

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie  
der Julius-Maximilian-Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. C.-T. Germer

## **Die Bedeutung der Expression des Tumornekrosefaktor- $\alpha$ bei Patienten mit kolorektalem Karzinom**



Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Dr. med. dent. Martin Grimm  
aus Nürnberg  
Würzburg, November 2010

**Referent:** Priv.-Doz. Dr. med. Burkhard von Rahden

**Korreferent:** Professor Dr. med. Böck

**Dekan:** Professor Dr. G. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2010

Der Promovend ist Arzt und Zahnarzt

## INHALT

<b>1</b>	<b><i>Einleitung</i></b> .....	<b>2</b>
1.1	Das kolorektale Karzinom .....	2
1.2	Tumor-Escape-Mechanismen.....	4
1.3	Tumor-Escape-Mechanismen durch TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1) Expression beim kolorektalen Karzinom .....	5
1.4	Ziele und Fragestellungen.....	7
<b>2</b>	<b><i>Material und Methoden</i></b> .....	<b>8</b>
2.1	Patienten.....	8
2.2	Immunhistochemie (IHC) und Immunfluoreszenz (IF).....	8
2.3	Quantifizierung der Immunhistochemie .....	10
2.4	Real time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	11
2.5	Statistische Analysen .....	12
<b>3</b>	<b><i>Ergebnisse</i></b> .....	<b>14</b>
3.1	Intra- and Interobserver-Reliabilität.....	14
3.2	TNF- $\alpha$ Expression kolorektaler Tumorzellen wird mit Tumorprogression assoziiert .....	14
3.3	Korrelation der TNF- $\alpha$ Protein- und Genexpression.....	16
3.4	TNF-R1 Expression ist verstärkt auf CD8 <sup>+</sup> tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) nachzuweisen .....	17
3.5	Eine hohe TNF- $\alpha$ Expression ist mit Tumorrezidiv und positivem Lymphknotenstatus assoziiert .....	20
3.6	Prognostischer Wert der TNF- $\alpha$ Expression bei Patienten mit kolorektalem Karzinom .....	21
<b>4</b>	<b><i>Diskussion</i></b> .....	<b>22</b>
<b>5</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b> .....	<b>28</b>
<b>6</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i></b> .....	<b>29</b>
<b>7</b>	<b><i>Abkürzungsverzeichnis</i></b> .....	<b>34</b>
<b>8</b>	<b><i>Danksagung</i></b> .....	<b>35</b>
<b>9</b>	<b><i>Lebenslauf</i></b> .....	<b>36</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das kolorektale Karzinom

Tumorerkrankungen des Dickdarms (Kolon) und Mastdarms (Rektum) werden zusammen als kolorektales Karzinom oder Darmkrebs bezeichnet. Die Therapie des Darmkrebses erfolgt heute multimodal abhängig von der Tumorlokalisierung und dem Stadium durch Operationen, Bestrahlungen und Chemotherapie. Nach dem Bronchialkarzinom ist der Darmkrebs der zweithäufigste bösartige Tumor. In Deutschland erkrankten 2002 nach Angaben des Robert-Koch-Instituts 71.400 Menschen an einem kolorektalen Karzinom (Männer und Frauen etwa gleich häufig). Etwa jeder 20. Bundesbürger entwickelt in seinem Leben ein kolorektales Karzinom. Betroffen sind vor allem Menschen in fortgeschrittenem Lebensalter; das Risiko steigt ab dem 50. Lebensjahr deutlich an. Das Durchschnittsalter bei Erstdiagnose liegt bei 65 Jahren [1]. Die Einteilung der Tumorstadien des kolorektalen Karzinoms erfolgt nach UICC (Union International Contre le Cancer), nach Dukes und nach dem TNM-System (Tabelle 1).

Tabelle 1: Stadieneinteilung kolorektaler Karzinome

UICC	Dukes	TNM	Definition
0		$T_{IS}N_0M_0$	Carcinoma in situ
I	Dukes A	$T_{1-2}N_0M_0$	Tumor reicht bis zur Muscularis propria
II	Dukes B	$T_{3-4}N_0M_0$	Tumor erreicht viszerales Peritoneum bzw. andere Organe
III	Dukes C	$T_{jedes}N_{1-2}M_0$	Regionale Lymphknotenmetastasen
IV	Dukes D	$T_{jedes}N_{jedes}M_1$	Fernmetastasen (primär Leber und Lunge)

Die meisten Karzinome (ca. 85-90%) entstehen aus prämaligen adenomatösen Vorläuferläsionen, Polypen (Typen: tubulär, villös oder tubulovillös). Dabei besitzen breitbasig aufsitzende Adenome ein höheres Entartungsrisiko als gestielte Adenome; das bedeutet, villöse Adenome haben

---

das größte Risiko zur Entartung, gefolgt von tubulovillösen und tubulären Adenomen. Da sich Adenome bei etwa 30% der älteren Menschen finden, muss angenommen werden, dass weniger als 1% maligne entarten. Die Wahrscheinlichkeit zur Entartung steigt allerdings mit der Polypengröße (ca. 2% bei > 1,5 cm Durchmesser, bis zu 10% bei bis zu 2,5 cm Durchmesser, über 10% bei > 2,5 cm Durchmesser) [2]. Ein kolorektales Karzinom liegt nach WHO (World Health Organisation) Klassifikation dann vor, wenn die Lamina muskularis mucosae von Tumorzellen durchbrochen wurde. Prä-maligne und maligne Veränderungen besitzen eine Reihe von DNA-Veränderungen. In Kolonepithelzellen kann es zu einer Mutation des APC-Genes (adenomatous polyposis coli gen) auf Chromosom 5q21 kommen, was zum Funktionsverlust dieses Tumorsuppressorgens führen kann [3]. Bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) ist diese Mutation vererbt [4]. Außerdem ist eine Mutation des K-ras proto-Onkogens möglich [5]. Durch eine Deletion auf dem Chromosom 18 (18q21) mit Inaktivierung von DCC (deleted in colon cancer) entsteht eine weitere Mutation in einem Tumorsuppressorgen [6]. Der entscheidende Übergang zum Karzinom ist die Mutation des Tumorsuppressorgens p53, welches den Zellzyklus und die Apoptose reguliert. Im Falle eines Funktionsverlustes von p53 kommt es zu einer unkontrollierten Proliferation und somit zu einer stetigen Vermehrung der Tumorzellmasse [7]. Damit scheinen eine Onkogen-Aktivierung und ein Allelverlust von Genen, die die Tumorentstehung unterdrücken, an der Entstehung der Adenom-Karzinom-Sequenz beteiligt zu sein [6, 8]. Nur ca. 10-15% der kolorektalen Karzinome haben eine erbliche Disposition. Risikofaktoren für die Entstehung kolorektaler Karzinome sind wahrscheinlich ein niedriger Anteil von pflanzlichen Fasern und ein hoher Anteil tierische Fette in der Nahrung [9, 10]. Rauchen und Alkoholkonsum erhöhen ebenfalls das Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken. Ebenso haben Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (insbesondere Colitis ulcerosa) ein höheres Risiko ein kolorektales Karzinom zu entwickeln [11-13].

---

## 1.2 Tumor-Escape-Mechanismen

Damit überhaupt eine Tumorerkrankung entsteht, müssen die Tumorzellen intrinsische und extrinsische (immunologische) Barrieren überwinden. Das heißt, sie müssen nicht nur die Antwort des Immunsystems umgehen [14], sondern müssen auch ein unbegrenztes Replikationspotential besitzen [15]. Bereits 1909 postulierte Paul Ehrlich, dass das Immunsystem in der Lage sein muß, Tumoren zu erkennen und zu eliminieren [16]. Inzwischen gilt es als gesichert, dass das Immunsystem tatsächlich in der Lage ist Tumorzellen aufzuspüren und zu zerstören [17, 18]. So haben beispielsweise immungeschwächte Patienten ein höheres Risiko eine maligne Erkrankung zu entwickeln [19]. Es gibt Hinweise dafür, dass die meisten Patienten mit kolorektalem Karzinom keine adäquate immunologische Anti-Tumor-Antwort entwickeln, da bereits die Frühstadien der Tumoren Strategien entwickeln, die Immunantwort zu umgehen [20]. Dieses Phänomen der Escape-Mechanismen von Tumorzellen tritt in der Erforschung zunehmend in den Vordergrund. Von Escape-Phänomenen spricht man, wenn es den Tumorzellen gelingt, sich dem Angriff des Immunsystems zu entziehen [21-23]. Ein Escape-Mechanismus von Tumorzellen besteht darin, dem programmierten Zelltod (Apoptose) durch körpereigene Abwehrzellen zu entgehen. Durch die Interaktion zwischen Immunabwehr und Tumor-Escape wird der Tumor entweder im Frühstadium durch das Immunsystem eliminiert oder es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Tumorwachstum und Immunabwehr ein (Äquilibrium). Durch Expression immunsuppressiver Zytokine als einen weiteren Escape-Mechanismus gelingt es Tumorzellen häufig, das Immunsystem in seiner Anti-Tumor-Aktivität negativ zu beeinflussen [14]. Gegen diese Escape-Phänomene bleibt die herkömmliche Medizin mit Strahlen- und Chemotherapie häufig wirkungslos, da es Tumorzellen geschafft haben, im Laufe der Behandlung gegen Strahlen- und Chemotherapie zahlreiche Abwehrmechanismen zu entwickeln. Diese Fähigkeiten kommen nur zustande, wenn es den Tumorzellen gelingt, die Immunkompetenz des menschlichen Organismus zu umgehen. Daher stehen sowohl die Analyse

des Immunstatus, als auch die Erforschung tumorspezifischer Rezeptoren im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses, um gerade die Escape-Phänomene rechtzeitig zu erkennen.

### **1.3 Tumor-Escape-Mechanismen durch TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1) Expression beim kolorektalen Karzinom**

Während der Tumorprogression erwerben Tumorzellen immer weitere Tumor-Escape-Mechanismen, die es ermöglichen, die immunologische Überwachung des Körpers zu umgehen. Zytokin-induzierte Apoptose ist ein wichtiger Mechanismus dieser Escape-Mechanismen von Tumorzellen. Zytokine sind Botensubstanzen, die vom Immunsystem freigesetzt werden, um die Immunreaktion zu beeinflussen. Jedoch sind auch Tumorzellen in der Lage, diese Botenstoffe freizusetzen. Zytokine besitzen autokrine und parakrine Funktionen, so dass sie in der Lage sind sowohl lokal als auch systemisch zu wirken, um die Immunität zu verbessern oder zu unterdrücken. Die meisten Patienten mit kolorektalem Karzinom entwickeln keine adäquate immunologische Anti-Tumor-Antwort [20].

Obwohl zahlreiche Studien unser Verständnis über Tumorinitiation und Progression verbesserten, bleiben viele Fragen wie das Phänomen einer zunehmend ineffektiven Anti-Tumor-Antwort unbeantwortet [24, 25]. Gerade die Mechanismen im Hinblick auf eine therapeutische Modulation des Immunsystems, das Verständnis von tumorspezifischen Immunantworten und Mechanismen, die zu Aktivierung oder Unterdrückung des Immunsystems führen, sind von besonderem wissenschaftlichem Interesse. In dieser Hinsicht wird vermutet, dass sich die Tumorprogression immunkompetenter Personen durch unterlassene Erkennung von Tumorantigenen durch das Immunsystems oder durch Subversion von Anti-Tumor-Antworten ergeben kann [26, 27]. Angeborene und adaptive Immunantworten können durch CD4+ T-Helferzellen und CD8+ zytotoxische T-Zellen (CTL) induziert werden, die Zytokine wie Interferon (IFN)-gamma exprimieren und so zu einer effektiven Anti-Tumor-Antworten führen. Obwohl T-Zellen die Hauptzellpopulation bilden, bleibt eine effektive Immunantwort durch sie häufig unvermittelt. Unsere

---

bisherigen Studienergebnisse lassen Apoptoseinduktion CD8<sup>+</sup> tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) durch Zytokinexpression kolorektaler Tumorzellen vermuten. Dies scheint ein entscheidender Tumor-Escape-Mechanismus zu sein [26, 28]. Apoptose wird entweder von innen durch primär intrazelluläre Mechanismen oder von außen durch rezeptorvermittelte Signalverarbeitung eingeleitet [29]. Alle proapoptotisch wirksamen Vorgänge münden schließlich in die Aktivierung von Caspasen (Cysteiny-Aspartasen). Caspasen sind Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein enthalten und Proteine hinter der Aminosäure Aspartat schneiden [30] und den Zelltod vermitteln.

TNF- $\alpha$  ist ein Zytokin der TNF-Familie mit verschiedenen Rezeptoren, kann Apoptose induzieren und somit zur Tumorprogression des kolorektalen Karzinoms führen [31]. TNF- $\alpha$  wird sowohl von Makrophagen, als auch Tumorzellen produziert und entfaltet seine Wirkungen durch Bindung an hochspezifische Rezeptoren. Neben Apoptoseinduktion kann TNF- $\alpha$  in geringen Konzentrationen auch das Tumorwachstum fördern [32, 33]. Mit zunehmender Tumorprogression verlieren Tumorzellen des kolorektalen Karzinoms zunehmend apoptotische Fähigkeiten [34]. Ergebnisse einer vorherigen Studie konnten einen erhöhten Serumspiegel von TNF- $\alpha$  (Zytokinmessungen) im Serum von Patienten mit kolorektalem Karzinom zeigen, der offensichtlich eine potentielle Rolle bei Tumorprogression [26] zu haben scheint [26]. Die Signaltransduktion von TNF- $\alpha$  als Ligand wird durch zwei Rezeptoren vermittelt [35]. Obwohl die Affinität von TNF- $\alpha$  zum TNF Rezeptor 2 (TNF-R2) fünfmal höher ist als die Affinität für TNF-R1 [36], vermittelt TNF-R1 die Mehrzahl der biologischen Effekte durch TNF- $\alpha$ . TNF-R1 kann von allen Zelltypen exprimiert werden, wohingegen sich die Expression von TNF-R2 hauptsächlich auf Immunzellen beschränkt [37]. Der größere Unterschied zwischen den zwei Rezeptoren ist die Todesdomäne (DD) von TNF-R1, die nicht von TNF-R2 aktiviert wird. Daher stellt der TNF-R1 ein wichtiges Mitglied der Todesrezeptorfamilie dar, den apoptotischen Zelltod zu induzieren [38]. Aus diesem Grund konzentrierte sich die Untersuchung auf TNF-R1 als potentiellen Tumor-Escape Mechanismus.



Außer der Fähigkeit der Apoptoseinduktion vermittelt der TNF-R1 auch Entzündungsreaktionen (Synthese proinflammatorischer Zytokine), die ebenfalls zur Tumorprogression beitragen können, jedoch nicht Gegenstand der aktuellen Untersuchung sind [34]. Obwohl die Signalkaskade der TNF-Rs bisher gut analysiert wurde, wird dessen Regulierung bis heute noch nicht vollständig verstanden [39, 40].

Die klinische Bedeutung der TNF- $\alpha$  Expression kolorektaler Tumorzellen und mögliche Auswirkungen auf die zelluläre Immunabwehr einer effektiven Anti-Tumor-Antwort sind bislang jedoch ungeklärt.

#### **1.4 Ziele und Fragestellungen**

Ziel der Studie war daher die Untersuchung der TNF- $\alpha$  Expression durch Protein- und Genexpressionsanalyse in Tumorproben von Patienten mit kolorektalem Karzinom. Darüber hinaus wurden die klinischen Charakteristika (klinisch-pathologische Parameter) der Studienpopulation mit der immunhistochemischen Analyse (Proteinanalyse) assoziiert. Hieraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Welche Bedeutung hat die TNF- $\alpha$  Expression durch Tumorzellen des kolorektalen Karzinoms?
2. Welche Bedeutung besitzt die Analyse tumor-infiltrierender Lymphozyten (TILs)?
3. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Expression von TNF- $\alpha$  beim kolorektalen Karzinom und dem Überleben der Patienten?
4. Welche Schlussfolgerungen ergeben sich aus der Analyse der TNF- $\alpha$  Expression für die klinische Praxis bei Tumorpatienten?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patienten**

Die Studie erfasst ein Kollektiv von insgesamt 104 Patienten mit histologisch bestätigtem kolorektalem Karzinom, die zwischen 2001 und 2005 in der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie der Julius-Maximilian-Universität Würzburg behandelt wurden (Tabelle 3). Das gleiche Patientenkollektiv ist die Studienpopulation einer früheren Arbeit zum Thema prädiktiver Biomarker [41]. Die histologische Einteilung wurde entsprechend der 6. Auflage der Union International Contere le Cancer – TNM Klassifikation bestimmt [42, 43]. Das Kollektiv umfasste R0-resezierte Patienten, der Stadien I-IV nach UICC (Dukes A-D), die mit kurativer Absicht operiert wurden. Die Tumoren wurden nach Lokalisation, Infiltrationstiefe und Differenzierungsgrad klassifiziert [42, 43]. Alter, Geschlecht und Lymphknotenmetastasierung wurden ebenfalls in der Datenbank für diese Arbeit dokumentiert. Die mittlere Nachbehandlungszeit betrug 32 Monate. Die Tumorproben, wie auch das normale Gewebe, wurden mit Einverständniserklärung der Patienten sofort nach chirurgischer Resektion gesammelt, in flüssigem Stickstoff eingefroren, bei -80°C aufbewahrt oder in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE) bis sie analysiert wurden.

### **2.2 Immunhistochemie (IHC) und Immunfluoreszenz (IF)**

Die Immunhistochemie und die Immunfluoreszenz sind Techniken zum Sichtbarmachen bestimmter Zell- oder Gewebestandteile (Antigene) durch Antigen-Antikörper-Reaktionen. Dabei wird zunächst ein Primärantikörper appliziert, welcher spezifisch an das zu detektierende Antigen bindet. Dann wird ein gegen diesen Primärantikörper gerichteter, mit Meerrettichperoxidase (HRP, von engl. Horseradish) gekoppelter Sekundärantikörper inkubiert. Mit Hilfe des gekoppelten Enzymes, wird abschließend das zugegebene Chromogen in einen sichtbaren braunen Farbstoff umgesetzt. Alternativ besteht die Möglichkeit den Sekundärantikörper auch mit einem Fluorochrom zu koppeln.

Das exakte Vorgehen ist im Folgenden für die Immunfluoreszenz kurz erläutert. Die seriellen Gefrierschnitte (5 µm) wurden auf Objektträger aufgebracht, 10 Minuten in

Aceton fixiert und dann 5 Minuten getrocknet. Anschließend wurden die Objektträger mit dem Primärantikörper oder dem Kontrollantikörper, verdünnt mit TBS plus 0,5% Rinderserum albumin (BSA) über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Darauf folgten 30 Minuten Inkubation mit dem FITC-konjugierten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur in einer befeuchteten Kammer. Danach wurde die weitere Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper über Nacht bei 4°C, sowie die Inkubation mit dem zweiten Cy3-konjugierten Sekundärantikörper vorgenommen. Die Schnitte wurden mit DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) gegengefärbt und mit Polyvinylalkohol mounting medium (DABCO) (Sigma-Aldrich) eingedeckt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Zeiss Mikroskops (Jena, Deutschland).

Bei der Immunhistochemie an Gefrierschnitten (65 Patienten) erfolgte die Vorbehandlung (Fixierung) genauso wie bereits für die Immunfluoreszenz beschrieben. Die endogene Peroxidase wurde mit 0,3%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung blockiert (Dako). Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde ein HRP-konjugierter affinitätsgereinigter Esel Anti-Maus oder Esel Anti-Kaninchen IgG Antikörper appliziert (Tabelle 2). Die Schnitte wurden anschließend 5 Minuten mit DAB (3,3'-diaminobenzidine) (Biogenex, San Ramon, USA) inkubiert, mit Haemalaun gegengefärbt und mit Glycergel (Dako, Hamburg, Deutschland) eingedeckt. Paraffinschnitte (39 Patienten) wurden auf silanisierte Objektträger gezogen (5 µm), mit Xylol (J.T. Baker, Deventer Niederlande) entparaffiniert (2x15 Minuten) und durch eine absteigende Alkoholreihe rehydratisiert (100% Ethanol 2x10 Minuten, 95% Ethanol 2x10 Minuten, 70% Ethanol 2x10 Minuten, Aqua dest 1x5 Minuten, Pufferlösung 1x5 Minuten). Das Demaskieren der Antigene erfolgte im Dampfdrucktopf (1x8 Minuten) mit Citratpuffer (Dako) entsprechend den Herstellerangaben.

Alle Tumoren waren positiv für Cytokeratin-20 (CK-20) und negativ für Cytokeratin-7 (CK-7), ein immunhistochemisches Färbemuster welches als charakteristisch für kolorektale Karzinome angesehen wird [44].

**Tabelle 2: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die Immunhistologie.**

Zielprotein	Herkunft	Verdünnung	Firma
TNF- $\alpha$ (1)	Maus	1:50	R&D systems (Wiesbaden-Nordenstadt, Germany)
TNF- $\alpha$ (2)	Maus	1:100	Pharmingen (Heidelberg, Germany)
TNF-R1	Kaninchen	1:80	Abcam (Cambridge, UK)
CD8	Maus	1:50	Dako (Hamburg, Germany)
CK-20	Maus	1:100	Dako (Hamburg, Germany)
CK-7	Maus	1:50	Dako (Hamburg, Germany)
Isotyp-Kontrollantikörper	Maus, Kaninchen	1:50	eBioscience (San Diego, USA)
Sekundärantikörper-HRP	Esel	1:100	Jackson ImmunoResearch laboratories Inc. (Suffolk, England)
Sekundärantikörper-FITC	Esel	1:200	Jackson ImmunoResearch laboratories Inc. (Suffolk, England)
Sekundärantikörper-Cy3	Esel	1:200	Jackson ImmunoResearch laboratories Inc. (Suffolk, England)

### 2.3 Quantifizierung der Immunhistochemie

Die quantitative Auswertung der TNF-Markierung kolorektaler Tumorzellen wurde für jeden Patienten in sechs definierten, für den Gewebeschnitt repräsentativen Vergrößerungsfeldern („high-power fields“,  $\times 400$ ) durchgeführt. Nach Auszählen positiver Tumorzellen aller Vergrößerungsfelder wurde das Ergebnis als Prozentsatz ermittelt.

Das Ergebnis der Auszählung in repräsentativen Vergrößerungsfeldern wurde ebenfalls von einem weiteren unabhängigen Untersucher ermittelt. Neben dem Kendall´s tau ( $\tau$ ) Korrelationskoeffizient, wurde der Intraclass Korrelationskoeffizient (ICC) analysiert, der ein Maß für die Zuverlässigkeit von Messungen oder Einschätzungen darstellt [45]. Zu diesem Zweck wurde zunächst zwischen zwei Studienmodellen unterschieden. Die quantitative Auswertung der TNF-Markierung wurde zunächst ein zweites Mal von demselben Untersucher ermittelt und als nächstes von einer weiteren Person. In

beiden Modellen war der ICC stets als ein Maß für die Übereinstimmung zu interpretieren, weil systematische Differenzen für relevant gehalten wurden.

## **2.4 Real time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)**

Mit der Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) lassen sich geringste Mengen von kurzen, genau definierten Teilen eines DNA-Stranges vervielfältigen. Durch Erhitzen wird der DNA-Doppelstrang denaturiert, dann mit zwei Primern, welche die gesuchte Sequenz definierten, hybridisiert und durch das hitzestabile Enzym DNA-Polymerase verdoppelt. Die PCR findet in einem Thermocycler statt, der die Proben präzise auf die für den jeweiligen Schritt benötigte Temperatur erhitzt oder abkühlt. Ein Zyklus besteht aus drei Schritten: 1. Denaturierung der DNA (95°C), 2. Anlagerung der Primer bei primerabhängiger Hybridisierungstemperatur (50-65°C), 3. DNA-Polymerisation (72°C). Bei jedem Zyklus verdoppelt sich die Anzahl der DNA-Moleküle. Die Real Time PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR und ermöglicht zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu.

Um die Genexpression von TNF- $\alpha$  durch RT-PCR zu analysieren, wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des RNeasy Minikits (Qiagen, Hilden) aus 31 Geweben (Gefrierschnitte) extrahiert und entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Primer-Paare wurden durch Primer-Sets von Qiagen (Hilden) gestellt. Die optimale Primer-Konzentration wurde durch Titration bestimmt. Als Kontrolle wurde cDNA von humanem Normalgewebe (Kolon) der Firma Pharmingen (Heidelberg, Deutschland) herangezogen. Ein Referenzgen (engl. housekeeping gene, nicht-reguliertes Gen, konstitutiv exprimiertes Gen) ist ein Gen, welches unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert wird. Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) oder  $\beta$ -Actin wurden daher für die relative Quantifizierung und cDNA Qualitätskontrolle verwendet. Alle PCR Reaktionen wurden mit dem Opticon 2 System (MJ Research, Biozym, Oldendorf, Deutschland) durchgeführt. Die Reverse Transkription von RNA in cDNA wurde mit Hilfe von iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad, Hercules, CA) ausgeführt. Jede PCR-Reaktion wurde mit 23 $\mu$ l Volumen durchgeführt,

bestehend aus 11,5µl LightCycler-DNA Master SYBR Green I mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland), 10pmol/µl Forward Primer, 10pmol/µl Reverse Primer, 3µl template DNA und 7,5µl RNase freiem Wasser. Der initialen Denaturierung bei 95°C für 15 Minuten folgten 39 Zyklen bestehend aus einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 15 Sekunden, einem Kühlungsschritt bei 57,5°C für 30 Sekunden und einem Erweiterungsschritt bei 72°C für 30 Sekunden. Um die Spezifität zu bestätigen, wurden die PCR Produkte von jedem Primer-Paar einer Schmelzkurvenanalyse unterzogen. Die Quantifizierung wurden mit der LightCycle Analysesoftware durchgeführt. Die Reproduzierbarkeit wurde durch eine zweite unabhängige PCR bewiesen. Um immer am Anfang der exponentiellen Vermehrung zu messen, wurde der Ct-Wert (engl. Cycle Threshold für Schwellenwert-Zyklus) verwendet, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Es wurde die Differenz ( $\Delta\text{Ct}$ ) zwischen durchschnittlichen Ct-Werten der Proben mit den Zielgenen und jenen des Haushaltgenes GAPDH oder  $\beta$ -Actin ermittelt, gefolgt von der Berechnung der Differenz zwischen den Durchschnitts  $\Delta\text{Ct}$ -Werten der Tumورproben für jedes Zielgen und dem  $\Delta\text{Ct}$ -Wert der Normalgewebe für dieses Zielgen ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ ). Der relative Quantifizierungswert, die relative „fold-differenz“ „x-fache Differenz“ zum Normalgewebe (Mittelwert) wurde angegeben als  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . Die Berechnung der Expression des Zielgens wird also relativ zum Normalgewebe angegeben (=relative Quantifizierung) und nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{FD} = 2^{[(\text{Ct Marker in Normgewebe} - \text{Ct GapDH in Normalgewebe}) - (\text{Ct Marker im Tumorgewebe} - \text{Ct GapDH im Tumorgewebe})]}$$

$$\text{FD} = 2^{[\text{Ct}(\text{Normalgewebe}) - \text{Ct}(\text{Tumor})]}$$

## 2.5 Statistische Analysen

Die statistische Analyse wurde durch die MedCalc Software (Mariakerke, Belgien) ermittelt. Alle Werte wurden als Median  $\pm$  Interquartil Range (IQR) dargestellt, da der D'Agostino-Pearson Test keine Normalverteilung der Daten für die Gen- und Proteinanalyse ergab. Die Überlebenszeit wurde als die Zeit von der Tumorresektion bis zum Wiederauftreten einer tumorbedingten Erkrankung (Metastasierung/Rückfall/Tod) bestimmt. Die allgemeine Überlebensrate in Bezug auf die quantitative Auswertung der TNF-Markierung kolorektaler Tumorzellen wurde univariat mit der Kaplan-Meier Methode ermittelt [46]. Der Median (Teilungskriterium der dichotomen Variablen) aller TNF- $\alpha$

positiven Gewebeproben lag bei 26% (cut-off Wert). Der cut-off Wert TNF- $\alpha$  positiver, versus TNF- $\alpha$  negativer Gewebeproben wurde auf 10% festgelegt. Zur Analyse der Signifikanz bei univariater Analyse der TNF- $\alpha$  Markierung kolorektaler Tumorzellen und der klinischen Parameter wurde die Log-Rank-Teststatistik verwendet. Die Multivariate Analyse aller Faktoren, die signifikante Unterschiede bei univariater Analyse ergaben, wurde durch das Cox-Hazard-Modell analysiert [47]. Um Assoziationen oder Unterschiede der quantitativen Auswertung TNF- $\alpha$  markierter kolorektaler Tumorzellen und klinischen Merkmalen zu analysieren, wurde der Chi-Quadrat-Vierfeldertest durchgeführt. Falls die Voraussetzungen hierfür nicht erfüllt waren (z.B. wegen zu kleiner Stichprobengröße) wurde der exakte Fisher-Test (Fisher-Yates-Test, exakter Chi-Quadrat-Test) verwendet.

Unterschiede auf Signifikanz der Daten wurden mit Hilfe des nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Tests analysiert. P-Werte  $< 0,05$  wurden statistisch als statistisch signifikant angesehen. Die Korrelation der quantifizierten immunhistochemischen Daten und der RT-PCR Analyse wurde mittels des nicht-parametrischen Kendall's tau ( $\tau$ ) Korrelationskoeffizient durchgeführt, weil dieser Koeffizient keine lineare Beziehung zwischen beiden Methoden/Variablen voraussetzt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Intra- and Interobserver-Reliabilität

Um die Zuverlässigkeit der Auswertung zu beurteilen, wurde in Vorversuchen die Intra- and Interobserver-Reliabilität überprüft. Hierbei wurde ein hohes Maß an Korrelationen und Zuverlässigkeit zwischen der ersten und der zweiten Auswertung eines Untersuchers ermittelt (Intraobserver-Reliabilität, TNF- $\alpha$  Expression:  $\tau = 0.812$ ,  $p < 0.0001$ , 95% Konfidenzintervall (KI) 0.742 - 0.866; ICC = 0.9804, 95% KI 0.9700 - 0.9870). Ein hohes Maß an Korrelationen und Zuverlässigkeit der Auswertung konnte auch zwischen zwei Untersuchern analysiert werden (Interobserver-Reliabilität, TNF- $\alpha$  expression:  $\tau = 0.9593$ ,  $p < 0.0001$ , 95% KI 0.9404 - 0.9722; ICC = 0.9777; 95% KI 0.9672 - 0.9849).

#### 3.2 TNF- $\alpha$ Expression kolorektaler Tumorzellen wird mit Tumorprogression assoziiert

TNF- $\alpha$  wurde nicht von Normalgewebe der Kolonschleimhaut exprimiert und konnte nur vereinzelt bei Stromazellen nachgewiesen werden. Tumorzellen zeigten hingegen eine starke Expression von TNF- $\alpha$  und wurde bei 94% der Patienten nachgewiesen. Die Positivkontrolle der TNF- $\alpha$  Expression einer kolorektalen Tumorzelllinie (HT-29) wies 78 % positive Tumorzellen auf.

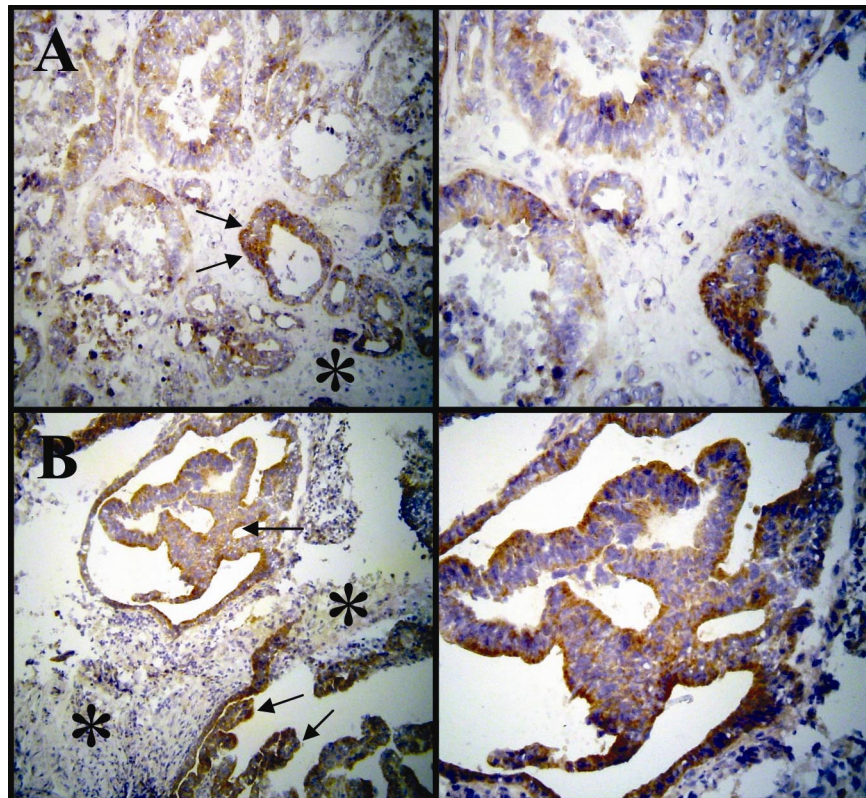
Der Anteil aller positiven Tumorzellen in frühen (UICC I/II) und fortgeschrittenen (UICC III/IV) Tumorstadien wurde außerdem ermittelt. Verglichen mit niedrigen (UICC I/II) Tumorstadien ( $n=46$ , Median 15%, IQR 8% - 33%; 95% KI 13% - 20%) war die TNF- $\alpha$  Expression in fortgeschrittenen (UICC III/IV) Tumorstadien ( $n=58$ , Median 30%, IQR 28% - 34%; 95% CI 28% - 32%;  $p < 0.0001$ ; Tabelle 3) signifikant überexprimiert. Abbildungen 1A and 1B zeigen representative Beispiele der TNF- $\alpha$  Expression in frühen (UICC I/II) und fortgeschrittenen (UICC III/IV) Tumorstadien.



Tabelle 3: Eigenschaften der Studienpopulation in Abhängigkeit von der TNF- $\alpha$  Expression durch Tumorzellen.

Eigenschaften	Patienten (n = 104)	TNF- $\alpha$ Expression* (Tumorzellen)		p-Wert
		gering (<26%)	hoch ( $\geq$ 26%)	
Alter (Jahre)				.257
<63	26 (25%)	10 (38%)	16 (62%)	
$\geq$ 63	78 (75%)	42 (54%)	36 (46%)	
Geschlecht				.841
männlich	62 (60%)	32 (52%)	30 (48%)	
weiblich	42 (40%)	20 (48%)	22 (52%)	
Primärtumor				1.0
Kolon	41 (39%)	21 (51%)	20 (49%)	
Rektum	63 (61%)	31 (49%)	32 (51%)	
Grading				<0.001
G1	19 (18%)	16 (84%)	3 (16%)	
G2	48 (46%)	27 (56%)	21 (44%)	
G3/4	37 (36%)	9 (34%)	28 (76%)	
Tiefeninvasion				.045
pT1	23 (22%)	15 (65%)	8 (35%)	
pT2	38 (37%)	21 (55%)	17 (45%)	
pT3	27 (26%)	11 (41%)	16 (59%)	
pT4	16 (15%)	5 (31%)	11 (69%)	
Lymphknotenmetastasierung				.003
pN0	50 (48%)	33 (66%)	17 (34%)	
pN1-3	54 (52%)	19 (35%)	35 (65%)	
UICC Stadium				<0.001
UICC I	22 (21%)	17 (77%)	5 (23%)	
UICC II	24 (23%)	15 (63%)	9 (37%)	
UICC III	42 (40%)	14 (33%)	28 (67%)	
UICC IV	16 (15%)	6 (37%)	10 (63%)	
Median OS (M)	31.5 m	48 (n=52)	17.5 (n=52)	

\*Cut-off Wert; G, grading; UICC, International Union against Cancer; R, Residualtumor; OS, overall survival; M, Monate.

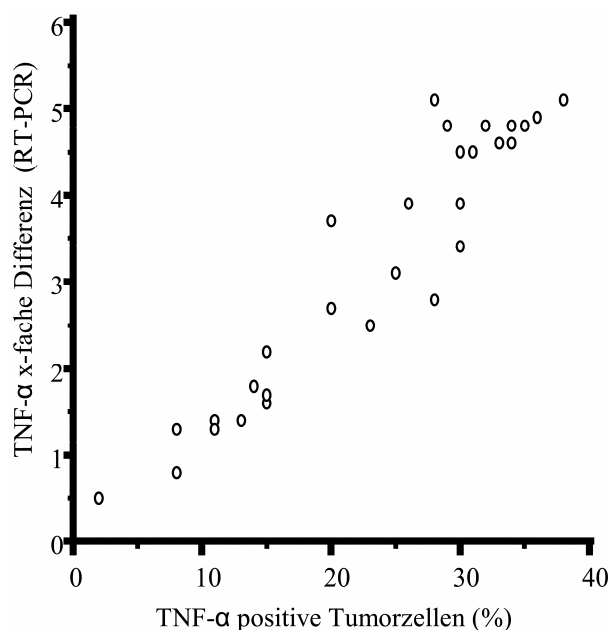


**Abbildung 1: Immunhistochemische Analyse der TNF- $\alpha$  Expression in Gewebeproben von Patienten mit kolorektalem Karzinom.** Die TNF- $\alpha$  Expression steigt im Verlauf der Tumorprogression. Verglichen mit frühen Tumorstadien (UICC I/II, A) wird eine signifikant erhöhte Expression von TNF- $\alpha$  in Proben späterer Tumorstadien (UICC III/IV, B) ( $p < 0,0001$ ) beobachtet. Braune Zellen sind TNF- $\alpha$ -positive Tumorzellen, die blaue Färbung entspricht der Haemalaun Kerngegenfärbung. Linkes Bild 100-fache Vergrößerung, rechtes Bild 200-fache Vergrößerung. Die Sterchen kennzeichnen desmoplastisches Stromagewebe (Stromazellen, TILs) ohne Hinweis auf TNF- $\alpha$  Expression.

### 3.3 Korrelation der TNF- $\alpha$ Protein- und Genexpression

Um die Expressionsanalyse der immunhistochemischen Auswertung von TNF- $\alpha$  zu bestätigen, wurde eine Genexpressionsanalyse von 31 Fällen kolorektaler Karzinome mit der Proteinexpression korreliert. Verglichen mit niedrigen (UICC I/II) Tumorstadien ( $n=14$ , Median 1.70 fache Differenz gegenüber Normalgewebe, IQR 0.54 – 4.49; 95% KI 1.30 bis 3.43) war die TNF- $\alpha$  Expression in fortgeschrittenen (UICC III/IV) Tumorstadien ( $n=17$ , Median 4.60 fache Differenz gegenüber Normalgewebe, IQR 2.16 – 5.10; 95% KI 3.91 bis 4.80;  $p < 0.0001$ ) signifikant hochreguliert. Eine starke Korrelation zwischen der TNF- $\alpha$  Protein- und Genexpression ( $\tau = 0.794$ , Abbildung 2)

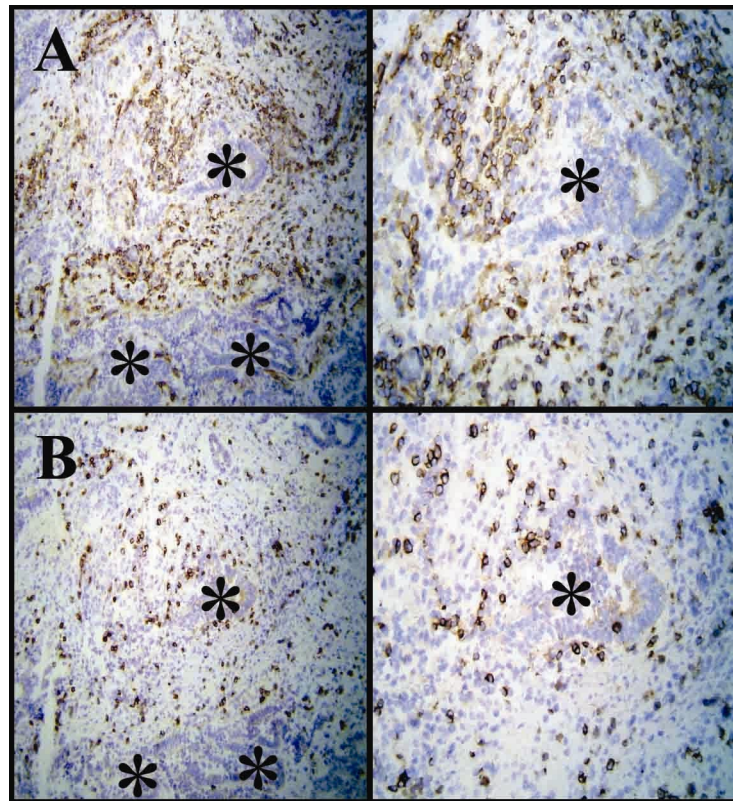
konnte analysiert werden. Die Ergebnisse bestätigten eine erhöhte TNF- $\alpha$  Expression kolorektaler Tumorzellen bei Tumorprogression.



**Abbildung 2: Korrelationsanalyse der TNF- $\alpha$  Protein- und Genexpression:** die TNF- $\alpha$  Protein- und Genexpression zeigt eine mäßig starke positive Korrelation der 31 untersuchten Tumorproben ( $\tau=0.794$ ).

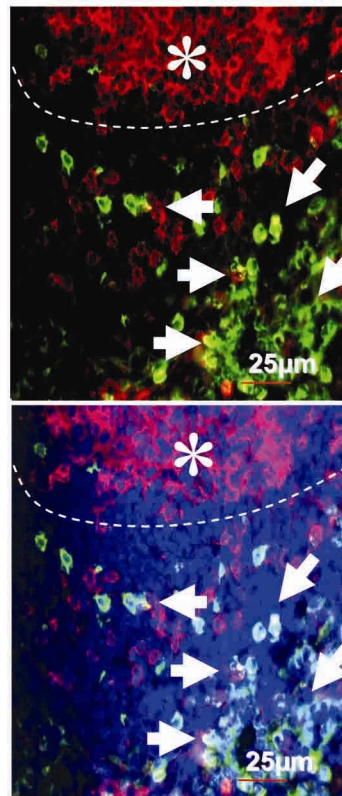
### 3.4 TNF-R1 Expression ist verstärkt auf CD8+ tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) nachzuweisen

In einer Auswahl von 28 Gewebeproben kolorektaler Karzinome wurde auf CD8+ tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) eine erhöhte Expression des TNF-R1 nachgewiesen. Die Abbildungen 3A and 3B zeigen zunächst einen repräsentativen Ausschnitt eines Serienschnittes niedriger (UICC I/II) Tumorstadien mit CD8+ T-Zellen und TNF-R1+ Zellen im desmoplastischen Stroma. Eine Immunofluoreszenz Doppelmarkierung zeigt TNF- $\alpha$  exprimierende Tumorzellen in direkter Nachbarschaft zu TNF-R1+ tumor-infiltrierender Lymphozyten (Abbildung 4). Ein Großteil dieser TNF-R1+ tumor-infiltrierenden Lymphozyten weist einen CD8+ Phänotyp auf (Abbildung 5).

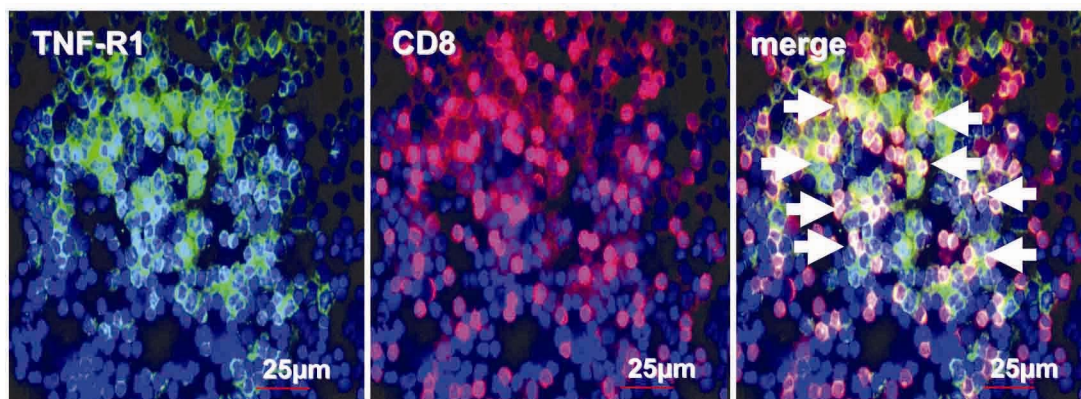


**Abbildung 3: Immunhistochemische Analyse CD8+ T-Zellen sowie TNF-R1 Expression (TILs) in Gewebeproben eines Patienten mit kolorektalem Karzinom (Serienschnitt).** Bereits in frühen Tumorstadien (UICC I/II) werden bei kolorektalen Karzinomen CD8+ T-Zellen (A) (TILs) und TNF-R1 Expression (TILs) beobachtet. Braune Zellen sind CD8+ T-Zellen oder TNF-R1 exprimierende TILs, die blaue Färbung entspricht der Haemalaun Kerngegenfärbung. Linkes Bild 100-fache Vergrößerung, rechtes Bild 200-fache Vergrößerung. Die Sterchen kennzeichnen Tumorgewebe (ohne Hinweis auf eine TNF-R1 Expression, unten, B).





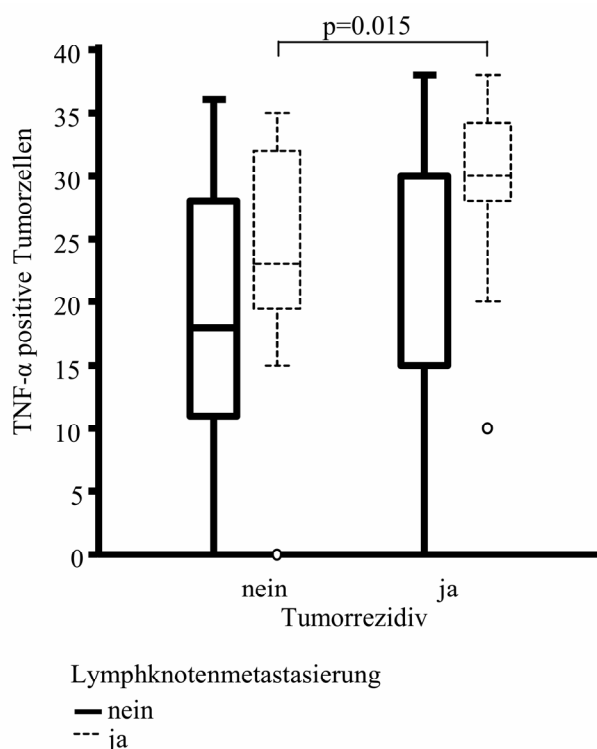
**Abbildung 4: Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung von TNF- $\alpha$  und TNF-R1 positiven Zellen.** Tumorzellen (Sternchen) exprimieren TNF- $\alpha$  bei gleichzeitigem Nachweis TNF-R1 positiver Zellen (TILs) in unmittelbarer Nachbarschaft (Pfeile). FITC (Fluoreszeinisothiocyanat), grün; Cy3, rot; DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid), blau (Kerngegenfärbung).



**Abbildung 5: Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung von TNF-R1 und CD8 positiven T-Zellen.** TNF-R1 positive TILs in direkter Nachbarschaft zu den Tumorzellen wurden als CD8 positive T-Zellen identifiziert (Pfeile). FITC (Fluoreszeinisothiocyanat), grün; Cy3, rot; DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid), blau (Kerngegenfärbung).

### 3.5 Eine hohe TNF- $\alpha$ Expression ist mit Tumorrezidiv und positivem Lymphknotenstatus assoziiert

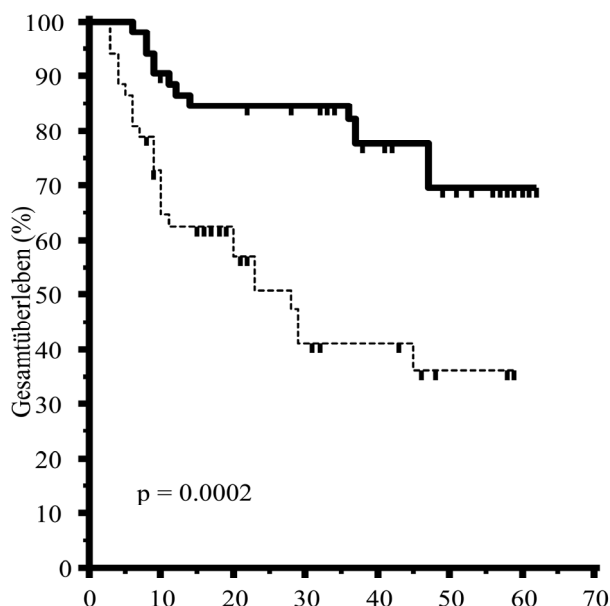
Die Analyse der TNF- $\alpha$  Expression mit weiteren klinischen Parametern assoziiert. Eine signifikant erhöhte TNF- $\alpha$  Expression bei Patienten mit Tumorrezidiv konnte - verglichen mit Patienten ohne Tumorrezidiv - analysiert werden (TNF- $\alpha$  Expression bei Patienten ohne Tumorrezidiv: n=63, Median 20%, IQR 10% - 33%; 95% KI 15% - 27%; TNF- $\alpha$  Expression bei Patienten mit Tumorrezidiv: n=41, Median 30%, IQR 15% - 35%; 95% KI 28% - 33%; p = 0.0002). Eine Subgruppenanalyse ergab eine signifikant erhöhte TNF- $\alpha$  Expression bei Patienten mit Tumorrezidiv und positivem Lymphknotenstatus (n=33, Median 30%, IQR 28% - 34%; 95% KI 29% - 34%) verglichen mit Patienten ohne Tumorrezidiv und positivem Lymphknotenstatus (n=21, Median 23%, IQR 20% - 32%; 95% KI 20% - 31%; p = 0.015; Abbildung 6). Keine Unterschiede hinsichtlich der TNF- $\alpha$  Expression ergaben sich beim Vergleich von Patienten mit und ohne Tumorrezidiv bei negativem Lymphknotenstatus.



**Abbildung 6: Assoziation erhöhter TNF- $\alpha$  Expression mit Tumorrezidiv.** Die Subgruppenanalyse zeigte eine signifikante Assoziation erhöhter TNF- $\alpha$  Expression bei Patienten mit Tumorrezidiv und positiver Lymphknotenmetastasierung gegenüber Patienten ohne Tumorrezidiv bei bereits vorhandenen Lymphknotenmetastastasen (p=0.015).

### 3.6 Prognostischer Wert der TNF- $\alpha$ Expression bei Patienten mit kolorektalem Karzinom

Um Unterschiede des Gesamtüberlebens nach erfolgreicher, kurativer R0 Resektion zu analysieren, wurden die Patienten zunächst in 2 Gruppen (Tumorrezidiv ja oder nein) unterteilt. Positiver Lymphknotenstatus (N+,  $p < 0.0001$ , Hazard Ratio (HR) = 0.1098, 95% KI = 0.05565 - 0.2167), fortgeschrittene Tiefeninvasion (pT3/4,  $p < 0.0001$ , HR = 0.1089, 95% KI = 0.05397 - 0.2199), Grading (G3/4,  $p < 0.0001$ , HR = 0.2418, 95% KI = 0.1157 - 0.5055) und hohe TNF- $\alpha$  Expression ( $x > 26\%$ ;  $n=52$ ,  $p = 0.0002$ , HR = 0.2835, 95% KI = 0.1476 - 0.5447) konnten mit signifikant schlechterem Überleben bei univariater Analyse aller Tumore assoziiert werden (Abbildung 7, Tabelle 3). Die multivariate Analyse ermittelt durch das Cox-Hazard-Modell zeigte positiven Lymphknotenstatus (N+), fortgeschrittene Tiefeninvasion (pT3/4), hohe TNF- $\alpha$  Expression ( $x \geq 26\%$ ), jedoch nicht das Grading (G3/4) als unabhängige prognostische Faktoren aller analysierten Tumore (N+: Exp (b) 6.4391; 95% KI von Exp (b) 2.6649 - 15.5585;  $p < 0.0001$ ; pT3/4: Exp (b) 3.8363; 95% KI von Exp (b) 1.8550 - 7.9341;  $p = 0.0003086$ ; hohe TNF- $\alpha$  expression: Exp (b) 3.1064; 95% KI von Exp (b) 1.4686 - 6.5705;  $p = 0.003174$ ).



**Abbildung 7: Kaplan-Meier Analyse:** Patienten mit niedriger TNF- $\alpha$  Expression durch kolorektale Tumorzellen überlebten signifikant länger als Patienten mit hoher TNF- $\alpha$  Expression ( $p=0,0002$ ). Vertikale Linien zeigen zensierte Fälle (Fälle gelten als zensiert, wenn sie bis zum Ende der Beobachtungszeit noch keinen Rückfall - Rezidiv/ tumorbedingter Tod erlitten haben). Abszisse zeigt Monate nach erfolgreicher R0-Resektion.

## 4 Diskussion

### **Welche Bedeutung hat die TNF- $\alpha$ Expression durch Tumorzellen des kolorektalen Karzinoms?**

Für Tumorinitiation und -progression müssen entartete Zellen Wege finden, um einer effektiven Anti-Tumor-Antwort zu entgehen. Tumorzellen haben in diesem Zusammenhang mehrere Escape-Mechanismen entwickelt. Ein Mechanismus ist die Expression des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  entarteter Tumorzellen. TNF- $\alpha$  ist in der Lage, das Tumorwachstum über die Induktion inflammatorischer Mediatoren (Zytokine, Chemokine) zu fördern oder möglicherweise Apoptose in TILs zu induzieren. TNF- $\alpha$  Expression durch Tumorzellen ermöglicht aber auch, sowohl autokrin als auch parakrin das Tumorwachstum zu fördern.

### **Welche Bedeutung besitzt die Analyse tumor-infiltrierender Lymphozyten (TILs)?**

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine TNF-R1 Expression CD8+ TILs bereits in der Frühphase der Tumorprogression (UICC I/II) in unmittelbarer Nachbarschaft des Tumors. Dies könnte auf zunehmende Apoptose CD8+ TILs durch das TNF- $\alpha$ -TNF-R1 System bei Tumorprogression hinweisen. Über diesen Signalweg ist eine Unterstützung des inflammatorischen Mikromilieus ebenfalls denkbar. Beide Mechanismen führen zum Wachstumsvorteil des Tumors und verhindern eine effektive Anti-Tumor-Antwort.

### **Besteht ein Zusammenhang zwischen der Expression von TNF- $\alpha$ beim kolorektalen Karzinom und dem Überleben der Patienten?**

In der vorliegenden Studie wurde bei der TNF- $\alpha$  Expression durch Tumorzellen ein deutlicher Unterschied hinsichtlich der Prognose bei Patienten mit kolorektalem Karzinom festgestellt. Die Patienten mit hoher TNF- $\alpha$  Expression



kolorektaler Tumorzellen hatten eine schlechtere Prognose als die Patienten mit niedriger TNF- $\alpha$  Expression. Die TNF- $\alpha$  Expression kolorektaler Tumorzellen hat somit prognostischer Wert und besitzt therapeutische Implikation.

**Welche Schlussfolgerungen ergeben sich aus der Analyse der TNF- $\alpha$  Expression für die klinische Praxis bei Tumorpatienten?**

Unter Betrachtung der eigenen Ergebnisse sowie bislang publizierter Studienergebnisse über das kolorektale Karzinom, könnten sich in Zukunft vielversprechende Behandlungswege ergeben. So gibt es beispielsweise Bemühungen, eine verstärkte Apoptose in den Tumorzellen durch die Applikation Apoptose-auslösender Zytokine zu induzieren. Es gibt bisher jedoch wegen extremer toxischer Nebenwirkungen keine Möglichkeit, TNF- $\alpha$  oder andere Apoptose-induzierende Medikamente in der Klinik zu verwenden. Unsere Studie liefert jedoch erstmalig die Assoziation erhöhter TNF- $\alpha$  Expression kolorektaler Tumorzellen bei Patienten mit Tumorrezidiv und positivem Lymphknotenstatus. Somit wäre der Ansatzpunkt einer Anti-TNF- $\alpha$ -Therapie bei Patienten mit fortgeschrittenem kolorektalem Karzinom denkbar. Die Möglichkeit über das TNF- $\alpha$ -TNF-R1 System in die Tumorprogression einzugreifen, stellt sich nach den gefundenen eigenen Ergebnissen zusammenfassend als eine vielversprechende Strategie dar. Die Verwendung dieser sogenannten Biologicals (z.B. Etanercept, Infliximab) bleibt jedoch unter dem Aspekt einer geringfügig erhöhten Lymphominzidenz gegenüber der Normalbevölkerung auch als kritisch zu bewerten.

In der vorliegenden Studie konzentrierte sich die Analyse auf die proinflammatorische Rolle der TNF- $\alpha$  Expression kolorektaler Tumorzellen bei Tumorprogression (Invasion, Metastasierung), sowie einer möglichen Apoptoseinduktion TNF-R1 exprimierender tumorinfiltrierender Lymphozyten (TILs) als potentiellen Tumor-Escape-Mechanismus.

Die Entwicklung von Tumoren wurde bereits vor 10 Jahren durch sechs zellphysiologische Veränderungen beschrieben, den sogenannten 'Hallmarks of cancer' [15, 48]. Diese könne als Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, Unempfindlichkeit gegenüber Antiwachstumssignalen, Resistenz gegenüber Apoptose, unbegrenztes Replikationspotential, Fähigkeit zur Angiogenese, sowie Fähigkeit zur Invasion und Metastasenbildung beschrieben werden. Zahlreiche klinische Studien und experimentelle Versuche geben Hinweise auf ein weiteres, siebtes 'Hallmark of cancer'. Eine chronische, persistierende Entzündungsreaktion kann mit zahlreichen, jedoch nicht allen Tumorentitäten in Verbindung gebracht werden [49, 50]. Bereits 1863 nahm Virchow eine chronische Entzündungsreaktion im Tumorgewebe an. Seine Hypothese basierte auf einer Gruppe von Irritationsfaktoren, die zusammen mit der initiierten Entzündungsreaktion das Zellwachstum stimuliert [51]. Proliferierende Zellen, wie Tumorzellen, erleiden DNA Schäden and mutagene Angriffe und proliferieren in einem entzündungsreichen, mit Wachstums- und Überlebensfaktoren angereicherten Gewebe, welches das Tumorwachstum stimulieren kann.

Der metastatische Prozess besteht aus abnehmender Tumoradhärenz, lokaler Invasion, Angiogenese, Überleben in der (Blut-) Zirkulation, Adhärenz an Endothelzellen und schließlich Proliferation in verschiedenen Organen. In jedem Schritt der Tumorinitiation und -progression sind kausale Moleküle identifiziert worden: diese schließen Adhäsionsmoleküle, verschiedene Wachstumsfaktoren, Matrixdegradierungsenzyme und Motilitätsfaktoren ein [52-54]. Der inflammatorische Stimulus durch die Signalwege des TNF- $\alpha$ -TNF-R1-Systems konnte bei diesen Prozessen als Mechanismus gezeigt werden. Die Ergebnisse einer erhöhten TNF- $\alpha$  Protein- und Genexpression bei Beteiligung an Tumorprogression und Metastasierung stimmen mit den Ergebnissen weiterer klinischer

Studien und experimentellen Ansätzen überein [55-62]. Unsere Analyse zeigt eine signifikant erhöhte TNF- $\alpha$  Expression bei Patienten mit Tumorrezidiv sowie bei Patienten mit Tumorrezidiven und positivem Lymphknotenstatus verglichen mit Patienten ohne Tumorrezidiv und positivem Lymphknotenstatus. Auf der Basis dieses Ergebnisses wird eine Beteiligung des TNF- $\alpha$ -TNF-R1-Systems bei Tumorezidiven sowie Metastasierung vermutet.

Der exakte Mechanismus der Metastasierung bleibt zwar unklar, jedoch werden in den letzten Jahren Schwerpunkte im Bereich der Erforschung dieses Gebiets gesetzt, da dies die Hauptursache der Tumorsterblichkeit bleibt. Die komplexe und hochselektive Kaskade der Metastasierung hängt nicht nur von den Tumorzelleigenschaften ab, sondern auch vom (entzündlichen) Mikromilieu in dem sie sich befinden. Dieses entzündliche Mikromilieu besteht aus proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren die ihrerseits wiederum den Metastasierungsprozess begünstigen [57, 63]. Unsere Ergebnisse erhöhter TNF- $\alpha$  Expression bei Patienten mit kolorektalem Karzinom stimmen mit diesen Erkenntnissen überein.

Im Verlaufe eines Entzündungsprozesses werden zahlreiche Proteine (Adhäsionsmoleküle, proinflammatorische Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren) exprimiert, die Immunzellen Migration ermöglichen [49-51, 64]. Tumore nutzen genau diese Mechanismen, Nachbarstrukturen zu infiltrieren. TNF- $\alpha$  ist ein sehr potentes proinflammatorisches Zytokin, das von Tumoren exprimiert werden kann und Signalkaskaden initiiert, die wiederum das entzündliche Mikromilieu begünstigen und den Metastasierungsprozess fördern [65-67]. In einem Tiermodell zur Erforschung von Lungenmetastasen beim malignen Melanom konnte dieser Prozess sehr deutlich gezeigt werden. Blockierung von TNF- $\alpha$  führte darüber hinaus zu einer signifikanten Reduktion von Lungenmetastasen [68]. Diese Analysen geben deutliche Hinweise auf die Beteiligung von TNF- $\alpha$  beim Metastasierungsprozess [69]. Die Ergebnisse unserer Studie bei Patienten mit kolorektalem Karzinom zeigen eine Assoziation erhöhter TNF- $\alpha$  Expression mit Tumorprogression und reduziertem tumorbedingtem Überleben. Diese TNF- $\alpha$  Expression konnte fast ausschließlich mit Tumorzellen in Verbindung gebracht werden und nicht mit TILs des

desmoplastischen Stromas, die möglicherweise eine effektive Anti-Tumor-Antwort einleiten könnten. Dies kann als ein effektiver Tumor-Escape-Mechanismus beschrieben werden [27]. Auf der Basis der Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung vermuten wir über den TNF- $\alpha$ /TNF-R1 Mechanismus eine apoptotische Depletion CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Eine effektive Anti-Tumor-Antwort kann so verhindert werden und führt zu einem Wachstumsvorteil des Tumors. Darüber hinaus können über diesen Mechanismus proinflammatorische Stimuli des entzündlichen Mikromileu gefördert werden, die ihrerseits den Metastasierungsprozess fördern und / oder zur Chemotaxis weiterer Immunzellen führen [40].

Ursprünglich wurde vermutet, dass TNF- $\alpha$  selbst zur erfolgreichen Anti-Tumor-Antwort zukünftiger Krebstherapien beitragen könne. Der therapeutische Einsatz diese Zytokins blieb jedoch auf Grund seiner toxischen Eigenschaften erfolglos und ungeeignet für die klinische Anwendung [70-73]. Daher hat der therapeutische Nutzen dieses Zytokins klare Beschränkungen und kann längerfristig sogar schädlich sein. Im Falle der Therapie des malignen Melanoms konnten hierbei sogar sehr resistente und aggressive Rezidive beobachtet werden [74].

Die Assoziation des Entzündungsprozesses mit Tumorprogression besteht heute zweifellos [49-51, 64], wobei dem Zytokin TNF- $\alpha$  eine Schlüsselrolle zugesprochen wird [34] und daher im Fokus neuer effektiver Anti-Tumor-Therapien steht. Therapeutisch werden Anti-TNF- $\alpha$ -Therapien bereits erfolgreich bei Patienten mit rheumatoiden Grunderkrankungen eingesetzt (rheumatoide Arthritis, rA) [75]. Andererseits ist dieses Zytokin auch bei einer effektiven Anti-Tumor-Antwort beteiligt und bei der Bekämpfung von Erkrankungen, vor allem auf die zelluläre Immunantwort angewiesen sind (z.B. Tuberkulose). Ein mögliches gering erhöhtes Lymphomrisiko gegenüber der Normalbevölkerung bei Anwendung von Anti-TNF- $\alpha$ -Therapien basierte nur auf wenigen Fällen und sollte durch weitere Studien bestätigt werden [76]. Weil TNF- $\alpha$  selbst nicht nur proinflammatorische Funktion besitzt sondern auch Tumorprogression und Metastasierung begünstigt, wurden diese Anti-TNF- $\alpha$ -Therapien als potentiell wirksam bei Tumorerkrankungen in Betracht gezogen

[33, 77-81]. Unter Berücksichtigung unserer Ergebnisse erhöhter TNF- $\alpha$  Expression bei Patienten mit Tumorrezidiv und positivem Lymphknotenstatus gehen wir von einem erhöhten Metastasierungsrisiko durch einen inflammatorischen Stimulus dieses Zytokins bei fortgeschrittenem kolorektalen Karzinom aus. Die proinflammatorische Rolle von TNF- $\alpha$  durch kolorektale Tumorzellen könnte ein Hinweis das siebte 'Hallmark of cancer' angesehen werden. Jedoch bleibt unter den diskutierten Aspekten der Einsatz einer Anti-TNF- $\alpha$ -Therapie durch Biologicals beim metastasierten kolorektalen Karzinom ein zweiseitiges Schwert.

Eine signifikante erhöhte TNF- $\alpha$  Protein- und Genexpression konnte in Gewebeproben kolorektaler Karzinome nachgewiesen werden, wobei eine mäßig starke Korrelation beider Analysemethoden ersichtlich war. Sowohl die immunhistochemische Analyse als auch die Genexpression durch RT-PCR konnten mit Tumorprogression assoziiert werden. TNF- $\alpha$  Expression kolorektaler Tumorzellen kann damit Multi-Step-Karzinogenese durch proinflammatorische Stimuli, als auch weitere potentielle Tumor-Escape-Mechanismen fördern, z.B. apoptotische Depletion CD8<sup>+</sup> TILs, die für eine effektive Anti-Tumor-Antwort benötigt werden. Die Ergebnisse dieser Studie erweitern unser Verständnis der Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms. Der Einsatz von Anti-TNF- $\alpha$ -Therapien beim metastasierten kolorektalen Karzinom könnte eine vielversprechende Option bei Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom und / oder Tumorrezidiv sein.

## 5 Zusammenfassung

Für Tumorprogression müssen entartete Zellen Wege finden, der effektiven immunologischen Anti-Tumor-Antwort durch den menschlichen Organismus zu entgehen. Tumorzellen haben dafür verschiedene, sogenannte Tumor-Escape-Mechanismen entwickelt. Gegenstand dieser Arbeit war in diesem Zusammenhang die Untersuchung des TNF- $\alpha$ -TNF-R1-Systems. Mit erhöhter Expression des Apoptose-induzierenden Zytokins TNF- $\alpha$  durch Tumorzellen, konnte ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben bei Patienten mit kolorektalem Karzinom beobachtet werden. Weiterhin konnten in unmittelbarer Umgebung TNF- $\alpha$  exprimierender Tumorzellen zahlreiche TNF-R1+/CD8+ Zellen gezeigt werden, die als Hinweis auf Apoptose tumor-infiltrierender Lymphozyten angesehen werden können. Dieser Weg kann als Escape-Mechanismus des Tumors verstanden werden. Die Verwendung potentieller Anti-TNF- $\alpha$ -Biologicals (z.B. Etanercept, Infliximab) beim metastasierten kolorektalen Karzinom bleibt jedoch unter dem Aspekt einer geringfügig erhöhten Lymphominzidenz gegenüber der Normalbevölkerung auch als kritisch zu bewerten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zusätzlichen Einblick in die Regulationsmechanismen, die verantwortlich für die Immunsuppression durch kolorektale Karzinome sein können. Diese basiswissenschaftlichen Erkenntnisse stellen eine mögliche Grundlage neuer Behandlungsmöglichkeiten metastasierter kolorektaler Karzinome dar, die weiter erforscht werden sollten.

## 6 Literaturverzeichnis

1. RKI, G.d.e.K.i.D.e.V.u., "Krebs in Deutschland". Broschüre, 2006. **5. Auflage.**
2. Hermanek, P., et al., The malignant potential of colorectal polyps--a new statistical approach. *Endoscopy*, 1983. **15**(1): p. 16-20.
3. Fodde, R., The APC gene in colorectal cancer. *Eur.J.Cancer*, 2002. **38**(7): p. 867-871.
4. Kinzler, K.W. and B. Vogelstein, Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 1996. **87**(2): p. 159-170.
5. Takahashi, M. and K. Wakabayashi, Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci.*, 2004. **95**(6): p. 475-480.
6. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990. **61**(5): p. 759-67.
7. Kastan, M.B., C.E. Canman, and C.J. Leonard, P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, 1995. **14**(1): p. 3-15.
8. Grady, W.M. and J.M. Carethers, Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology*, 2008.
9. Giovannucci, E., et al., Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. *Cancer Res*, 1994. **54**(9): p. 2390-7.
10. Wynder, E.L., B.S. Reddy, and J.H. Weisburger, Environmental dietary factors in colorectal cancer. Some unresolved issues. *Cancer*, 1992. **70**(5 Suppl): p. 1222-8.
11. Ekblom, A., et al., Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med*, 1990. **323**(18): p. 1228-33.
12. Collins, R.H., Jr., M. Feldman, and J.S. Fordtran, Colon cancer, dysplasia, and surveillance in patients with ulcerative colitis. A critical review. *N Engl J Med*, 1987. **316**(26): p. 1654-8.
13. Karlen, P., et al., Increased risk of cancer in ulcerative colitis: a population-based cohort study. *Am.J.Gastroenterol.*, 1999. **94**(4): p. 1047-1052.
14. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.*, 2004. **21**(2): p. 137-148.
15. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.
16. Ehrlich, P., šber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. 1909, *Ned. Tijdschr. Geneesk.* p. 273-290.
17. Soloski, M.J., Recognition of tumor cells by the innate immune system. *Curr.Opin.Immunol.*, 2001. **13**(2): p. 154-162.
18. Nagorsen, D., et al., Natural T cell immunity against cancer. *Clin.Cancer Res.*, 2003. **9**(12): p. 4296-4303.
19. Levine, A.M., Lymphoma complicating immunodeficiency disorders. *Ann.Oncol.*, 1994. **5 Suppl 2**: p. 29-35.

20. Strand, S. and P.R. Galle, Immune evasion by tumours: involvement of the CD95 (APO-1/Fas) system and its clinical implications. *Mol Med Today*, 1998. **4**(2): p. 63-8.
21. Khong, H.T. and N.P. Restifo, Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat.Immunol.*, 2002. **3**(11): p. 999-1005.
22. Piemonti, L., A. Zerbi, and C.V. Di, Strategies for tumor immune escape. *Drugs Today (Barc.)*, 2003. **39**(9): p. 701-724.
23. Mapara, M.Y. and M. Sykes, Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *J.Clin.Oncol.*, 2004. **22**(6): p. 1136-1151.
24. Frey, A.B. and N. Monu, Signaling defects in anti-tumor T cells. *Immunol Rev*, 2008. **222**: p. 192-205.
25. Finke, J., et al., Where have all the T cells gone? Mechanisms of immune evasion by tumors. *Immunol Today*, 1999. **20**(4): p. 158-60.
26. Grimm M, et al., Tumour-mediated TRAIL-Receptor expression indicates effective apoptotic depletion of infiltrating CD8+ immune cells in clinical colorectal cancer. *Eur J Cancer*, 2010. **accepted**.
27. Jarnicki, A.G., et al., Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF-beta-producing T cells infiltrating the growing tumor: influence of tumor environment on the induction of CD4+ and CD8+ regulatory T cells. *J Immunol*, 2006. **177**(2): p. 896-904.
28. Grimm M, et al., Immunological escape mechanisms of colorectal hepatic metastases. *BMC Cancer*, 2010. **accepted**.
29. Hengartner, M.O., The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000. **407**(6805): p. 770-776.
30. Earnshaw, W.C., L.M. Martins, and S.H. Kaufmann, Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu.Rev.Biochem.*, 1999. **68**: p. 383-424.
31. Reed, J.C., Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer Cell*, 2003. **3**(1): p. 17-22.
32. Zins, K., et al., Colon cancer cell-derived tumor necrosis factor-alpha mediates the tumor growth-promoting response in macrophages by up-regulating the colony-stimulating factor-1 pathway. *Cancer Res*, 2007. **67**(3): p. 1038-45.
33. Zidi, I., et al., TNF-alpha and its inhibitors in cancer. *Med Oncol*, 2009.
34. Balkwill, F., Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002. **13**(2): p. 135-41.
35. Vandenabeele, P., et al., Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol*, 1995. **5**(10): p. 392-9.
36. Tartaglia, L.A. and D.V. Goeddel, Two TNF receptors. *Immunol Today*, 1992. **13**(5): p. 151-3.
37. Aggarwal, B.B., Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(9): p. 745-56.
38. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 1998. **281**(5381): p. 1305-8.
39. Baker, S.J. and E.P. Reddy, Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene*, 1998. **17**(25): p. 3261-70.



40. Muppidi, J.R., J. Tschopp, and R.M. Siegel, Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. *Immunity*, 2004. **21**(4): p. 461-5.
41. Gasser, M., et al., Comparative analysis of predictive biomarkers for therapeutical strategies in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*, 2007. **14**(4): p. 1272-84.
42. Sobin LH and W. Ch., UICC. TNM Classification of Malignant Tumors 2002. **6th edition**.
43. Greene, F.L., TNM staging for malignancies of the digestive tract: 2003 changes and beyond. *Semin Surg Oncol*, 2003. **21**(1): p. 23-9.
44. Sack, M.J. and S.A. Roberts, Cytokeratins 20 and 7 in the differential diagnosis of metastatic carcinoma in cytologic specimens. *Diagn Cytopathol*, 1997. **16**(2): p. 132-6.
45. Shrout, P.E. and J.L. Fleiss, Intraclass correlations: uses in assessing rater reliability. *Psychol Bull*, 1979. **86**(2): p. 420-8.
46. Kaplan, E.L. and P. Meier, Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*, 1958. **75**: p. 457-487.
47. Cox, D.R., Regression models and life tables. *J R Stat Soc*, 1972(34): p. 1987-2001.
48. Morales, C.P., R.F. Souza, and S.J. Spechler, Hallmarks of cancer progression in Barrett's oesophagus. *Lancet*, 2002. **360**(9345): p. 1587-9.
49. Colotta, F., et al., Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 2009. **30**(7): p. 1073-81.
50. Mantovani, A., Cancer: Inflaming metastasis. *Nature*, 2009. **457**(7225): p. 36-7.
51. Balkwill, F. and A. Mantovani, Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 2001. **357**(9255): p. 539-45.
52. Lankiewicz, S., et al., Tumour-associated transcripts and EGFR deletion variants in colorectal cancer in primary tumour, metastases and circulating tumour cells. *Cell Oncol*, 2008. **30**(6): p. 463-71.
53. Veenendaal, L.M., et al., Differential Notch and TGFbeta signaling in primary colorectal tumors and their corresponding metastases. *Cell Oncol*, 2008. **30**(1): p. 1-11.
54. Mesker, W.E., et al., Presence of a high amount of stroma and downregulation of SMAD4 predict for worse survival for stage I-II colon cancer patients. *Cell Oncol*, 2009. **31**(3): p. 169-78.
55. Michalaki, V., et al., Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. *Br J Cancer*, 2004. **90**(12): p. 2312-6.
56. Nakashima, J., et al., Association between tumor necrosis factor in serum and cachexia in patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 1998. **4**(7): p. 1743-8.
57. Trompet, S., et al., High Innate Production Capacity of Proinflammatory Cytokines Increases Risk for Death from Cancer: Results of the PROSPER Study. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(24): p. 7744-7748.

58. Naylor, M.S., et al., Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. Potential role in disease progression. *J Clin Invest*, 1993. **91**(5): p. 2194-206.
59. Miles, D.W., et al., Expression of tumour necrosis factor (TNF alpha) and its receptors in benign and malignant breast tissue. *Int J Cancer*, 1994. **56**(6): p. 777-82.
60. Sati, H.I., et al., Expression of interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha in plasma cells from patients with multiple myeloma. *Br J Haematol*, 1999. **104**(2): p. 350-7.
61. Warzocha, K., et al., Expression of genes coding for the tumor necrosis factor and lymphotoxin ligand-receptor system in non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Immunol Immunother*, 2000. **49**(9): p. 469-75.
62. Adami, F., et al., Serum levels of tumour necrosis factor-alpha in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer*, 1994. **30A**(9): p. 1259-63.
63. Rajput, S. and A. Wilber, Roles of inflammation in cancer initiation, progression, and metastasis. *Front Biosci (Schol Ed)*. **2**: p. 176-83.
64. Balkwill, F. and L.M. Coussens, Cancer: an inflammatory link. *Nature*, 2004. **431**(7007): p. 405-6.
65. Orosz, P., et al., Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor. *J Exp Med*, 1993. **177**(5): p. 1391-8.
66. Malik, S.T., et al., Cells secreting tumour necrosis factor show enhanced metastasis in nude mice. *Eur J Cancer*, 1990. **26**(10): p. 1031-4.
67. Qin, Z., et al., Expression of tumor necrosis factor by different tumor cell lines results either in tumor suppression or augmented metastasis. *J Exp Med*, 1993. **178**(1): p. 355-60.
68. Cubillos, S., et al., Effect of blocking TNF on IL-6 levels and metastasis in a B16-BL6 melanoma/mouse model. *Anticancer Res*, 1997. **17**(3C): p. 2207-11.
69. Wu, Y. and B.P. Zhou, TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer*.
70. Brown, T.D., et al., A phase II trial of recombinant tumor necrosis factor in patients with adenocarcinoma of the pancreas: a Southwest Oncology Group study. *J Immunother (1991)*, 1991. **10**(5): p. 376-8.
71. Creagan, E.T., et al., A phase I clinical trial of recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer*, 1988. **62**(12): p. 2467-71.
72. Furman, W.L., et al., Phase I clinical trial of recombinant human tumor necrosis factor in children with refractory solid tumors: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol*, 1993. **11**(11): p. 2205-10.
73. Selby, P., et al., Tumour necrosis factor in man: clinical and biological observations. *Br J Cancer*, 1987. **56**(6): p. 803-8.
74. Zouboulis, C.C., et al., Cytostatic and cytotoxic effects of recombinant tumor necrosis factor-alpha on sensitive human melanoma cells in vitro may result in selection of cells with enhanced markers of malignancy. *J Invest Dermatol*, 1990. **95**(6 Suppl): p. 223S-230S.
75. Smolen, J.S. and D. Aletaha, Developments in the clinical understanding of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2009. **11**(1): p. 204.

76. Geborek, P., et al., Tumour necrosis factor blockers do not increase overall tumour risk in patients with rheumatoid arthritis, but may be associated with an increased risk of lymphomas. *Ann Rheum Dis*, 2005. **64**(5): p. 699-703.
77. Balkwill, F., TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 2006. **25**(3): p. 409-16.
78. Burton, E.R. and S.K. Libutti, Targeting TNF-alpha for cancer therapy. *J Biol*, 2009. **8**(9): p. 85.
79. van Horssen, R., T.L. Ten Hagen, and A.M. Eggermont, TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist*, 2006. **11**(4): p. 397-408.
80. Brown, E.R., et al., A clinical study assessing the tolerability and biological effects of infliximab, a TNF-alpha inhibitor, in patients with advanced cancer. *Ann Oncol*, 2008. **19**(7): p. 1340-6.
81. Wang, X. and Y. Lin, Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta Pharmacol Sin*, 2008. **29**(11): p. 1275-88.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC-Gen	Adenomatous polyposis coli gen
CD	cluster of differentiation
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
Cy3	Indocarbocyanin
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4'6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorin
DNA	Desoxyribonucleic acid / Desoxyribonukleinsäure
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
HR	Hazard Ratio, Risikoverhältnis
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunohistochemie
IQR	Interquartil-Range
KI	Konfidenzintervall
NF- $\kappa$ B	Nuklear factor-kappa B
NK	natürliche Killerzellen
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
TBS	tris buffered saline
TILs	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
TNF-R	tumor necrosis factor receptor
UICC	Union International Contre le Cancer
WHO	World Health Organisation

## **8 Danksagung**

Herrn Priv.-Doz. Dr. BHA von Rahden und Herrn Professor Germer danke ich für die Überlassung des Themas, die hilfreiche Anleitung zur selbständigen wissenschaftlichen Tätigkeit bei Etablierung und Ausarbeitung der Thematik. Mein ganz besonderer Dank gilt Fr. Dr. Lazariotou für die Hilfe bei praktischen molekularbiologischen Fragestellungen. Frau Professor Dr. Waaga-Gasser, Herrn Priv.-Doz. Dr. Gasser und Herrn Dr. Kircher danke ich für die Gewebeproben.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Dr. med. dent. Martin Reinhold Grimm  
Geburt: 10. Oktober 1977, Nürnberg  
Familienstand: ledig  
Eltern: Heinz Grimm  
Siegfried Grimm  
Geschwister: Christian Oliver Grimm  
Dr. med. dent. Michael Grimm

### Bildungsweg

1984-1988 Hermann-Kolb-Grundschule, Nürnberg  
1988-1997 Bertolt-Brecht-Gymnasium, Nürnberg  
1997 Abitur  
1997-1998 Wehrdienst (Sportfördergruppe Karate, Sonthofen)  
Mai 1999 Studium der Zahnmedizin, Friedrich-Alexander-Universität  
Erlangen-Nürnberg  
August 2001 Physikum (Zahnmedizin)  
Juli 2004 Staatsexamen (Zahnmedizin)  
seit August 2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Universitätsklinikum  
Würzburg, Chirurgische Klinik und Poliklinik, Zentrum für  
Operative Medizin (ZOM):  
Abt. Molekulare Onkoimmunologie (MOI)  
Studium der Humanmedizin  
Juli 2005 Physikum (Medizin Note: 1,66)  
Mai 2010 Staatsexamen (Medizin Note: 2,0)

### Klinische Ausbildung

September 2003 Famulatur in der Abteilung für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie  
an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg

September 2010 Beginn der Facharztausbildung zum Mund-Kiefer-Gesichtschirurgen im Klinikum Nürnberg-Süd, Klinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie

### **Forschung**

März 2002-2005 1. Doktorarbeit:  
„Untersuchung regulatorischer T-Zellen bei Toleranzinduktion nach experimenteller Nierentransplantation unter Berücksichtigung co-stimulatorischer Signalwege“

Mai 2006 Erfindungsanmeldung (B63642) „MOI-Block für Immunhistochemie“ (BayernPatent)

Oktober 2008 DFG-Antrag: „Bedeutung der Toll-like-Rezeptor Signaltransduktion tumorinitiierender Zellen des kolorektalen Karzinoms“

Februar 2009 Drittmittel Senator Kurt and Inge Schuster Stiftung

Dezember 2009 2. Doktorarbeit:  
„Die Bedeutung der Expression des Tumornekrosefaktor- $\alpha$  bei Patienten mit kolorektalem Karzinom“

Dezember 2009 DFG-Antrag: „Bedeutung des VEGFR-2 und PDGFR- $\beta$ -Signalwegs für motilitäts-assoziierte Kinasen beim kolorektalen Karzinom“ (eingereicht)

### **Fortbildungen**

Oktober 2005 Visitron Systems: Seminar „MetaMorph Basic Software“

November 2006 PromoCell Academy Heidelberg: „Immunoblotting“

Februar 2007 PromoCell Academy Heidelberg: „Real-Time-PCR Kurs“

### **Sportliche Ausbildung**

Ehem. Mitglied im **Landeskader** des Bayerischen Karateverbands e.V. (1993-2000), ehem. Mitglied der deutschen **Nationalmannschaft** im Kumite DKV e.V. (1994-1999). Prüfung zum **3.DAN (3. schwarzer Gürtel)** 2004. **B-Trainer Leistungssport** im Bayerischen Karateverband e.V (1998).

Erfolge (Auswahl 1994-1999): **Deutsche Meister** (Kumite + 70 kg), Shotokan - **Europameister** Junioren - Kumite Team (Deutschland) sowie Platzierungen auf zahlreichen nationalen und internationalen Turnieren (5.Platz World - Cup Kumite Einzel Allkategorie, 2.Platz World - Cup Kumite Team Deutschland, 3.Platz Zürich Open Kumite Team Deutschland, 5.Platz Europameisterschaft Junioren Team Deutschland, 3.Platz Deutsche Meisterschaft Junioren Kumite Einzel +75 kg)

Würzburg, 26/11/2010