrations- und Invasionsassays notwendig.

Auch die vermutete hypoxie-induzierte Sekretion von sCD137 durch die Kolonkarzinomzellen sollte durch weiterführende Messungen von sCD137 im Überstand der hypoxie-behandelten Zellen bestätigt werden.

4.5 Klinische Bedeutung und Ausblick

Die mittlere 5-Jahres-Überlebensrate für Menschen mit CRC beträgt aktuell ca. 62 – 63 %. Das Vorhandensein von Fernmetastasen verschlechtert die Prognose jedoch signifikant (Siegel et al., 2020). Für die Verbesserung der Therapie ist es daher umso wichtiger, die Entstehung von Metastasen frühestmöglich zu erkennen und den Patienten und Patientinnen auch dann eine wirkungsvolle Therapie anbieten zu können. In diesem Zusammenhang stehen unter anderem die *Imm checkpoints* (siehe Abschnitt 1.2.3) aktuell im Fokus therapeutischer Überlegungen und je nach *Checkpoint*-Molekül zeigen Inhibitoren oder Stimulatoren bei fortgeschrittenen Tumorerkrankungen zum Teil eindruckliche Ergebnisse (Gellrich et al., 2020; Han et al., 2019). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das *Imm checkpoint*-Paar CD137/CD137L untersucht und unsere Versuche zeigten erstmals, dass die Stimulation von CD137L auf den CRC-Tumorzellen die Proliferation der entarteten Zellen reduziert und sie bieten einen Hinweis darauf, dass die Stimulation gleichzeitig eine Steigerung von Migration und Invasion dieser Zellen bewirkt. Sollte sich in weiterführenden Migrations- und Invasionsassays eine solche CD137L-vermittelte Steigerung der Migration bzw. Invasion bestätigen, so ließe sich der

hier dargestellte Verdacht erhärten, dass CD137L an der Metastasierung von Kolonkarzinomzellen beteiligt ist. In diesem Fall wäre CD137L als eine vielversprechende neue therapeutische Zielstruktur im Kolonkarzinom anzusehen. Zu bedenken wäre hierbei jedoch die Expression von CD137L auf diversen Nicht-Tumorzellen, welche durch eine medikamentöse CD137L-Blockade ebenfalls beeinflusst werden könnten.

Während eine solche anti-CD137L-Therapie einen ganz neuen Therapieansatz darstellen würde, zeigen agonistische anti-CD137-Antikörper im Rahmen von Studien bezüglich der Therapie verschiedener solider Tumoren bereits vielversprechende Ergebnisse (Chu et al., 2019; Han et al., 2019). Die antitumoralen Wirkungen dieser Antikörper werden je nach Antikörper zum Teil nicht nur über eine gesteigerte Costimulation der T-Zellen, sondern auch über ein vermindertes *reverse signaling* via CD137L auf den APC vermittelt (Chester et al., 2017; S. W. Kang et al., 2017). Die hier dargestellten Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass darüber hinaus auch tumorprogressionsfördernde Signale, die durch CD137L auf den Tumorzellen vermittelt werden, durch anti-CD137-Antikörper blockiert werden. So könnte im Kolonkarzinom ein anti-CD137-Antikörper möglicherweise das Entstehen von Fernmetastasen verhindern. Der Therapieeffekt könnte jedoch geschwächt werden, wenn von den Tumoren als Reaktion auf hypoxische Bedingungen sezerniertes lösliches CD137 mit dem CD137-Antikörper um Bindungsstellen am membranständigen CD137 der T-Zellen konkurriert. In diesem Fall ginge eine hohe Konzentration an sCD137 nicht nur aufgrund der Verminderung der T-Zell-Costimulation, sondern auch aufgrund einer verminderten Wirksamkeit dieser Medikamente mit einer schlechteren Prognose für den Patienten oder die Patientin einher (Luu et al., 2020).

Daher wird zukünftig neben CD137L möglicherweise auch sCD137 in der Therapie des Kolonkarzinoms eine wichtige Rolle spielen. Bevor jedoch zum Beispiel eine von Luu et al. (2020) vorgeschlagene spezifische Plasmapherese für sCD137 etabliert wird, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen, welche Auswirkungen eine Bindung von sCD137 an das CD137L der Kolonkarzinomzellen hat. Denn im Falle einer inhibitorischen Funktion von sCD137 würde eine potenzielle Reduktion bzw. Entfernung von sCD137 zu einer gesteigerten Aktivierung der Tumorzellen mit möglicherweise konsekutiver Förderung der Migrations- und Invasionsaktivität führen, sodass der gewünschte therapeutische Nutzen aufgehoben wäre.

5 Zusammenfassung

Die Beeinflussung von Immuncheckpoints stellt einen relativ neuartigen Ansatz in der Tumorthherapie dar und einige Checkpoint-Moleküle, wie zum Beispiel CTLA4 oder PD-1 haben sich bereits als attraktive therapeutische Zielstrukturen bewiesen. Auch CD137 gehört zu diesen Immuncheckpoints, stellt im Gegensatz zu CTLA4 oder PD-1 auf T-Zellen jedoch ein immunstimulatorisches Protein dar. Aufgrund dessen laufen zum aktuellen Zeitpunkt im Rahmen der Tumorthherapie mehrere klinische Studien mit agonistischen Anti-CD137-Antikörpern, die zum Teil bereits vielversprechende Ergebnisse liefern. Der Ligand von CD137, CD137L, fungiert gleichzeitig auch selbst als Rezeptor und vermittelt als ein solcher mittels *reverse signaling* Signale in die ihn exprimierende Zelle. Neben seiner Expression auf APC wird CD137L unter anderem auch vermehrt auf Tumorzellen exprimiert. In vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten wir nicht nur zeigen, dass im Tumorgewebe des CRC im Vergleich zum Normalgewebe vermehrt CD137L exprimiert wird, sondern auch, dass eine hohe CD137L-Expression mit dem Auftreten von Fernmetastasen korreliert. Bislang wurde die Funktion von CD137L im CRC und sein mögliches Potenzial als therapeutische Zielstruktur jedoch noch kaum genauer untersucht.

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen von Kolonkarzinomzelllinien deuten nun erstmals darauf hin, dass die CD137L-Stimulation *in vitro* die Proliferation der entarteten Zellen reduziert und die Expression bzw. Sekretion der Proteine Vimentin, TLR7, VEGF und PDGF steigert. Außerdem zeigten sich in den Kolonkarzinomzellen Hinweise darauf, dass die Proteinexpression von CD137 unter dem Einfluss von Hypoxie abnimmt, was möglicherweise auf eine Sekretion von sCD137 hindeuten könnte.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass eine Stimulation des von den Tumorzellen des CRC exprimierten CD137L dazu führt, dass sich der Phänotyp der Tumorzellen von einem epithelialen in Richtung eines mesenchymalen Zelltyps verändert. Darüber hinaus werden durch die vermehrte Expression bzw. Sekretion verschiedener Proteine voraussichtlich unterschiedliche Signalwege aktiviert, die an der Invasion und Migration der entarteten Zellen beteiligt sind. Folglich scheint eine CD137L-Stimulation der Tumorzellen auf diesem Wege wichtige Schritte der Metastasierung zu bahnen. Sollte sich diese Vermutung in weiterführenden Untersuchungen bestätigen, könnte eine pharmazeutische Beeinflussung dieser Stimulation möglicherweise therapeutischen Nutzen im Rahmen des Kolonkarzinoms bedeuten, wobei es eine mögliche hypoxie-bedingte Sekretion von sCD137 durch die Tumorzellen zu bedenken gilt, welche die CD137-CD137L-Interaktionen zusätzlich beeinflussen könnte.

6 Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2018). Properties and Overview of Immune Responses. In *Cellular and Molecular Immunology* (pp. 2-10). Philadelphia: Elsevier.
- Acloque, H., Adams, M. S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest*, *119*(6), 1438-1449. doi:10.1172/jci38019
- Alon, T., Hemo, I., Itin, A., Pe'er, J., Stone, J., & Keshet, E. (1995). Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med*, *1*(10), 1024-1028.
- Andrae, J., Gallini, R., & Betsholtz, C. (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*, *22*(10), 1276-1312. doi:10.1101/gad.1653708
- Asprodites, N., Zheng, L., Geng, D., Velasco-Gonzalez, C., Sanchez-Perez, L., & Davila, E. (2008). Engagement of Toll-like receptor-2 on cytotoxic T-lymphocytes occurs in vivo and augments antitumor activity. *Faseb j*, *22*(10), 3628-3637. doi:10.1096/fj.08-108274
- Barderas, R., Mendes, M., Torres, S., Bartolome, R. A., Lopez-Lucendo, M., Villar-Vazquez, R., Pelaez-Garcia, A., Fuente, E., Bonilla, F., & Casal, J. I. (2013). In-depth characterization of the secretome of colorectal cancer metastatic cells identifies key proteins in cell adhesion, migration, and invasion. *Mol Cell Proteomics*, *12*(6), 1602-1620. doi:10.1074/mcp.M112.022848
- Barleon, B., Sozzani, S., Zhou, D., Weich, H. A., Mantovani, A., & Marme, D. (1996). Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*, *87*(8), 3336-3343.
- Battle, E., & Massagué, J. (2019). Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity*, *50*(4), 924-940. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.024
- Battaglia, R. A., Delic, S., Herrmann, H., & Snider, N. T. (2018). Vimentin on the move: new developments in cell migration. *F1000Res*, *7*. doi:10.12688/f1000research.15967.1
- Boland, P. M., Yurgelun, M. B., & Boland, C. R. (2018). Recent progress in Lynch syndrome and other familial colorectal cancer syndromes. *CA Cancer J Clin*. doi:10.3322/caac.21448
- Breier, G., Albrecht, U., Sterrer, S., & Risau, W. (1992). Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development*, *114*(2), 521-532.
- Broll, K., Richter, G., Pauly, S., Hofstaedter, F., & Schwarz, H. (2001). CD137 expression in tumor vessel walls. High correlation with malignant tumors. *Am J Clin Pathol*, *115*(4), 543-549. doi:10.1309/6u88-357u-ukj5-ypt3
- Campbell, C. I., & Moorehead, R. A. (2011). Mammary tumors that become independent of the type I insulin-like growth factor receptor express elevated levels of platelet-derived growth factor receptors. *BMC Cancer*, *11*, 480. doi:10.1186/1471-2407-11-480

- Cao, Y. (2013). Multifarious functions of PDGFs and PDGFRs in tumor growth and metastasis. *Trends Mol Med*, 19(8), 460-473. doi:10.1016/j.molmed.2013.05.002
- Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 75(1), 50-83. doi:10.1128/mmlbr.00031-10
- Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*, 69 Suppl 3, 4-10. doi:10.1159/000088478
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoeck, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., & Nagy, A. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380(6573), 435-439. doi:10.1038/380435a0
- Chatterjee, S., Crozet, L., Damotte, D., Iribarren, K., Schramm, C., Alifano, M., Lupo, A., Cherfils-Vicini, J., Goc, J., Katsahian, S., Younes, M., Dieu-Nosjean, M. C., Fridman, W. H., Sautes-Fridman, C., & Cremer, I. (2014). TLR7 promotes tumor progression, chemotherapy resistance, and poor clinical outcomes in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 74(18), 5008-5018. doi:10.1158/0008-5472.Can-13-2698
- Cherfils-Vicini, J., Platonova, S., Gillard, M., Laurans, L., Validire, P., Caliandro, R., Magdeleinat, P., Mami-Chouaib, F., Dieu-Nosjean, M. C., Fridman, W. H., Damotte, D., Sautes-Fridman, C., & Cremer, I. (2010). Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance. *J Clin Invest*, 120(4), 1285-1297. doi:10.1172/jci36551
- Chester, C., Ambulkar, S., & Kohrt, H. E. (2016). 4-1BB agonism: adding the accelerator to cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, 65(10), 1243-1248. doi:10.1007/s00262-016-1829-2
- Chester, C., Sanmamed, M. F., Wang, J., & Melero, I. (2017). Immunotherapy targeting 4-1BB: mechanistic rationale, clinical results, and future strategies. *Blood*. doi:10.1182/blood-2017-06-741041
- Chu, D. T., Bac, N. D., Nguyen, K. H., Tien, N. L. B., Thanh, V. V., Nga, V. T., Ngoc, V. T. N., Anh Dao, D. T., Hoan, L. N., Hung, N. P., Trung Thu, N. T., Pham, V. H., Vu, L. N., Pham, T. A. V., & Thimiri Govinda Raj, D. B. (2019). An Update on Anti-CD137 Antibodies in Immunotherapies for Cancer. *Int J Mol Sci*, 20(8). doi:10.3390/ijms20081822
- Cooper, D., Bansal-Pakala, P., & Croft, M. (2002). 4-1BB (CD137) controls the clonal expansion and survival of CD8 T cells in vivo but does not contribute to the development of cytotoxicity. *Eur J Immunol*, 32(2), 521-529. doi:10.1002/1521-4141(200202)32:2<521::aid-immu521>3.0.co;2-x
- Croft, M. (2003). Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14(3-4), 265-273.
- Dajon, M., Iribarren, K., Petitprez, F., Marmier, S., Lupo, A., Gillard, M., Ouakrim, H., Victor, N., Vincenzo, D. B., Joubert, P. E., Kepp, O., Kroemer, G., Alifano, M., Damotte, D., & Cremer, I. (2019). Toll like receptor 7 expressed by malignant cells promotes tumor progression and metastasis through the recruitment of myeloid derived suppressor cells. *Oncoimmunology*, 8(1), e1505174. doi:10.1080/2162402x.2018.1505174
- Dimberg, J., Hugander, A., & Wagsater, D. (2006). Expression of CD137 and CD137 ligand in colorectal cancer patients. *Oncol Rep*, 15(5), 1197-1200.

- Doi, Y., Yashiro, M., Yamada, N., Amano, R., Noda, S., & Hirakawa, K. (2012). VEGF-A/VEGFR-2 Signaling Plays an Important Role for the Motility of Pancreas Cancer Cells. *Annals of Surgical Oncology*, *19*(8), 2733-2743. doi:10.1245/s10434-011-2181-6
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, *3*(11), 991-998. doi:10.1038/ni1102-991
- Fan, F., Wey, J. S., McCarty, M. F., Belcheva, A., Liu, W., Bauer, T. W., Somcio, R. J., Wu, Y., Hooper, A., Hicklin, D. J., & Ellis, L. M. (2005). Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene*, *24*(16), 2647-2653. doi:10.1038/sj.onc.1208246
- Farkona, S., Diamandis, E. P., & Blasutig, I. M. (2016). Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Med*, *14*, 73. doi:10.1186/s12916-016-0623-5
- Farooqi, A. A., & Siddik, Z. H. (2015). Platelet-derived growth factor (PDGF) signalling in cancer: rapidly emerging signalling landscape. *Cell Biochem Funct*, *33*(5), 257-265. doi:10.1002/cbf.3120
- Ferrara, N., & Davis-Smyth, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, *18*(1), 4-25. doi:10.1210/edrv.18.1.0287
- Ferrara, N., Gerber, H.-P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, *9*(6), 669-676. doi:10.1038/nm0603-669
- Foster, C. C., Fleming, G. F., Karrison, T. G., Liao, C. Y., Desai, A. V., Moroney, J. W., et al. (2021). Phase I Study of Stereotactic Body Radiotherapy plus Nivolumab and Urelumab or Cabiralizumab in Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res*, *27*(20), 5510-5518. doi:10.1158/1078-0432.Ccr-21-0810
- Francisco, L. M., Sage, P. T., & Sharpe, A. H. (2010). The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev*, *236*, 219-242. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x
- Fredriksson, L., Li, H., & Eriksson, U. (2004). The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev*, *15*(4), 197-204. doi:10.1016/j.cytogfr.2004.03.007
- Gay, C. M., Balaji, K., & Byers, L. A. (2017). Giving AXL the axe: targeting AXL in human malignancy. *Br J Cancer*, *116*(4), 415-423. doi:10.1038/bjc.2016.428
- Ge, Y., Chen, W., Zhang, X., Wang, H., Cui, J., Liu, Y., Ju, S., Tian, X., & Ju, S. (2020). Nuclear-localized costimulatory molecule 4-1BBL promotes colon cancer cell proliferation and migration by regulating nuclear Gsk3beta, and is linked to the poor outcomes associated with colon cancer. *Cell Cycle*, 1-15. doi:10.1080/15384101.2020.1719308
- Gellrich, F. F., Schmitz, M., Beissert, S., & Meier, F. (2020). Anti-PD-1 and Novel Combinations in the Treatment of Melanoma-An Update. *J Clin Med*, *9*(1). doi:10.3390/jcm9010223
- George, M. L., Tutton, M. G., Janssen, F., Arnaout, A., Abulafi, A. M., Eccles, S. A., & Swift, R. I. (2001). VEGF-A, VEGF-C, and VEGF-D in colorectal cancer progression. *Neoplasia*, *3*(5), 420-427. doi:10.1038/sj.neo.7900186
- Glorieux, C., & Huang, P. (2019). Regulation of CD137 expression through K-Ras signaling in pancreatic cancer cells. *Cancer Commun (Lond)*, *39*(1), 41. doi:10.1186/s40880-019-0386-4

- Goede, V., Schmidt, T., Kimmina, S., Kozian, D., & Augustin, H. G. (1998). Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab Invest*, *78*(11), 1385-1394.
- Gonzalez-Reyes, S., Marin, L., Gonzalez, L., Gonzalez, L. O., del Casar, J. M., Lamelas, M. L., Gonzalez-Quintana, J. M., & Vizoso, F. J. (2010). Study of TLR3, TLR4 and TLR9 in breast carcinomas and their association with metastasis. *BMC Cancer*, *10*, 665. doi:10.1186/1471-2407-10-665
- Grimm, M., Kim, M., Rosenwald, A., Heemann, U., Germer, C. T., Waaga-Gasser, A. M., & Gasser, M. (2010). Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR8 expression on CD133+ cells in colorectal cancer points to a specific role for inflammation-induced TLRs in tumourigenesis and tumour progression. *Eur J Cancer*, *46*(15), 2849-2857. doi:10.1016/j.ejca.2010.07.017
- Grimmig, T. (2015). *Immunity, Inflammation and Cancer: The role of Foxp3, TLR7 and TLR8 in gastrointestinal cancer*. Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
- Grimmig, T., Gasser, M., Moench, R., Zhu, L. J., Nawalaniec, K., Callies, S., Wagner, M., Polat, B., Mothi, S. S., Luo, Y., Ribas, C. M., Malafaia, O., Hsiao, L. L., & Waaga-Gasser, A. M. (2019). Expression of Tumor-mediated CD137 ligand in human colon cancer indicates dual signaling effects. *Oncoimmunology*, *8*(12), e1651622. doi:10.1080/2162402x.2019.1651622
- Grimmig, T., Moench, R., Kreckel, J., Haack, S., Rueckert, F., Rehder, R., Tripathi, S., Ribas, C., Chandraker, A., Germer, C. T., Gasser, M., & Waaga-Gasser, A. M. (2016). Toll Like Receptor 2, 4, and 9 Signaling Promotes Autoregulative Tumor Cell Growth and VEGF/PDGF Expression in Human Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci*, *17*(12). doi:10.3390/ijms17122060
- Haggar, F. A., & Boushey, R. P. (2009). Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg*, *22*(4), 191-197. doi:10.1055/s-0029-1242458
- Han, X., & Vesely, M. D. (2019). Stimulating T Cells Against Cancer With Agonist Immunostimulatory Monoclonal Antibodies. *Int Rev Cell Mol Biol*, *342*, 1-25. doi:10.1016/bs.ircmb.2018.07.003
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Heldin, C. H. (2012). Autocrine PDGF stimulation in malignancies. *Ups J Med Sci*, *117*(2), 83-91. doi:10.3109/03009734.2012.658119
- Heldin, C. H., & Westermark, B. (1999). Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*, *79*(4), 1283-1316. doi:10.1152/physrev.1999.79.4.1283
- Ho, W. T., Pang, W. L., Chong, S. M., Castella, A., Al-Salam, S., Tan, T. E., Moh, M. C., Koh, L. K., Gan, S. U., Cheng, C. K., & Schwarz, H. (2013). Expression of CD137 on Hodgkin and Reed-Sternberg cells inhibits T-cell activation by eliminating CD137 ligand expression. *Cancer Res*, *73*(2), 652-661. doi:10.1158/0008-5472.Can-12-3849
- Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., et al. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, *363*(8), 711-723. doi:10.1056/NEJMoa1003466
- Hsu, S., Huang, F., & Friedman, E. (1995). Platelet-derived growth factor-B increases colon cancer cell growth in vivo by a paracrine effect. *J Cell Physiol*, *165*(2), 239-245. doi:10.1002/jcp.1041650204

- Ishigami, S. I., Arai, S., Furutani, M., Niwano, M., Harada, T., Mizumoto, M., Mori, A., Onodera, H., & Imamura, M. (1998). Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. *Br J Cancer*, *78*(10), 1379-1384. doi:10.1038/bjc.1998.688
- Ivaska, J. (2011). Vimentin: Central hub in EMT induction? *Small GTPases*, *2*(1), 51-53. doi:10.4161/sgtp.2.1.15114
- Jechlinger, M., Grunert, S., Tamir, I. H., Janda, E., Ludemann, S., Waerner, T., Seither, P., Weith, A., Beug, H., & Kraut, N. (2003). Expression profiling of epithelial plasticity in tumor progression. *Oncogene*, *22*(46), 7155-7169. doi:10.1038/sj.onc.1206887
- Jechlinger, M., Sommer, A., Moriggl, R., Seither, P., Kraut, N., Capodiecci, P., Donovan, M., Cordon-Cardo, C., Beug, H., & Grunert, S. (2006). Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *J Clin Invest*, *116*(6), 1561-1570. doi:10.1172/jci24652
- Kamijo, H., Miyagaki, T., Shishido-Takahashi, N., Nakajima, R., Oka, T., Suga, H., Sugaya, M., & Sato, S. (2018). Aberrant CD137 ligand expression induced by GATA6 overexpression promotes tumor progression in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood*, *132*(18), 1922-1935. doi:10.1182/blood-2018-04-845834
- Kang, S.-M., Maeda, K., Onoda, N., Chung, Y.-S., Nakata, B., Nishiguchi, Y., & Sowa, M. (1997). Combined analysis of p53 and vascular endothelial growth factor expression in colorectal carcinoma for determination of tumor vascularity and liver metastasis. *International Journal of Cancer*, *74*(5), 502-507. doi:10.1002/(sici)1097-0215(19971021)74:5<502::Aid-ijc4>3.0.Co;2-7
- Kang, S. W., Lee, S. C., Park, S. H., Kim, J., Kim, H. H., Lee, H. W., Seo, S. K., Kwon, B. S., Cho, H. R., & Kwon, B. (2017). Anti-CD137 Suppresses Tumor Growth by Blocking Reverse Signaling by CD137 Ligand. *Cancer Res*, *77*(21), 5989-6000. doi:10.1158/0008-5472.can-17-0610
- Keir, M. E., Liang, S. C., Guleria, I., Latchman, Y. E., Qipo, A., Albacker, L. A., Koulmanda, M., Freeman, G. J., Sayegh, M. H., & Sharpe, A. H. (2006). Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med*, *203*(4), 883-895. doi:10.1084/jem.20051776
- Kitadai, Y., Sasaki, T., Kuwai, T., Nakamura, T., Bucana, C. D., Hamilton, S. R., & Fidler, I. J. (2006). Expression of activated platelet-derived growth factor receptor in stromal cells of human colon carcinomas is associated with metastatic potential. *Int J Cancer*, *119*(11), 2567-2574. doi:10.1002/ijc.22229
- Kudo-Saito, C., Shirako, H., Takeuchi, T., & Kawakami, Y. (2009). Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell*, *15*(3), 195-206. doi:10.1016/j.ccr.2009.01.023
- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*, *30*(1), 16-34. doi:10.3109/08830185.2010.529976
- Labiano, S., Palazon, A., Bolanos, E., Azpilikueta, A., Sanchez-Paulete, A. R., Morales-Kastresana, A., Quetglas, J. I., Perez-Gracia, J. L., Gurrpide, A., Rodriguez-Ruiz, M., Aznar, M. A., Jure-Kunkel, M., Berraondo, P., & Melero, I. (2016). Hypoxia-induced soluble CD137 in malignant cells blocks CD137L-costimulation as an immune escape mechanism. *Oncoimmunology*, *5*(1), e1062967. doi:10.1080/2162402x.2015.1062967
- Langstein, J., Michel, J., Fritsche, J., Kreutz, M., Andreesen, R., & Schwarz, H. (1998). CD137 (ILA/4-1BB), a member of the TNF receptor family, induces monocyte activation via bidirectional signaling. *J Immunol*, *160*(5), 2488-2494.

- Langstein, J., Michel, J., & Schwarz, H. (1999). CD137 induces proliferation and endomitosis in monocytes. *Blood*, *94*(9), 3161-3168.
- Lee, H. W., Park, S. J., Choi, B. K., Kim, H. H., Nam, K. O., & Kwon, B. S. (2002). 4-1BB promotes the survival of CD8+ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. *J Immunol*, *169*(9), 4882-4888.
- Lee, S., Chen, T. T., Barber, C. L., Jordan, M. C., Murdock, J., Desai, S., Ferrara, N., Nagy, A., Roos, K. P., & Iruela-Arispe, M. L. (2007). Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell*, *130*(4), 691-703. doi:10.1016/j.cell.2007.06.054
- Li, J., Zhang, Y. P., & Kirsner, R. S. (2003). Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc Res Tech*, *60*(1), 107-114. doi:10.1002/jemt.10249
- Lichtenstern, C. R., Ngu, R. K., Shalpour, S., & Karin, M. (2020). Immunotherapy, Inflammation and Colorectal Cancer. *Cells*, *9*(3). doi:10.3390/cells9030618
- Lindmark, G., Sundberg, C., Glimelius, B., Pahlman, L., Rubin, K., & Gerdin, B. (1993). Stromal expression of platelet-derived growth factor beta-receptor and platelet-derived growth factor B-chain in colorectal cancer. *Lab Invest*, *69*(6), 682-689.
- Lotze, M. T., Zeh, H. J., Rubartelli, A., Sparvero, L. J., Amoscato, A. A., Washburn, N. R., Devera, M. E., Liang, X., Tor, M., & Billiar, T. (2007). The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol Rev*, *220*, 60-81. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00579.x
- Luu, K., Shao, Z., & Schwarz, H. (2020). The relevance of soluble CD137 in the regulation of immune responses and for immunotherapeutic intervention. *J Leukoc Biol*. doi:10.1002/jlb.2mr1119-224r
- Mai, C. W., Kang, Y. B., & Pichika, M. R. (2013). Should a Toll-like receptor 4 (TLR-4) agonist or antagonist be designed to treat cancer? TLR-4: its expression and effects in the ten most common cancers. *Onco Targets Ther*, *6*, 1573-1587. doi:10.2147/ott.S50838
- Manzat Saplacan, R. M., Balacescu, L., Gherman, C., Chira, R. I., Craiu, A., Mircea, P. A., Lisencu, C., & Balacescu, O. (2017). The Role of PDGFs and PDGFRs in Colorectal Cancer. *Mediators Inflamm*, *2017*, 4708076. doi:10.1155/2017/4708076
- Marin-Acevedo, J. A., Dholaria, B., Soyano, A. E., Knutson, K. L., Chumsri, S., & Lou, Y. (2018). Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges. *J Hematol Oncol*, *11*(1), 39. doi:10.1186/s13045-018-0582-8
- Marmol, I., Sanchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., & Rodriguez Yoldi, M. J. (2017). Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*, *18*(1). doi:10.3390/ijms18010197
- Matsumoto, T., & Claesson-Welsh, L. (2001). VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE*, *2001*(112), re21. doi:10.1126/stke.2001.112.re21
- Mendelsohn, J., Howley, P. M., Israel, M. A., Gray, J. W., & Thompson, C. B. (2008). Tumor Angiogenesis. In *The Molecular Basis of Cancer* (3 ed.). Philadelphia, PA, USA: Saunders Elsevier.
- Michel, J., Langstein, J., Hofstadter, F., & Schwarz, H. (1998). A soluble form of CD137 (ILA/4-1BB), a member of the TNF receptor family, is released by activated

- lymphocytes and is detectable in sera of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*, 28(1), 290-295. doi:10.1002/(sici)1521-4141(199801)28:01<290::aid-immu290>3.0.co;2-s
- Moench, R., Grimmig, T., Kannen, V., Tripathi, S., Faber, M., Moll, E. M., Chandraker, A., Lissner, R., Germer, C. T., Waaga-Gasser, A. M., & Gasser, M. (2016). Exclusive inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling is not sufficient to prevent PDGF-mediated effects on glycolysis and proliferation in colorectal cancer. *Oncotarget*, 7(42), 68749-68767. doi:10.18632/oncotarget.11899
- Mohamed, S. Y., Mohammed, H. L., Ibrahim, H. M., Mohamed, E. M., & Salah, M. (2017). Role of VEGF, CD105, and CD31 in the Prognosis of Colorectal Cancer Cases. *J Gastrointest Cancer*. doi:10.1007/s12029-017-0014-y
- Muz, B., de la Puente, P., Azab, F., & Azab, A. K. (2015). The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl)*, 3, 83-92. doi:10.2147/hp.S93413
- Nakamura, Y., Tanaka, F., Yoshikawa, Y., Mimori, K., Inoue, H., Yanaga, K., & Mori, M. (2008). PDGF-BB is a novel prognostic factor in colorectal cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 15(8), 2129-2136. doi:10.1245/s10434-008-9943-9
- Nakata, S., Ito, K., Fujimori, M., Shingu, K., Kajikawa, S., Adachi, W., Matsuyama, I., Tsuchiya, S., Kuwano, M., & Amano, J. (1998). Involvement of vascular endothelial growth factor and urokinase-type plasminogen activator receptor in microvessel invasion in human colorectal cancers. *Int J Cancer*, 79(2), 179-186. doi:10.1002/(sici)1097-0215(19980417)79:2<179::aid-ijc14>3.0.co;2-5
- Noman, M. Z., Messai, Y., Muret, J., Hasmim, M., & Chouaib, S. (2014). Crosstalk between CTC, Immune System and Hypoxic Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron*, 7(3), 153-160. doi:10.1007/s12307-014-0157-3
- Nowossadeck, E., Haberland, J., & Kraywinkel, K. (2014). [The future incidence of colorectal and lung cancers: results of the calculation of different scenarios for the year 2020]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 57(1), 103-110. doi:10.1007/s00103-013-1873-4
- O'Leary, D. P., Bhatt, L., Woolley, J. F., Gough, D. R., Wang, J. H., Cotter, T. G., & Redmond, H. P. (2012). TLR-4 signalling accelerates colon cancer cell adhesion via NF-kappaB mediated transcriptional up-regulation of Nox-1. *PLoS One*, 7(10), e44176. doi:10.1371/journal.pone.0044176
- Ochi, A., Graffeo, C. S., Zambirinis, C. P., Rehman, A., Hackman, M., Fallon, N., Barilla, R. M., Henning, J. R., Jamal, M., Rao, R., Greco, S., Deutsch, M., Medina-Zea, M. V., Bin Saeed, U., Ego-Osuola, M. O., Hajdu, C., & Miller, G. (2012). Toll-like receptor 7 regulates pancreatic carcinogenesis in mice and humans. *J Clin Invest*, 122(11), 4118-4129. doi:10.1172/jci63606
- Pagan, R., Martin, I., Alonso, A., Llobera, M., & Vilaro, S. (1996). Vimentin filaments follow the preexisting cytokeratin network during epithelial-mesenchymal transition of cultured neonatal rat hepatocytes. *Exp Cell Res*, 222(2), 333-344. doi:10.1006/excr.1996.0043
- Palma, C., Binaschi, M., Bigioni, M., Maggi, C. A., & Goso, C. (2004). CD137 and CD137 ligand constitutively coexpressed on human T and B leukemia cells signal proliferation and survival. *Int J Cancer*, 108(3), 390-398. doi:10.1002/ijc.11574
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 12(4), 252-264. doi:10.1038/nrc3239

- Park, G. B., & Kim, D. (2017). TLR5/7-mediated PI3K activation triggers epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells through WAVE3-dependent mesothelin or OCT4/SOX2 expression. *Oncol Rep*, *38*(5), 3167-3176. doi:10.3892/or.2017.5941
- Partanen, T. A., Alitalo, K., & Miettinen, M. (1999). Lack of lymphatic vascular specificity of vascular endothelial growth factor receptor 3 in 185 vascular tumors. *Cancer*, *86*(11), 2406-2412.
- Pierotti, M. A., Frattini, M., Sozzi, G., & Croce, C. M. (2010). *Oncogenes*. In *Cancer Medicine* (8 ed.). Shelton, CT, USA: PMPH-USA.
- Postow, M. A., Callahan, M. K., & Wolchok, J. D. (2015). Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol*, *33*(17), 1974-1982. doi:10.1200/jco.2014.59.4358
- Qian, Y., Pei, D., Cheng, T., Wu, C., Pu, X., Chen, X., Liu, Y., Shen, H., Zhang, W., & Shu, Y. (2015). CD137 ligand-mediated reverse signaling inhibits proliferation and induces apoptosis in non-small cell lung cancer. *Med Oncol*, *32*(3), 44. doi:10.1007/s12032-015-0499-9
- Ramakrishnan, S., Anand, V., & Roy, S. (2014). Vascular endothelial growth factor signaling in hypoxia and inflammation. *J Neuroimmune Pharmacol*, *9*(2), 142-160. doi:10.1007/s11481-014-9531-7
- Recio-Boiles, A., & Cagir, B. (2017). *Cancer, Colon*. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC.
- Risau, W., Drexler, H., Mironov, V., Smits, A., Siegbahn, A., Funa, K., & Heldin, C. H. (1992). Platelet-derived growth factor is angiogenic in vivo. *Growth Factors*, *7*(4), 261-266. doi:10.3109/08977199209046408
- Robert Koch-Institut. (2019). Krebs in Deutschland für 2015/2016 (Vol. 12). *Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.)*.
- Rodriguez-Bigas, M. A., & Grothey, A. (2017). Overview of the management of primary colon cancer. *UpToDate*. Retrieved from https://www.uptodate.com/contents/overview-of-the-management-of-primary-colon-cancer?search=colorectal%20cancer%20treatment&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1
- Salih, H. R., Kosowski, S. G., Haluska, V. F., Starling, G. C., Loo, D. T., Lee, F., Aruffo, A. A., Trail, P. A., & Kiener, P. A. (2000). Constitutive expression of functional 4-1BB (CD137) ligand on carcinoma cells. *J Immunol*, *165*(5), 2903-2910.
- Sanmamed, M. F., Etxeberria, I., Otano, I., & Melero, I. (2019). Twists and turns to translating 4-1BB cancer immunotherapy. *Sci Transl Med*, *11*(496). doi:10.1126/scitranslmed.aax4738
- Satelli, A., & Li, S. (2011). Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*, *68*(18), 3033-3046. doi:10.1007/s00018-011-0735-1
- Sato, Y., Goto, Y., Narita, N., & Hoon, D. S. (2009). Cancer Cells Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron*, *2 Suppl 1*, 205-214. doi:10.1007/s12307-009-0022-y
- Schwarz, H., Blanco, F. J., von Kempis, J., Valbracht, J., & Lotz, M. (1996). ILA, a member of the human nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor family, regulates T-lymphocyte proliferation and survival. *Blood*, *87*(7), 2839-2845.

- Schwarz, H., Tuckwell, J., & Lotz, M. (1993). A receptor induced by lymphocyte activation (ILA): a new member of the human nerve-growth-factor/tumor-necrosis-factor receptor family. *Gene*, *134*(2), 295-298.
- Shao, Z., & Schwarz, H. (2011). CD137 ligand, a member of the tumor necrosis factor family, regulates immune responses via reverse signal transduction. *J Leukoc Biol*, *89*(1), 21-29. doi:10.1189/jlb.0510315
- Shao, Z., Sun, F., Koh, D. R., & Schwarz, H. (2008). Characterisation of soluble murine CD137 and its association with systemic lupus. *Mol Immunol*, *45*(15), 3990-3999. doi:10.1016/j.molimm.2008.05.028
- Shuford, W. W., Klussman, K., Tritchler, D. D., Loo, D. T., Chalupny, J., Siadak, A. W., Brown, T. J., Emswiler, J., Raecho, H., Larsen, C. P., Pearson, T. C., Ledbetter, J. A., Aruffo, A., & Mittler, R. S. (1997). 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *J Exp Med*, *186*(1), 47-55.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*, *70*(1), 7-30. doi:10.3322/caac.21590
- Steller, E. J., Raats, D. A., Koster, J., Rutten, B., Govaert, K. M., Emmink, B. L., Snoeren, N., van Hooff, S. R., Holstege, F. C., Maas, C., Borel Rinkes, I. H., & Kranenburg, O. (2013). PDGFRB promotes liver metastasis formation of mesenchymal-like colorectal tumor cells. *Neoplasia*, *15*(2), 204-217. doi:10.1593/neo.121726
- Strouhalova, K., Prechova, M., Gandalovicova, A., Brabek, J., Gregor, M., & Rosel, D. (2020). Vimentin Intermediate Filaments as Potential Target for Cancer Treatment. *Cancers (Basel)*, *12*(1). doi:10.3390/cancers12010184
- Sundberg, C., Ljungstrom, M., Lindmark, G., Gerdin, B., & Rubin, K. (1993). Microvascular pericytes express platelet-derived growth factor-beta receptors in human healing wounds and colorectal adenocarcinoma. *Am J Pathol*, *143*(5), 1377-1388.
- Tamura, R., Tanaka, T., Akasaki, Y., Murayama, Y., Yoshida, K., & Sasaki, H. (2019). The role of vascular endothelial growth factor in the hypoxic and immunosuppressive tumor microenvironment: perspectives for therapeutic implications. *Med Oncol*, *37*(1), 2. doi:10.1007/s12032-019-1329-2
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, *2*(6), 442-454. doi:10.1038/nrc822
- Thomas, K. A. (1996). Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem*, *271*(2), 603-606.
- Toiyama, Y., Yasuda, H., Saigusa, S., Tanaka, K., Inoue, Y., Goel, A., & Kusunoki, M. (2013). Increased expression of Slug and Vimentin as novel predictive biomarkers for lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Carcinogenesis*, *34*(11), 2548-2557. doi:10.1093/carcin/bgt282
- Tunger, A., Kiessler, M., Wehner, R., Temme, A., Meier, F., Bachmann, M., & Schmitz, M. (2018). Immune Monitoring of Cancer Patients Prior to and During CTLA-4 or PD-1/PD-L1 Inhibitor Treatment. *Biomedicines*, *6*(1). doi:10.3390/biomedicines6010026
- Wagner, M. (2018). *Untersuchungen zu den kostimulatorischen Signalwegen PD-1/PD-L1 und CD137/CD137L beim kolorektalen Karzinom*. Julius-Maximilians-Universität Würzburg,

- Wang, Q., Zhang, P., Zhang, Q., Wang, X., Li, J., Ma, C., Sun, W., & Zhang, L. (2008). Analysis of CD137 and CD137L expression in human primary tumor tissues. *Croat Med J*, 49(2), 192-200.
- Weltgesundheitsorganisation. (2018). *Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016*. Geneva
- Ying, Z., He, T., Wang, X., Zheng, W., Lin, N., Tu, M., Xie, Y., Ping, L., Zhang, C., Liu, W., Deng, L., Qi, F., Ding, Y., Lu, X. A., Song, Y., & Zhu, J. (2019). Parallel Comparison of 4-1BB or CD28 Co-stimulated CD19-Targeted CAR-T Cells for B Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *Mol Ther Oncolytics*, 15, 60-68. doi:10.1016/j.omto.2019.08.002
- Yoshida, A., Anand-Apte, B., & Zetter, B. R. (1996). Differential endothelial migration and proliferation to basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor. *Growth Factors*, 13(1-2), 57-64. doi:10.3109/08977199609034566
- Zhang, G. B., Dong, Q. M., Hou, J. Q., Ge, Y., Ju, S. G., Lu, B. F., & Zhang, X. G. (2007). Characterization and application of three novel monoclonal antibodies against human 4-1BB: distinct epitopes of human 4-1BB on lung tumor cells and immune cells. *Tissue Antigens*, 70(6), 470-479. doi:10.1111/j.1399-0039.2007.00943.x
- Zhang, Y., & Zheng, J. (2020). Functions of Immune Checkpoint Molecules Beyond Immune Evasion. *Adv Exp Med Biol*, 1248, 201-226. doi:10.1007/978-981-15-3266-5_9
- Zhao, S., Zhang, Y., Zhang, Q., Wang, F., & Zhang, D. (2014). Toll-like receptors and prostate cancer. *Front Immunol*, 5, 352. doi:10.3389/fimmu.2014.00352
- Zhu, H., Wang, M., Du, Y., Liu, X., Weng, X., & Li, C. (2019). 4-1BBL has a Possible Role in Mediating Castration-Resistant Conversion of Prostate Cancer via Up-Regulation of Androgen Receptor. *J Cancer*, 10(11), 2464-2471. doi:10.7150/jca.29648
- Zou, W., & Chen, L. (2008). Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*, 8(6), 467-477. doi:10.1038/nri2326

I. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTB	β -Aktin
Akt	Proteinkinase B
APC	Antigen Presenting Cell („Antigen-präsentierende Zelle“)
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation („Unterscheidungsgruppen“)
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CRC	Colorectal Cancer („Kolorektales Karzinom“)
CTL	Cytotoxic T lymphocyte („Zytotoxische T-Zelle“)
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DAMP	Damage-associated molecular patterns
DC	Dendritic Cell („Dendritische Zelle“)
DNA	Deoxyribonucleic acid („Desoxyribonukleinsäure“)
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DTT	Dithiothreitol
EC	Endothelial Cell („Endothelzellen“)
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting („Durchflusszytometrie“)
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FBS	Fetal Bovine Serum („Fetales Kälberserum“)
HNPCC	Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom
HRP	Horseradish peroxidase („Meerrettichperoxidase“)
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
m/v	Masse/Volumen
mAb	Monoclonal Antibody („Monoklonaler Antikörper“)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase

MHC	Major Histocompatibility Complex („Haupthistokompatibilitätskomplex“)
MTS	3-(4,5-dimethyl-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2h-tetrazolium, inner salt
NaCl	Natriumchlorid
NaDOC	Sodium Deoxycholate
NaF	Natriumfluorid
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer („Nicht-Kleinzelliges Bronchiakarzinom“)
pAb	Polyclonal Antibody („Polyklonaler Antikörper“)
PAMP	Pathogen associated molecular patterns
PBMC	Peripher blood mononuclear cell
PD1	Programmed cell death protein 1
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PIGF	Placenta growth factor
PRR	Pattern recognition receptor
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonucleic Acid („Ribonukleinsäure“)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate („Natriumdodecylsulfat“)
Tab.	Tabelle
TBS-T	Tris Buffered Saline-Tween
TCR	T-Cell Receptor („T-Zell-Rezeptor“)
TGF- β	Transforming growth factor β
T _H -Zelle	T-Helfer-Zelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg} Zelle	Regulatorische T-Zelle
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
v/v	Volumen/Volumen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung ausgewählter costimulatorischer bzw. -inhibitorischer Interaktionen zwischen APC und T-Zellen (erstellt nach Pardoll, 2012).	6
Abb. 2:	Die einzelnen Schritte der Metastasierung, inkl. der EMT.....	11
Abb. 3:	Darstellung der zeitabhängigen Proliferation von humanen Kolonkarzinomzellen nach CD137L-Stimulation.....	25
Abb. 4:	Western Blot-Darstellung der Vimentin-Proteinexpression in CD137L-stimulierten HT-29-, HCT 116- und SW620-Zellen nach 48 h.....	26
Abb. 5:	Western Blot-Darstellung der TLR7-Proteinexpression in CD137L-stimulierten HT-29-, SW480- und SW620-Zellen nach 72 h.	27
Abb. 6:	PDGF-Sekretion von CD137L-stimulierten Kolonkarzinomzellen nach 48 und 72 Stunden.	28
Abb. 7:	VEGF-Sekretion von CD137L-stimulierten Kolonkarzinomzellen nach 48 und 72 Stunden.	29
Abb. 8:	CD137-Proteinexpression nach 48-stündiger Hypoxiebehandlung in den Zellkulturen HT-29, HCT 116, SW480 und SW620.....	30

III. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Verwendete vorgefertigte Nährmedien, Puffer und Reagenzien.....	13
Tab. 2:	Verwendete selbst-angesetzte Puffer	15
Tab. 3:	Verwendete Primärantikörper.....	15
Tab. 4:	Verwendete Sekundärantikörper.....	16
Tab. 5:	Verwendete Laborgeräte	16
Tab. 6:	Verwendete Verbrauchsmaterialien	17
Tab. 7:	Verwendete Software	18

IV. Danksagung

Besonders danke ich Frau Prof. Dr. Ana Maria Waaga-Gasser und Herrn Prof. Dr. Martin Gasser für die Vergabe des Promotionsthemas, die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Begleitung während der experimentellen Durchführung der Arbeit sowie die konstruktiven und hilfreichen Ratschläge zum Verfassen der Dissertation.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Christoph-Thomas Germer, Direktor der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Möglichkeit, diese Arbeit an seiner Klinik durchzuführen, danken.

Mein ausdrücklicher Dank gilt zudem Frau Dr. Tanja Grimmig für die strukturierte Einführung in die genutzten Methoden, die Hilfe bei der Auswertung der erhobenen Daten sowie ihre stete Bereitschaft zur Besprechung sämtlicher Fragen und Probleme.

Ich danke Frau Dr. Romana Mönch für die umfassende Einarbeitung und Hilfestellung im Rahmen der Western Blot-Versuche. Bei ihr und der gesamten Arbeitsgruppe Molekulare Onkoimmunologie möchte ich mich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken. Ohne ihre Unterstützung und die Ermutigungen während der unzähligen Gespräche, aber auch ohne ihre konstruktive Kritik wäre diese Arbeit nicht zu dem geworden, was sie jetzt ist.

V. Lebenslauf

VI. Eigene Veröffentlichungen

Grimmig T, Gasser M, Moench R, Zhu LJ, Nawalaniec K, **Callies S**, Wagner M, Polat B, Mothi SS, Luo Y, Ribas CM, Malafaia O, Hsiao LL, Waaga-Gasser AM. Expression of Tumor-mediated CD137 ligand in human colon cancer indicates dual signaling effects. *Oncoimmunology*. 2019 Sep 6;8(12):e1651622.

Grimmig T, Moll EM, Kloos K, Thumm R, Moench R, **Callies S**, Kreckel J, Vetterlein M, Pelz J, Polat B, Tripathi S, Rehder R, Ribas CM, Chandraker A, Germer CT, Waaga-Gasser AM, Gasser M. Upregulated Heat Shock Proteins After Hyperthermic Chemotherapy Point to Induced Cell Survival Mechanisms in Affected Tumor Cells From Peritoneal Carcinomatosis. *Cancer Growth Metastasis*. 2017 Sep 18;10:1179064417730559.

Janssen H, Wagner CS, Demmer P, **Callies S**, Sölter G, Loghmani-Khouzani H, Hu N, Schuett H, Tietge UJ, Warnecke G, Larmann J, Theilmeier G. Acute perioperative-stress-induced increase of atherosclerotic plaque volume and vulnerability to rupture in apolipoprotein-E-deficient mice is amenable to statin treatment and IL-6 inhibition. *Dis Model Mech*. 2015 Sep;8(9):1071-80.