

Aus der Chirurgischen Klinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Professor. Dr. med. Chr.-T. Germer
Abteilung für Molekulare Onkoimmunologie
Leiterin: Professor Dr. A.-M. Waaga-Gasser

Untersuchungen zur gegen den Tumor gerichteten Immunantwort
und zur Tumorneoangiogenese bei kolorektalen Lebermetastasen
anhand eines Mausmodells

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Johanna Dorothea Strehl
aus Ebern

Würzburg, November 2008

Referentin: Prof. Dr. rer. nat. A.M. Waaga-Gasser, Univ.,
Molekulare Onkoimmunologie

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. T. Hünig, Univ., Virologie und Immunbiologie

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 12.05.2009

Die Promovendin ist Ärztin

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Kolonkarzinom	1
1.1.1	Inzidenz und Prädisposition	1
1.1.2	Klassifikation	1
1.1.3	Therapie des fortgeschrittenen Kolonkarzinoms	3
1.1.4	Die Leber als primäres Metastasierungsorgan des Kolonkarzinoms	4
1.2	Tumorimmunabwehr	4
1.2.1	Der B7/CD28 Kostimulatorische Signalweg	5
1.2.2	Th1/Th2 Immunantwort	7
1.2.3	Th1/Th2 Immunantwort und Tumorentwicklung	7
1.2.4	Zytokine der Th1 Immunantwort	8
1.2.5	Zytokine der Th2 Immunantwort	10
1.3	Differenzierungswege der T-Zellen	12
1.3.1	CD8+ zytotoxische T-Zellen	12
1.3.2	CD4+ T-Zellen	12
1.4	Angiogenese	15
1.4.1	Angiogeneese und Tumorwachstum	16
1.4.2	VEGF	16
2	Fragestellung	18
3	Material und Methoden	19
3.1	Tiere	19
3.2	Versuchsaufbau	19
3.3	Zellkultur mit CT26WT	20
3.4	Tumorzellinjektion	22
3.5	Organentnahme	22
3.6	RNA Extraktion	23
3.7	Methodik der PCR	24
3.8	Real-Time PCR	24
3.8.1	Verwendete Materialien	25
3.8.2	Auswertung der PCR Daten	28
3.8.3	Darstellung der Ergebnisse: Berechnung des Fold Factors	29
3.9	Immunhistologische Analyse	29
3.9.1	Einfachfärbung	31
3.9.2	Doppelfärbung	32
3.9.3	Auswertung	34

4	Ergebnisse:	36
4.1	Th1/Th2 Immunantwort	37
4.1.1	Th1 Antwort	37
4.1.2	Th2 Antwort	40
4.1.3	IL-2 und IL-10 Expressionskinetik	42
4.2	T-Zell Subpopulationen	43
4.3	Regulatorische T-Zellen	45
4.4	VEGF Isoformen in Normalgewebe und in Lebermetastasen	50
5	Beantwortung der Fragestellungen	55
5.1	Th1/Th2 Immunantwort	55
5.2	T-Zell Populationen	56
5.3	Regulatorische T-Zellen	57
5.4	Pro- und antiangiogenetische Faktoren	58
5.5	Klinischer Bezug	59
6	Diskussion	62
6.1	Th1/Th2 Immunantwort	62
6.1.1	Th1 Antwort	62
6.1.2	Th2 Antwort	63
6.1.3	IL-2 und IL-10 Expressionskinetik	65
6.2	T-Zell Populationen	65
6.3	Regulatorische T-Zellen	66
6.4	VEGF Isoformen in Normalgewebe und Lebermetastasen	67
6.5	Klinischer Bezug	68
7	Zusammenfassung	71
8	Abbildungsverzeichnis:	73
9	Literaturverzeichnis	76

Lebenslauf

Danksagung

1 Einleitung

1.1 Das Kolonkarzinom

1.1.1 Inzidenz und Prädisposition

Das Kolonkarzinom stellt die vierthäufigste tumorbedingte Todesursache weltweit dar, in Deutschland ist es die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache. Bei annähernd 15% aller humanen Karzinome handelt es sich um kolorektale Karzinome [1]. Allein von 1960-1980 hat eine Verdoppelung der Inzidenz stattgefunden. Das Lebenszeitrisiko für das einzelne Individuum liegt bei 5% [2], die Inzidenz ist bei 50/100000 angesiedelt. Entsprechend der hohen Zahl an Betroffenen gehört das Kolonkarzinom mittlerweile zu den am besten untersuchten Tumorentitäten.

Bei den in der europäischen Bevölkerung auftretenden Kolonkarzinomen handelt es sich zu 90% um sporadische Karzinome, 10 % sind hereditär bedingt.

Hochrisikofaktoren für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms sind genetisch prädisponierende Faktoren (Familiäre Adenomatöse Polyposis, *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Carcinoma*) und das Vorliegen von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen [3]. Das Risiko, ein kolorektales Karzinom zu entwickeln, beträgt bei einer Colitis ulcerosa nach einer Krankheitsdauer von 25 Jahren zwischen 7 und 14% und steigt auf über 30% nach einer Krankheitsdauer von über 35 Jahren [4]. Nachforschungen haben ergeben, dass chronische Entzündungen die Grundlage für annähernd 20% aller sporadisch auftretender Karzinome beim Menschen sind [5].

1.1.2 Klassifikation

Die Klassifikation der Kolonkarzinome ist von großer klinischer Bedeutung. Durch die Einteilung des Kolon-Karzinoms in verschiedene Untergruppen erfolgt eine Risiko-Stratifizierung, welche differenzierte therapeutische Entscheidungen erlaubt. Auch eine Aussage zur Prognose des einzelnen Patienten kann so getroffen werden. Die Charakterisierung des Kolonkarzinoms erfolgt nach der TNM Klassifikation:

T	Tumor	
	T1	Muscularis propria nicht befallen
	T2	Muscularis propria befallen
	T3	Subserosa befallen
N	Nodus	
	N0	keine Lymphknotenmetastasen
	N1	1-3 regionäre Lymphknotenmetastasen
M	Metastase	
	M0	keine Fernmetastasen
	M1	Fernmetastasen

Tabelle 1 : TNM Klassifikation

Auf der Grundlage der TNM Klassifikation wird eine Stadieneinteilung nach der Union Internationale Contre Le Cancer (UICC) vorgenommen, welche prognostische Aussagen erlaubt:

TNM-Klassifikation		UICC - Stadium	Klassifikation nach Dukes
Tis	Carcinoma in situ	-	-
T1	Muscularis propria nicht befallen	I	A
T2	Muscularis propria befallen		
T3	Subserosa befallen	IIA	B
T4	Befall angrenzender Organe oder Befall des viszeralen Peritoneums	IIB	
N1	1-3 regionäre Lymphknoten befallen	IIIA, IIIB	C
N2	>3 regionäre Lymphknoten befallen	IIIC	
M1	Fernmetastasen	IV	D

Tabelle 2 : TNM Klassifikation und Stadieneinteilung

Die Prognose für früh entdeckte und behandelte kolorektale Karzinome ist als gut bis sehr gut einzuschätzen. So wurde für Patienten im Stadium Dukes A eine Fünf-Jahres-Überlebensrate (5-JÜL) von 80% - 95% berechnet. Der Einbruch von Tumorzellen in die Serosa bzw. ein Lymphknotenbefall führen zu deutlich ungünstigeren Überlebensraten. Die 5-JÜL für Patienten im Dukes Stadium B und C beträgt 25% - 60% [6]. Im Stadium Dukes D, also bei einem Auftreten von Fernmetastasen, beträgt die 5-JÜL da-

gegen nur 0% - 7% [7]. Die Ausbildung von Lebermetastasen ist bei den meisten Patienten, die an einem kolorektalen Karzinom versterben, die Todesursache.

1.1.3 Therapie des fortgeschrittenen Kolonkarzinoms

Eine große aktuelle Metaanalyse zeigte, dass etwa 50% der von einem kolorektalen Karzinom betroffenen Patienten entweder bereits mit Metastasen primär erfasst werden oder im Verlauf ihrer Erkrankung Tumorabsiedelungen entwickeln. Damit befindet sich die Hälfte der am kolorektalen Karzinom erkrankten Patienten entweder bereits bei Diagnosestellung im UICC Stadium IV oder tritt im Verlauf der Erkrankung in dieses Stadium ein. Die Fernmetastasen sind zumeist in der Leber angesiedelt. Von den Patienten mit Lebermetastasen können ca. 20 - 30% in kurativer Absicht operiert werden. Trotz Operation entwickeln jedoch bis zu 60% der Patienten intra- oder extrahepatische Rezidive [8].

Etwa 30 - 40% der Patienten mit einem kolorektalen Karzinom haben bei Erstdiagnose eine lokoregionär fortgeschrittene oder metastasierte Erkrankung, so dass eine kurative operative Therapie nicht möglich ist. Das Gesamtüberleben bei dieser Patientengruppe liegt bei nur 8 bis 15 Monaten. Durch eine palliative Chemotherapie mit 5-Fluorouracil (5-FU), Irinotecan und Oxaliplatin kann das Gesamtüberleben um durchschnittlich 4 Monate verlängert werden. Ein neuer Ansatz in der palliativen Therapie des metastasierten Kolonkarzinoms ist eine gezielte Therapie mit monoklonalen Antikörpern. Zwei Antikörper wurden vielfach in klinischen Studien untersucht und erhöhen das Ansprechen auf eine Therapie. Es handelt sich um den Antikörper Cetuximab gegen den *Endothelial Growth Factor Receptor* (EGFR) und um den Antikörper Bevacizumab gegen den *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). Bevacizumab ist ein antiangiogenetisch wirksamer Faktor und wurde in den letzten Jahren im Rahmen klinischer Studien bei Patienten mit inoperablen Metastasen eingesetzt. Die Ergebnisse zeigen, dass mit Bevacizumab ein größerer Anteil von *Respondern* und eine längere Überlebenszeit ohne Fortschreiten der Tumorerkrankung erreicht werden konnte als mit Chemotherapie alleine [9].

1.1.4 Die Leber als primäres Metastasierungsorgan des Kolonkarzinoms

Die Leber ist beim Kolonkarzinom aufgrund des venösen Abflussweges das primäre Metastasierungsorgan. Das Lebergewebe wird physiologischerweise von zahlreichen Zellarten besiedelt, welche ein günstiges Milieu für ein Tumorwachstum generieren können. So finden sich im Leberparenchym außer Hepatozyten auch Endothelzellen, Perizyten, Entzündungszellen und Kupfferzellen [10]. Bei Regenerationsvorgängen werden unter anderem proangiogenetische Faktoren wie *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF α), *Endothelial Growth Factor* (EGF), *Fibroblastic Growth Factor* (FGF) und VEGF vom Lebergewebe produziert, die ebenso eine Tumorneoangiogenese fördern. Hepatozyten selbst produzieren dabei verschiedene proangiogenetische Moleküle, unter anderem *Interleukin*(IL)-6, TNF α , FGF und VEGF. Das Lebergewebe stellt damit ein Gewebemilieu dar, welches die Angiogenese begünstigt [11].

In der Leber herrscht ein anderes Milieu immunkompetenter Zellen als im Gastrointestinaltrakt. Damit keine schwerwiegenden allergischen Reaktionen gegen die Millionen von Antigenen hervorgerufen werden, welche über die Nahrung täglich den Darm passieren, finden sich in der Darmschleimhaut immunregulatorische Vorgänge, die die Immunabwehr in ihrer Effizienz auf besondere Weise steuern [12]. Interessanterweise werden zwischen 70% und 80% der primären Metastasen des kolorektalen Karzinoms in der Leber beobachtet. Die histologische Aufarbeitung zeigt, dass das Metastasengewebe vielfach von einer ausgeprägten lymphozytären Entzündungsreaktion umgeben ist. Während das Immunsystem also durchaus dazu in der Lage ist, das Metastasengewebe als fremd zu erkennen, findet analog zu dem Primärtumor keine adäquate Immunantwort statt, obwohl im Lebergewebe keine Suppression des Immunsystems wie in der Darmschleimhaut stattfindet. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass verschiedene Mechanismen existieren, welche eine effiziente Immunantwort gegen den Tumor schwächen. Es ist klinisch von Interesse, diese *Tumor Escape* Mechanismen zu verstehen und auf eine mögliche therapeutische Beeinflussbarkeit zu prüfen. Im Folgenden sollen Ablauf sowie Einzelkomponenten der Immunantwort genauer beleuchtet werden.

1.2 Tumorimmunabwehr

Die gegen einen wachsenden Tumor gerichtete lymphozytäre Immunantwort kann in ihrer Ausprägung humoral oder zellulär ausgerichtet sein, oft liegen Mischformen vor.

Damit eine erfolgreiche zelluläre Immunabwehr zustande kommen kann, müssen Tumorzellen als fremd erkannt und tumorspezifische Abwehrzellen aktiviert werden. Dazu wird Tumorantigen im Komplex mit *Major Histocompatibility Complex* Klasse I (MHC-I) Molekülen auf der Zelloberfläche antigenpräsentierender Zellen dargestellt. Die hochspezifischen T-Zell Rezeptoren (TCR) der T-Helferzellen sind dazu in der Lage, Peptide als fremd zu erkennen, in welchen lediglich einzelne Aminosäuren ausgetauscht wurden. Dies bedeutet, dass auch einzelne Punktmutationen im gesamten Genom erfaßt werden können, vorausgesetzt der die Mutation tragende Peptidabschnitt wird auf der Zelloberfläche präsentiert [13].

1.2.1 Der B7/CD28 Kostimulatorische Signalweg

Die Präsentation des Fremdpeptids im Komplex mit MHC-I Molekülen alleine reicht nicht aus, um eine Immunantwort auszulösen. Die Aktivierung kostimulatorischer Moleküle, welche auf der Oberfläche von T Zellen exprimiert werden und in die T-Zell-Rezeptor/CD3 Signalkaskade eingreifen, ist dazu notwendig. *Cluster of Differentiation 28* (CD28) und *Inducible Costimulatory Molecule* (ICOS) sind Moleküle, welche kostimulatorische Funktion haben. Findet eine spezifische Bindung zwischen dem T-Zell-Rezeptor (TCR) einer naiven T-Zelle und einem Peptid/MHC-I Komplex statt, ohne dass gleichzeitig ein kostimulatorisches Signal ausgelöst wird, wird in der T-Zelle ein Zustand einer Anergie induziert.

Zu der B7/CD28 Familie gehören noch zwei weitere kostimulatorische Moleküle, welche im Gegensatz zu CD28 und ICOS eine negative Wirkung auf die vom TCR ausgehende Signalkaskade (TCR/CD3-Signalkaskade) ausüben. Hierbei handelt es sich um das *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4* (CTLA4) und den *Programmed Death-1* (PD-1) Faktor. Beide Moleküle interagieren mit Vertretern der B7-Familie. Diese inhibitorischen Signale spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung der T-Zellaktivität. Eine Inhibition dieser Signalkaskade mittels einer Überexpression von PD-1 oder CTLA4 ist somit denkbar. Im Folgenden sollen diese beiden Moleküle genauer charakterisiert werden.

1.2.1.1 PD-1

PD-1 ist ein inhibitorisch wirkender Rezeptor, welcher zusammen mit CTLA4, ICOS und CD28 zur B7/CD28 Superfamilie gehört. In der Maus wird die Messenger-

Ribonukleinsäure (mRNA) dieses Rezeptors unter physiologischen Bedingungen nur im Thymusgewebe exprimiert. Die über den antigenspezifischen TCR auf der Oberfläche von T-Zellen ablaufende Signalantwort wird über den aktivierten PD-1 Rezeptor negativ moduliert. PD-1 wird auf aktivierten T Zellen exprimiert [14] und kann deshalb als Markermolekül im Hinblick auf die Aktivierung von T-Zellen eingesetzt werden. Ruhende B- oder T-Zellen weisen keine PD-1 Moleküle auf. Die Bindung des PD-1 Rezeptors an seinen Liganden B7-H1 führt zu einer stark eingeschränkten IL-2 Produktion. Unzureichende Expression von PD-1 führt zu Autoimmunerkrankungen. PD-1 defiziente BALB/c Mäuse entwickeln nach der Geburt einen Autoimmun-Phänotyp mit Kardiomegalie, diffusen Immunglobulin G (IgG) Ablagerungen in den Kardiomyozyten sowie hohen Blutspiegeln von gegen Herzgewebe gerichteten Antikörpern. In dieser Form erkrankte Tiere werden teilweise kaum älter als fünf Wochen. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass PD-1 ein wichtiger regulierender Faktor bei der Verhinderung von peripheren Autoimmunreaktionen ist [15].

1.2.1.2 CTLA4

CTLA4 ist ein Oberflächenmolekül der Immunglobulin-Superfamilie, welches eine 30%-ige Homologie mit CD28 aufweist. CTLA4 wird von T-Zellen nach ihrer Aktivierung exprimiert, bei ruhenden Zellen fehlt es auf der Zelloberfläche. CTLA4 weist eine höhere Avidität als CD28 gegenüber Mitgliedern der B7-H1 Familie auf. Eine Hochregulierung des CTLA4 Moleküls auf der Oberfläche von T-Zellen findet bei Stimulation mit CD3 monoklonalem Antikörper (mAb) und CD28 mAb statt, sowie bei Behandlung mit exogenem IL-2. Eine weitere Voraussetzung für eine Steigerung der CTLA4 Expression ist, dass die Zellen in den Zellzyklus eingetreten sind. CTLA4 defiziente Mäuse entwickeln schwere lymphoproliferative Erkrankungen sowie Autoimmunerkrankungen und sterben binnen eines Monats nach ihrer Geburt [16]. CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen besitzen weitaus größere intrazelluläre Speicher an CTLA4 als CD4⁺/CD25⁻ T-Zellen [17]. CTLA4 wird konstitutiv auf CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen exprimiert. Diese Untergruppe macht 5% - 10% aller peripheren T-Zellen aus. Suppressierende Effekte, die von CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen auf andere proliferierende T-Zellen ausgeübt werden, können durch die Blockade von CTLA4 durch spezifische Antikörper aufgehoben werden. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass es sich beim CTLA4 um ein Molekül handelt, welches spezifisch auf T-Zellen mit regulatorischer Wirkung exprimiert wird [16].

1.2.2 Th1/Th2 Immunantwort

Im Rahmen der Immunreaktion auf ein Antigen kann es zu der Ausbildung einer Th1 oder einer Th2 dominierten Immunantwort kommen, auch Mischantworten sind häufig. Grundsätzlich werden IL-2, Interferon(IFN)- γ und IL-12 sowie IL-18 der T-Helfer-1 (Th1) Immunantwort zugeordnet, während die Produktion von IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 für die T-Helfer-2 (Th2) Immunantwort typisch ist [18, 19]. Das von den Th1 Zellen exprimierte IL-2 ist für die Proliferation und Differenzierung von CD8 T-Zellen notwendig, während das ebenfalls von Th1 Zellen stammende IFN γ den Wirkungsgrad der CD8 T-Zellen steigert, indem es die Expression von MHC-I Komplexen auf der Oberfläche ihrer Zielzellen erhöht. Das Überwiegen von Th1 T-Helferzellen führt zur Ausbildung einer zellulären Immunantwort und zur Produktion von opsonierenden Antikörpern (vorwiegend IgG), während es bei Ausbildung einer Th2 Immunantwort zur Ausbildung von Antikörpern der Klassen IgM, IgA und IgE kommt.

Es gilt inzwischen als anerkannt, dass diese beiden Untergruppen von T-Helferzellen sich gegenseitig regulieren können. Zytokine der einen CD4 T-Zell Untergruppe können die Aktivierung der anderen CD4 T-Zellen unterbinden oder zumindest hemmen. So kann z.B. IL-10, ein typisches Th2 Zytokin, die Entwicklung einer Th1 Immunantwort hemmen, indem durch die Wirkung dieses Zytokins antigenpräsentierende Zellen blockiert werden. Dagegen kann IFN γ , ein Th1 spezifisches Zytokin, die Aktivierung von Th2 Zellen inhibieren. Je nachdem, welche Untergruppe von CD4 T-Zellen zuerst oder dominierend im Rahmen einer Immunantwort aktiviert wird, können Immunreaktionen deshalb entweder von einer Th1 oder von einer Th2 Antwort dominiert werden. *In vivo* kann aber in vielen Fällen auch eine gemischte Immunantwort auftreten [117].

1.2.3 Th1/Th2 Immunantwort und Tumorentwicklung

Das zunächst am Ort einer Tumorentstehung vorherrschende inflammatorische Milieu fördert die Produktion unspezifisch proinflammatorischer Zytokine sowie Th1 spezifischer Zytokine und Cyclooxygenase 2 (COX2). COX2 ist ein Enzym, welches verschiedene Faktoren durch Umsetzung von Arachidonsäure freisetzt, so unter anderem Prostaglandine. Diese Faktoren wirken proinflammatorisch. Untersuchungen haben ergeben, dass COX2 in Malignomen des Dickdarms heraufreguliert ist [20]. Die erhöhte Expression von COX2 wiederum stimuliert die Produktion Th2 spezifischer Zytokine wie IL-4 und IL-10. Diese hemmen die Th1 Komponente der Immunantwort und führen

dazu, dass die humorale Immunantwort stärker hervortritt [21]. Hemmt man COX2, so wird die Immunantwort in Richtung einer Th1 spezifischen Immunantwort gelenkt, unter anderem wird IFN γ heraufreguliert [22]. Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass COX2 sowohl die Aktivität als auch die mengenmäßige Zunahme der *Forkhead Box p3* (Foxp3) positiven regulatorischen T-Zellen fördert [22]. Ein Th2 ausgerichtetes Milieu ist somit der Induktion regulatorisch wirksamer Zellen förderlich.

Weiterhin wurde in zahlreichen Publikationen postuliert, dass eine Th1 betonte Immunantwort für die Tumorbekämpfung effektiver ist als eine Th2 Antwort [23, 24].

Das Tumorstadium wird somit sowohl hinsichtlich der Gefäßneubildung als auch hinsichtlich einer abgemilderten tumorspezifischen Immunantwort bei der Ausbildung einer Th2 dominierten Immunantwort begünstigt. Die Untersuchung des Zytokinmilieus im Lebermetastasengewebe soll deshalb dazu beitragen, die Prägung der gegen die proliferierenden Tumorzellverbände gerichteten Immunantwort zu erfassen, so dass Möglichkeiten der therapeutischen Beeinflussung diskutiert werden können. Im Folgenden sollen die wichtigsten Zytokine der Th1- und Th2-Immunantwort einzeln besprochen werden.

1.2.4 Zytokine der Th1 Immunantwort

1.2.4.1 IL-2

Unter physiologischen Bedingungen wird IL-2 von CD4⁺ T-Zellen produziert, nachdem die Zellen über Mitogene oder Allogene aktiviert worden sind. Ruhende T-Zellen produzieren kein IL-2. IL-2 fördert die Proliferation sowie die Effektorfunktionen von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Bei T-Zellen, welche in einen Zustand der Anergie bzw. Toleranz eingetreten sind, ist IL-2 dazu in der Lage, diese Entwicklung rückgängig zu machen. IL-2 stimuliert die Produktion von IFN γ in peripheren Blutlymphozyten (PBLs) und fördert außerdem die Sekretion von IL-1, TNF α und TNF β . Für Foxp3 exprimierende regulatorische CD4⁺ T-Zellen ist IL-2 ein essentieller Faktor, welcher ihnen das Überleben ermöglicht. Die Bedeutung dieses Zytokins für die regulatorisch wirksame Subpopulation von CD4⁺ T-Zellen wird unter anderem dadurch deutlich, dass sich in IL-2 *knockout* Mäusen Autoimmunerkrankungen ausbilden [25].

Es sind drei Rezeptoren beschrieben, an welche IL-2 binden kann. Die Rezeptoren werden nach ihrer Affinität zu IL-2 klassifiziert und bestehen aus bis zu drei Untereinheiten. Es wird vermutet, dass Mutationen in der IL-2-Rezeptor Gamma-Untereinheit die

Ursache für das X chromosomale SCID Syndrom (*Severe Combined Immunodeficiency Disease*) sind [26].

1.2.4.2 IL-18

IL-18 ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches bei Natürlichen Killer (NK) Zellen, sowie T- und B-Zellen die Produktion von $\text{IFN}\gamma$ deutlich erhöht. Es ist somit hinsichtlich der Ausbildung einer Th1-Immunantwort ein wichtiges Zytokin. IL-18 spielt bei der Proliferation von T-Zellen, der Aktivierung von zytotoxischen Lymphozyten (CTLs) und der Aktivitätssteigerung von NK-Zellen eine wichtige Rolle [27]. Weiterhin wurde postuliert, dass weder IL-2 noch IL-12 im selben Maß wie IL-18 tumorspezifische CTLs induzieren können. IL-18 wirkt bei der Proliferationsförderung von $\text{IFN}\gamma$ produzierenden Th1-Zellen synergistisch mit IL-12 zusammen [28]. Weiterhin wird IL-18 konstitutiv in gastrointestinalen Epithelzellen exprimiert und übt eine hemmende Wirkung auf die Angiogenese aus [29].

1.2.4.3 $\text{TNF}\alpha$

$\text{TNF}\alpha$ ist ein pleiotropes Zytokin, welches eine wichtige Rolle bei Apoptosevorgängen und Entzündung sowie bei Zellproliferation und Zelldifferenzierung spielt. Das Zytokin wird vornehmlich von Makrophagen und Monozyten, aber auch von Tumorzellen sezerniert. Es ist bekannt, dass der $\text{TNF}\alpha$ Serumspiegel bei Patienten mit kolorektalem Karzinom erhöht ist [30]. $\text{TNF}\alpha$ kann unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren, so auch den MAPK/ERK und den NF- κ B Signalweg [31]. Das Zytokin ist dazu in der Lage, über die Zerstörung von Tumorgefäßen und über direkte Zellapoptose hämorrhagische Nekrosen im Tumorgewebe hervorzurufen. Weiterhin fördert $\text{TNF}\alpha$ die Ausbildung einer intensiven, Th1 gerichteten Immunantwort [7]. Diese gegen den Tumor gerichteten Wirkungen von $\text{TNF}\alpha$ macht man sich mittlerweile in der Klinik im Rahmen von Therapieversuchen mit isolierter Extremitätenperfusion zunutze. So konnten durch die Infusion von hochdosiertem $\text{TNF}\alpha$ und dem Chemotherapeutikum Melphalan gute Erfolge vor allem bei metastasierten Melanomen und Sarkomen erzielt werden [32]. Neben seiner schädigenden Wirkung auf das Gefäßsystem von Tumorgewebe besitzt $\text{TNF}\alpha$ in geringerer Konzentration allerdings noch eine proangiogenetische Wirkung. Diese proangiogenetische Wirkung beruht auf der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren für proangiogenetische Faktoren wie IL-8, *Basic Fibroblastic Growth Factor* (bFGF) und VEGF [33]. Weiterhin ist $\text{TNF}\alpha$ dazu in der Lage, über den *Extra-*

cellular Signal Regulated Kinase (ERK) Signalweg vaskuläre Adhäsionsfaktoren wie E-Selectin zu induzieren, welche zu der Haftung von Tumorzellen am Gefäßendothel beitragen und dadurch eine Transmigration der Tumorzellen in den extravaskulären Raum ermöglichen [34-36]. Neben seinen proangiogenetischen und metastasierungsfördernden Eigenschaften besitzt TNF α außerdem noch eine DNA schädigende Wirkung. Neuere Untersuchungen ergaben, dass dieses Zytokin ein mutagenes Potential hat, welches dem von ionisierender Strahlung vergleichbar ist. Diese Wirkung wird wahrscheinlich durch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen vermittelt [37].

1.2.4.4 IFN γ

IFN γ wird von T-Zellen, NK-Zellen und auch Makrophagen produziert. Es ist ein pleiotropes Zytokin der Th1 Immunantwort, welches MHC-I und MHC-II Moleküle hochreguliert, Makrophagen aktiviert, die Produktion von immunsuppressiven Molekülen sowie die Tumorzellproliferation hemmt und die Ausschüttung von antiangiogenen Chemokinen fördert. IFN γ wird die Fähigkeit zugeschrieben, die frühe Tumorneoangiogenese zu hemmen, noch bevor zytotoxische CD8+ Zellen im Gewebe zum Einsatz kommen [38]. IFN γ ist dazu in der Lage, durch Förderung antiangiogener Faktoren wie *IFN γ -Induced-Protein-10* (IP-10) und *Monokine-Induced-By-IFN γ* (MIG) die proangiogenetische Wirkung von TNF α zu hemmen [33].

1.2.5 Zytokine der Th2 Immunantwort

1.2.5.1 IL-4

IL-4 ist ein Zytokin, welches die Ausbildung einer Th2 Immunantwort fördert, die eigene Produktion steigert und die Ausschüttung von IFN γ hemmt [39]. In vitro wurde für das Zytokin IL-4 nachgewiesen, dass es eine direkte, hemmende Wirkung auf die Entwicklung von humanen Th1 Zellen hat [40]. Gleichzeitig gibt es Hinweise darauf, dass IL-4 zur Induktion von Foxp3 positiven T-Zellen führt [41]. Es wurde festgestellt, dass erhöhte Spiegel von IL-4, IL-6, IL-10, TNF α und TGF β 1 im Blut von Kolonkarzinompatienten vorliegen [30].

1.2.5.2 IL-6

IL-6 ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches von unterschiedlichen Zellarten wie Lymphozyten, Epithelzellen und auch Tumorzellen produziert wird. Klinische Studien haben ergeben, dass der IL-6 Blutspiegel bei Patienten mit Kolonkarzinom erhöht ist, und dass die Höhe des IL-6 Blutspiegels mit der Tumorgröße korreliert [42, 43]. Bei IL-6 handelt es sich um einen proangiogenetischen Faktor, welcher auch für die Tumorneoangiogenese bedeutsam ist [44]. Auch ist IL-6 ein parakriner Wachstumsfaktor für Tumorzellen [45, 46]. Das Zytokin hat die Fähigkeit, endotheliale und epitheliale Barrieren aufzulockern. *Tumor-Growth-Factor-Beta* (TGF β) hemmt den IL-6 Signalweg durch die Herunterregulierung des Transkriptionsfaktors *Signal-Transducer-And-Activator-Of-Transcription-3* (STAT3), was Anlass zu der Vermutung gibt, dass ein über TGF β laufender physiologischer Mechanismus zur Unterbindung von unkontrollierten Entzündungsreaktionen existiert [47]. Tumordinfiltrierende T-Zellen können dementsprechend die IL-6 Produktion im Kolonkarzinom über TGF β regulieren. Es gibt Hinweise darauf, dass der lösliche IL-6 Rezeptor (sIL-6R) Einfluss auf die Haftung der Tumorzellen an dem Gefäßendothel hat und somit die Ausbildung von Metastasen fördern kann [46]. Durch Doppelfärbetechnik konnte immunhistologisch nachgewiesen werden, dass die tumordinfiltrierenden T-Lymphozyten eine wichtige Quelle für IL-6 im Tumorgewebe sind [45].

1.2.5.3 IL-10

IL-10 wird in der Maus von Th2-Zellen, regulatorischen T-Zellen, B-Zellen und Keratinozyten produziert. Dieses Molekül hemmt die Expression von Zytokinen, welche im Rahmen einer Immunantwort ausgeschüttet werden. Deshalb bezeichnete man IL-10 ursprünglich als „*Cytokine Synthesis Inhibitory Factor*“ [48]. Diese inhibitorische Wirkung kann von IL-4 antagonisiert werden. Studien weisen darauf hin, dass IL-10 die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B blockieren und dadurch eine Herunterregulierung inflammatorischer Zytokine bewirken kann [49]. So ist das Zytokin dazu in der Lage, die IL-2 und IFN γ Produktion von Th1 Zellen zu hemmen. IL-10 spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der immunsuppressiven Wirkung von regulatorischen T-Zellen vom Typ 1 (Tr1). Tr1 Zellen sind regulatorische T-Zellen, welche ihre hemmende Wirkung über die Ausschüttung der Zytokine IL-10 und TGF β ausüben. Interessanterweise scheinen aktivierte T-Zellen im Gegensatz zu naiven T-Zellen unempfindlich gegenüber dem Einfluß von IL-10 zu sein. Dies liegt möglicherweise daran, dass

der IL-10 Rezeptor auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen herunterreguliert wird [50]. Gleichzeitig wurde in verschiedenen Studien und Tiermodellen nachgewiesen, dass IL-10 auch die Immunantwort fördern und somit eine effiziente Tumorbekämpfung bewirken kann. Besonders bei Transfektionsexperimenten, in welchen IL-10 exprimierende Tumorzellen im Mausmodell untersucht wurden, stellte sich heraus, dass eine IL-10 Überexpression zu einer starken, Th2 gerichteten Immunantwort mit guter Tumorbekämpfung führt [48-50]. Dies zeigt, dass die Beschreibung von IL-10 als „immunsuppressiv“ den eigentlichen Wirkungsumfang dieses Moleküls nur unzureichend beschreibt.

1.3 Differenzierungswege der T -Zellen

1.3.1 CD8+ zytotoxische T-Zellen

Naive CD8+ T-Zellen, welche sich nach Aktivierung in zytotoxische T-Zellen differenzieren, entwickeln ein zytolytisches Arsenal und können fortan bei der spezifischen Bindung ihres TCR auch ohne kostimulatorische Signale die das Fremdpeptid tragende Zelle lysieren. CD8+ T-Zellen sind eine wichtige Komponente der gegen den Tumor gerichteten Immunantwort. Die Induktion von tumorspezifischen CD8+ zytotoxischen T-Zellen ist ein Phänomen, welches der Th1 gerichteten Immunantwort zugeordnet wird. Bei einigen Tumoren des Gastrointestinaltraktes wie primären Lebertumoren, Magen- und Pankreaskarzinomen konnte nachgewiesen werden, dass die CD8+ T-Zellen die größte Untergruppe von T-Zellen unter den tumorinfiltrierenden Lymphozyten stellen [51]. Zytotoxische CD8+ T-Zellen werden als wichtige Mediatoren einer gegen den Tumor gerichteten effizienten Immunantwort betrachtet. Tatsächlich besteht eine positive Korrelation zwischen der CD8+T-Zellinfiltration von Tumorzellnestern und der Überlebenszeit von Patienten mit kolorektalem Karzinom [52]. Auch stellten Pages et al fest, dass bei Patienten ohne Hinweise auf eine frühe Metastasierung eine verstärkte Expression von Genen wie CD8 α und Granzyme B, welche für CD8+ Zellen typisch sind, bzw von Th1 spezifischen Genen wie IFN γ im Vergleich zu Patienten mit früher Metastasierung vorliegt [53].

1.3.2 CD4+ T-Zellen

Aktivierte CD4+ T-Zellen können sich die beiden großen Untergruppen der Th1 und Th2 CD4+ T-Zellen weiterentwickeln. Eine weitere wichtige Untergruppe der CD4+ T-Zellen sind die regulatorischen T-Zellen, welche immunsuppressive Eigenschaften auf-

weisen. Man unterscheidet sogenannte natürliche regulatorische T-Zellen, welche im Thymus reifen und in die Peripherie auswandern und induzierte regulatorische T-Zellen, welche ihre suppressiven Eigenschaften in der Peripherie im Rahmen einer Immunantwort entwickeln. Beide Gruppen sind möglicherweise an der Unterdrückung einer effizienten Immunantwort gegen Metastasengewebe beteiligt und sind somit von klinischem Interesse.

1.3.2.1 Natürliche regulatorische T-Zellen

CD4+CD25+T-Zellen sind eine natürlich vorkommende Untergruppe der CD4+ T-Zellpopulation, welche zwischen 1% und 5% der gesamten Lymphozytenpopulation im peripheren Blut ausmacht und im Thymus reifen. Ein kleiner Anteil dieser CD4+CD25+ T-Zellen besitzt zellkontaktabhängige, immunsuppressive Eigenschaften. Diese suppressiv wirksamen Zellen werden deshalb als regulatorische T-Zellen (Treg) bezeichnet [54].

Die Arbeitsgruppe um Casares bewies mit einer Reihe von Experimenten, dass die Untergruppe von CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen in dem BALB/c CT26 Mausmodell für die Unterdrückung einer adäquaten gegen den Tumor gerichteten Immunantwort verantwortlich sind [55]. Für die Tregs ist weiterhin die Expression von CTLA4 [56] und Foxp3 [57] typisch, so dass diese Subpopulation über die Expression von CD4, CD25, CTLA4 und Foxp3 charakterisiert werden kann.

Klinisch wurde diese Population regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut von Patienten mit epithelialen Malignomen [58], speziell bei gastrointestinalen Karzinomen [59] sowie hepatozellulären Karzinomen und kleinzelligen Lungenkarzinomen [60, 61] erhöht vorgefunden. Loddenkemper et al berichten dagegen, dass bei Patienten mit kolorektalem Karzinom die Infiltration von Tregs in das Tumorgewebe bei Patienten ohne Metastasen größer war als bei Patienten mit Metastasen. Auch konnte keine positive Korrelation zwischen dem Grad der Infiltration durch Tregs und einer günstigen Prognose festgestellt werden [62].

1.3.2.2 Induzierte regulatorische T Zellen

Die aktuelle Datenlage weist darauf hin, dass TGF β die Expression von Foxp3 in CD4+CD25- T-Zellen hervorruft und dadurch diesen Zellen ermöglicht, Eigenschaften zu erwerben, welche regulatorische T-Zellen auszeichnen [66, 67]. Dies bedeutet, dass

neben den im Thymus gereiften regulatorischen T-Zellen auch „vor Ort“ aus naiven Vorläuferzellen induzierte regulatorische T-Zellen eine Rolle bei der zellkontaktabhängigen Immunsuppression spielen könnten. [68]. Das an TGF β und Antigenstrukturen reiche Tumormilieu ist dementsprechend als günstig für die Induktion regulatorischer T-Zellen zu werten.

Eine weitere Gruppe von immunregulatorisch wirksamen T-Zellen sind die sogenannten induzierbaren regulatorischen T-Zellen, auch iTregs genannt. Diese Gruppe regulatorischer T-Zellen können sich in der Peripherie während der Immunantwort aus naiven T-Zellen entwickeln. Im Gegensatz zu den von Zellkontakt abhängigen nTregs entwickeln die iTregs ihre inhibitorische Wirkung über Zytokine. iTregs lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die Zellen der einen Gruppe vermitteln ihre immunsuppressive Wirkung vornehmlich über IL-10 und werden als Tr1 Zellen bezeichnet [69]. Die Zellen der zweiten Gruppe produzieren hauptsächlich TGF β und werden als Th3 Zellen bezeichnet [70]. Bisher wurden keine spezifischen Zellmarker für iTregs entdeckt, diese Zellgruppe wird bisher anhand ihres Zytokinprofils charakterisiert. [71]. Grundsätzlich kann man die Aussage machen, dass durch Antigenkontakt aktivierte CD4⁺ T-Zellen sich in T-Helferzellen verwandeln, sofern starke kostimulatorische Signale vorhanden sind. Werden die CD4⁺ T-Zellen dagegen mit IL-10 oder TGF β aktiviert, so differenzieren sich die Zellen in regulatorisch wirksame T Zellen [54]. Eine Untersuchung des Zytokinprofils sowie des Markers Foxp3 im Gewebe kolorektaler Lebermetastasen erlaubt somit möglicherweise auch Aussagen hinsichtlich der Populationsdynamik regulatorischer T-Zellen. Im Folgenden sollen Foxp3 und TGF β genauer besprochen werden, IL-10 wurde bereits als Zytokin der Th2 Immunantwort ein Unterkapitel gewidmet (siehe Seite 14)

1.3.2.3 Foxp3

Foxp3 stellt das Hauptregulationsgen für die Entwicklung und Funktion von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen dar. CTLA4 und CD25 sind ebenfalls Markermoleküle für CD4⁺ Treg Zellen. Neuere Forschungsarbeiten haben aber ergeben, dass diese Subpopulation von T-Zellen eindeutiger und zuverlässiger durch die exklusive Expression von Foxp3 charakterisierbar ist [57, 63, 64].

Das Foxp3 Gen kodiert für den Transkriptionsfaktor "Scurfin". Mutationen dieses Genlokus führen beim Menschen zu einer Dysregulation der Immunantworten, Polyendokrinopathien und Enteropathien. Da Foxp3 auf dem X-Chromosom zu finden ist, wird

das oben beschriebene Syndrom mit "IPEX" (*Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-Linked*) abgekürzt. Bei der Maus spricht man bei der entsprechenden Konstellation von "Scurfy" [65]. Foxp3 ist als Treg-spezifischer Marker geeignet, unter anderem da dieser Transkriptionsfaktor zumindest in differenzierten Tregs keinen starken Schwankungen ausgesetzt ist [62]. Foxp3 bietet weiterhin die Möglichkeit, zwischen Tregs und nicht suppressiv wirksamen, aktivierten CD4⁺ T-Zellen, welche ebenfalls CD25 exprimieren, zu differenzieren.

1.3.2.4 TGFβ

Die größte Quelle für TGFβ im Körper sind die Blutplättchen. TGFβ kann aber auch aus einer Vielzahl anderer Gewebe wie Milz und Knochenmark isoliert werden. TGFβ ist der stärkste bekannte Wachstumsinhibitor für viele Zellarten, unter anderem für normale und transformierte Epithel- und Endothelzellen sowie für Hepatozyten.

TGFβ hemmt die Proliferation von T-Zellen, indem es die durch IL-2 vermittelten proliferationsfördernden Signale herunterreguliert. [45]. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass durch TGFβ eine deutliche negative Wirkung auf das Tumorwachstum durch Hemmung der IL-6 Produktion hervorgerufen wird [45]. TGFβ hemmt somit nicht nur Differenzierung und Proliferation von T Zellen, sondern übt auch eine negative Wirkung auf das Tumorwachstum aus.

Des Weiteren ist TGFβ ein wichtiger Differenzierungs- und Proliferationsfaktor für regulatorische T-Zellen [67, 72]. Neuere Studien zeigten außerdem, dass TGFβ eine wichtige Rolle für die Wirkung der regulatorischen T-Zellen spielt. So wurde festgestellt, dass TGFβ die Expression von Foxp3 bei naiven murinen CD4⁺ T-Zellen induziert und damit essentiell bei der Ausbildung eines regulatorischen Phänotyps in naiven murinen CD4⁺ T-Zellen ist [73]. Weiterhin ist TGFβ das Hauptzytokin der zellkontakunabhängigen, zytokinabhängigen Th3 Zellen [71].

1.4 Angiogenese

Bei der Angiogenese handelt es sich um einen biologischen Prozeß, in welchem Endothelzellen aus bereits existierenden Gefäßen aussprossen, um neue Gefäßstrukturen zu bilden.

Sogenannte proangiogenetische Faktoren bestimmen das Wachstum oder die Rückbildung von Gefäßen. Zu diesen proangiogenetischen Faktoren gehören VEGF, FGF und

Angiopoetin (Ang) sowie Chemokine. Das Hauptziel dieser Faktoren sind Endothelzellen der postkapillären und kleinen terminalen Venulen [74]. Ein wachsender Tumor aktiviert die Gefäße in seinem Umfeld durch proangiogenetische Faktoren und induziert die Ausbildung eines versorgenden Gefäßsystems. Der Übergang des Tumors in einen angiogenetisch aktiven Phänotyp wird als „*angiogenic switch*“ bezeichnet. Endothelzellen werden durch die proangiogenetischen Faktoren aktiviert. Sie wandern und proliferieren in Richtung des wachsenden Tumors [75]

1.4.1 Angioneogenese und Tumorwachstum

Folkman et al haben nachgewiesen, dass Tumorwachstum abhängig von angiogenetischen Vorgängen ist [76]. Rasches, exponentiell verlaufendes Wachstum setzt erst mit Angioneogenese ein. Bietet das Umfeld den Tumorzellen keine Möglichkeit zur Gefäßneubildung, ist die Größe des Tumorknotens auf 1-2 mm begrenzt [10]. Die Bedeutung der Neoangiogenese bei der Etablierung von Metastasen ist experimentell in zahlreichen Mausmodellen nachgewiesen worden [77-79].

Tumorgefäße zeigen viele strukturelle und funktionelle Abnormalitäten mit chaotisch wirkender variabler Architektur. Die Zellen, welche Tumorblutgefäße auskleiden, zeigen meist nur wenig Reaktion auf vasoaktive Substanzen. Dies hat zur Folge, dass die Gefäße stark durchlässig sind und nicht geeignet sind, um sauerstoffreiches Blut zu transportieren. Diese Nachteile sind höchstwahrscheinlich durch endotheliale Fenestration sowie einen Mangel an glatter Muskulatur in der Gefäßwand bedingt [74]. Zahlreiche Untersuchungen haben ergeben, dass die Tumorgefäßdichte ein Prognosefaktor für Patienten mit kolorektalem Karzinom ist. Eine erhöhte Gefäßdichte korreliert mit ungünstiger Prognose und niedrigen Überlebenszeiten [77, 80, 81]

1.4.2 VEGF

Die *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) Familie umfasst sechs Glykoproteine, welche als VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und *Placental-Growth-Factor* (PlGF) bezeichnet werden. Es handelt sich um angiogenetische Faktoren, welche an hochaffine, spezifische Tyrosin-Kinase Rezeptoren binden. Von diesen Faktoren wird VEGF-A im Gewebe von kolorektalen Karzinomen am stärksten exprimiert [82]. VEGF-A tritt in sechs bekannten Splice-Varianten auf, die vier am stärksten exprimierten Isoformen weisen eine Länge von 121, 165, 189 sowie 206 Aminosäuren auf.

VEGF-A 121 wird frei sezerniert, während VEGF-A 189 und 206 in der extrazellulären Matrix gebunden werden. VEGF-A 165 liegt sowohl in löslicher als auch in gebundener Form vor [83].

In Mäusen wirkt sich sowohl die homozygote als auch die heterozygote Deletion des VEGF Gens bereits in der Embryonalentwicklung tödlich aus. Betroffene Tiere weisen schwere kardiovaskuläre Abnormalitäten auf. VEGF ist ein hochspezifisches Mitogen für Gefäßendothelzellen und hat eine Wirkung auf die Gefäßpermeabilität, welche 50000-fach stärker ist als die Wirkung des Histamins [84]. Hanrahan et al zeigten in umfangreichen Untersuchungen, dass die Tumorzellen bereits in frühen Stadien der Kolonkarzinomentwicklung die Fähigkeit zur Überexpression von VEGF erlangen. So findet der „*angiogenic switch*“ von VEGF-A bereits im Adenomstadium statt, eine weitere Hochregulierung der VEGF-A Expression findet beim Übergang vom Adenom zum Karzinom nicht statt [82, 85]. Erhöhte VEGF-Expression ist beim Kolonkarzinom mit Metastasenbildung assoziiert. Die VEGF mRNA Expression ist bei Patienten mit multiplen Metastasen sowohl im Primärtumor als auch im Metastasengewebe signifikant höher gegenüber Patienten mit solitären Metastasen [86]. Die Datenlage deutet darauf hin, dass die Überexpression von VEGF deutlich mit einer erhöhten Rezidivgefahr nach Tumorresektion in kurativer Absicht vergesellschaftet ist [87].

VEGF-Rezeptoren werden fast ausschließlich auf Endothelzellen exprimiert; auf den Endothelzellen vieler solider Tumoren findet eine Überexpression statt. Neben seinen proangiogenetischen Eigenschaften ist VEGF auch ein Überlebensfaktor, der bei Hypoglykämie und Hypoxie induziert werden kann. VEGF ist ferner dazu in der Lage, das Überleben von Endothelzellen in Anwesenheit des Apoptose-induzierenden TNF α zu sichern [79].

2 Fragestellung

Folgende Fragen sollen in dieser Arbeit beantwortet werden:

1. Gibt es bei der Entstehung und dem weiteren Wachstum von Kolonkarzinommetastasen in der Leber charakteristische Zytokinprofile zu beobachten? Sind dabei Zeichen einer Th1 oder Th2 gerichteten Immunantwort festzustellen?
2. Welche zellulären Infiltrationsmuster aus CD4+ und CD8+ T-Zellen ergeben sich in den kolorektalen Lebermetastasen?
3. Wie verhält sich die Subpopulation der CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen innerhalb der Gesamtheit der tumorinfiltrierenden Zellen im zeitlichen Verlauf? Gibt es Hinweise auf die Induktion regulatorisch wirksamer T-Zellen in den kolorektalen Lebermetastasen? Ist das Zytokinprofil günstig für die Induktion regulatorisch wirksamer T-Zellen?
4. Welche pro- und antiangiogenetischen Faktoren werden im Lebermetastasengewebe exprimiert? Ändert sich dieses Muster zeitabhängig? Wie stellt sich speziell die Expression der verschiedenen Isoformen von VEGFA im zeitlichen Verlauf dar?
5. Welche Schlußfolgerungen sind aus den getroffenen Beobachtungen zur Tumorimmunantwort im Tumorgewebe für die Klinik zu treffen?

3 Material und Methoden

3.1 Tiere

Verwendet wurden weibliche BALB/c Mäuse im Alter von 6-8 Wochen (Fa. Harlan-Winkelmann, Borchel, Deutschland). Die Tiere wurden unter konventionellen Bedingungen in Makrolonkäfigen, welche in Laminar Airflow Schränken (Scanbur, Koge, Dänemark) untergebracht waren, bei konstanter Temperatur unter Gewährleistung eines spezifischen pathogenarmen Umfeldes gehalten. Alle Mäuse erhielten im Handel erhältliches Tierfutter (Altromin Pressfutter, Altromin GmbH, Lage) und Wasser ad libitum. Gemäß den Richtlinien unseres Institutes wurden die Tiere während des Tages einem Licht/Dunkel Zyklus von jeweils 12 Stunden ausgesetzt. Die Protokolle für die Tierexperimente wurden von dem Tierversuchs-Komitee der Universität Würzburg und der Landesregierung genehmigt.

3.2 Versuchsaufbau

Drei Mäuse erhielten PBS-Puffer in die Pfortader injiziert und dienten bei unverändertem Ergebnisspektrum PBS-injektierter Tiere an den Tagen 9, 14 und 19 in der vorliegenden Arbeit als Kontrolltiere (n=3). 15 Versuchstieren wurden an Tag 0 eine 1×10^6 CT26.WT Zellen in die Pfortader injiziert (n=15). Diese Tiere wurden in drei Gruppen mit jeweils fünf Tieren eingeteilt, welche zu verschiedenen Zeitpunkten explantiert wurden. Die Tiere der Gruppe A wurden nach 9 Tagen, die Tiere der Gruppe B nach 14 Tagen und die Tiere der Gruppe C nach 19 Tagen getötet. Ein Tier aus der Gruppe C verstarb vor Ablauf der 14 Tage. Während der Beobachtungszeit wurden die Versuchstiere regelmäßig gewogen und inspiziert sowie die erhobenen Befunde dokumentiert.

Gruppe	Anzahl der Tiere [n]	Nachbeobachtungszeit [Tage]	Injizierte Zellzahl
A	5	9	1×10^6
B	5	14	1×10^6
C	4	19	1×10^6
Kontrolle	3	0	0

Tabelle 3: Versuchsgruppen mit Nachbeobachtungszeit und Zahl injektierter Zellen

3.3 Zellkultur mit CT26WT

CT26 ist eine N-nitroso-N-methylurethan (NNMU) induzierte, nichtdifferenzierte Kolonkarzinom-Zelllinie, welche kloniert wurde und die Bezeichnung CT26.WT erhielt. CT26.WT Zellen wirken in BALB/c Mäusen tumorbildend. Die in den Versuchen eingesetzte CT26.WT Zelllinie wurde von LGC Standards (Wesel, Deutschland) generiert.

Das Zellkultur Nährmedium setzte sich wie folgt zusammen:

- 450 ml glutaminfreies RPMI 1640 Medium (GIBCO/Invitrogen Corporation, Großbritannien)
- 50 ml inaktiviertes FCS (Mycoplasma and Virus screened, GIBCO/Invitrogen Corporation, Großbritannien)
- ml 200 mM Glutamin (Biochrom AG, Berlin)
- ml Penicillin/Streptomycin (1000 U/10000 µg/ml, Biochrom AG, Berlin)

Der Zellkultur Puffer wurde wie folgt hergestellt:

- 450 ml Molbio Grade Wasser (DNase, RNase free, GIBCO, Invitrogen Corporation, Großbritannien)
- 50 ml 10x PBS (D-PBS +CaCl₂+Mgcl₂, GIBCO, Invitrogen Corporation, Großbritannien)
- 10 ml sterilfiltriertes Penicillin/Streptomycin (1000 U/10000 µg/ml, Biochrom AG, Berlin)

Die Zellen wurden in 800 ml Zellkulturflaschen (EasYflask, 175cm², Nunc, Wiesbaden,) in einem Brutschrank (HeraCell, Kendro (Heraeus), Hanau) bei einer konstanten Temperatur von 37°C und bei 5% CO₂ Anteil kultiviert und in Form eines Monolayers angezüchtet. Die Flaschen wurden zweimal pro Woche unter einem Lichtmikroskop (Axiovert 25, Carl Zeiss Mikroskopie, Jena) untersucht, um den Grad der Zellkonfluenz festzustellen und um Kontamination mit Bakterien oder Pilzen auszuschließen. Sämtliche Arbeiten mit CT26.WT Zellen wurden an einer Sterilbank (HeraSafe, Kendro (Heraeus), Hanau) durchgeführt.

Überschüssige Zellen wurden in regelmäßigen Abständen eingefroren. Jeweils 5x10⁶ CT26.WT Tumorzellen, suspendiert in 1,5 ml inaktiviertem FCS mit 10%DMSO (minimal 99,5% GC, SIGMA-Aldrich, Steinheim), wurden in ein 2 ml Cryoröhrchen

(Cryo.s, Greiner Bio-One, Frickenhausen) überführt. Die Zellen wurden zunächst einige Tage bei -20°C aufbewahrt, bevor sie in -80°C Stickstoffbehälter gelagert wurden.

Splitting von CT26.WT Zellkulturen

Die Zellkulturen wurden in Abständen von drei bis vier Tagen unter einem Lichtmikroskop (Axiovert 25, Carl Zeiss Mikroskopie, Jena) durchgemustert und anschließend in einem Verhältnis von 1:4 gesplittet. Zunächst wurde das alte Zellmedium verworfen und die Zellkultur mit 10 ml frischem PBS Puffer (D-PBS, $+\text{CaCl}_2/+\text{MgCl}_2$, GIBCO, Invitrogen Corporation, Großbritannien) gewaschen. Um die Zelladhäsionen innerhalb des Monolayers aufzulösen wurden pro 15 cm^2 Flasche 5ml Trypsin/EDTA Lösung (0,05%/0,02% (w/v) in PBS (w/o), $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, Biochrom AG, Berlin) auf dem Flaschenboden verteilt und die Zellen anschließend 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationsphase wurde das Zell/Trypsin Gemisch mit 7 ml Medium versetzt. Mit Hilfe einer Pipette wurden die die noch am Plastik verhafteten Zellen abgelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension mit der Pipette einige Male resuspendiert um eine zuverlässige Vereinzelnung der CT26.WT Zellen zu gewährleisten. Je 3 ml der Zellsuspension wurden in eine Zellkulturflasche mit 37 ml Medium gegeben um bei einem Gesamtvolumen von 40 ml ein Splitverhältnis von 1:4 zu erreichen. Die Zellkulturflaschen wurden wieder in den Brutschrank gelegt. Unter diesen Kultivationsbedingungen bildet sich innerhalb von 3 bis 4 Tagen auf dem Flaschenboden ein durchgehender Zell-Monolayer aus.

Die Vorbereitung der CT26.WT Zellen zur Injektion wurde wie folgt vorgenommen

Zunächst wurde das alte Medium verworfen und die Zellen mit 10 ml PBS Puffer gewaschen. Anschließend wurden jeder Flasche 5 ml Trypsin/EDTA Lösung zugesetzt. Nach 10 Minuten Inkubationszeit wurden 7 ml Medium dazugegeben und die Zellen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in 50 ml Cellstar Behältern (Greiner Bio-one, Frickenhausen) gesammelt und bei 324 g 10 Minuten zentrifugiert (Multifuge 3S-R, Kendro (Heraeus), Hanau). Das entstandene Zellpellet wurde sorgfältig in 10ml resuspendiert und die Lösung mehrmals durch einen $70\text{ }\mu\text{m}$ Nylonsieb (BD Falcon, Erembodgem, Belgien) gefiltert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in exakt 5ml Medium resuspendiert. $10\text{ }\mu\text{l}$ der Zellsuspension wurden in $90\text{ }\mu\text{l}$ Trypanblau (0,4%, SIGMA-Aldrich, Steinheim) gegeben, sorgfältig vermischt und die Zellkonzentration mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Unter einem

Lichtmikroskop (Axiostar plus, Carl Zeiss Mikroskopie, Jena) wurden bei 10-facher Vergrößerung die Zellen innerhalb von 4 Quadraten ausgezählt. Die Gesamtzellzahl in der 5 ml Zellsuspension wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl}_{\text{gesamt}} = \text{Zellzahl}_{4\text{Quadrat}} \times 4 \times 10(\text{Färbungsverdünnung}) \times 10^4(\text{Kammerfaktor})$$

Die Zellsuspension wurde ein weiteres Mal zentrifugiert und das Zellpellet danach in einem der gewünschten Zellkonzentration angepaßten Volumen resuspendiert. Die Zelllösung wurde in Eppendorf-Cups aliquotiert und bis zu der Injektion in die Tiere auf Eis verwahrt. Bei den durchgeführten Eingriffen lagen zwischen der Aufbereitung der Zellen und dem Injektionsvorgang in die Tiere maximal zwei Stunden.

3.4 Tumorzellinjektion

Für die Dauer des operativen Eingriffes wurden die Tiere mit Isofluran in Narkose gehalten. Für die Tumorzellinjektion wurden jeweils 1×10^6 CT26.WT Zellen in 150µl RPMI Medium (GIBCO/Invitrogen Corporation, Großbritannien) suspendiert. Die Zellsuspension wurde in einer Insulinspritze (Omnican 0,30x12mm, B. Braun Petzold GmbH, Melsungen) aufgezogen.

Den Tieren wurde jeweils an Tag 0 1×10^6 Tumorzellen über die Pfortader in die Leber injiziert. Hierfür wurde der Bauchraum der Versuchstiere unter einem Operationsmikroskop eröffnet. Der Dünndarm wurde vorsichtig mobilisiert und zur Seite verlagert, so dass der Blick auf die Pfortader frei war. Die Tumorzellinjektion erfolgte mit Hilfe einer 32G Nadel direkt in die Pfortader. Nach sorgfältiger Blutstillung mittels Wattetupfer wurden Bauchmuskulatur und Haut der Versuchstiere separat mit Einzelknopfnähten verschlossen (8-0, Surgipro II, Syneture, Norwalk, USA). Es erfolgte eine Kontrolle der Naht auf Dichtigkeit.

3.5 Organentnahme

Im Rahmen der Explantation wurde den Versuchstieren unter Narkose Milz und Leber entnommen. Die Mäuse wurden anschließend mittels Herzschnitt rasch getötet.

Das entnommene Gewebe wurde wie folgt asserviert: Zwei Resektate aus dem zentralen Bereich der Lebermetastasen wurden in RNAlater Reagenz (Applera Deutschland GmbH, Darmstadt) in 2ml Cryoröhrchen (Cryo.s, Greiner Bio-One, Frickenhausen) ge-

legt und zunächst über zwei Tage bei 4°C in einem Kühlschrank aufbewahrt. Anschließend wurde das Probematerial bis zur Untersuchung bei -80°C gelagert. Weiterhin wurden Lebermetastasengewebe in Tissue Tek (TissueTek, Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Niederlande) zur weiteren immunhistochemischen Aufarbeitung eingelegt und in Stickstoff 30 Minuten schockgefroren. Das schockgefrorene Metastasengewebe, die TissueTek Blöcke und die RNAlater Proben wurden bei -80°C gelagert.

3.6 RNA Extraktion

Das in RNAlater eingefrorene Lebermetastasengewebe wurde vorsichtig aufgetaut. Nach Verflüssigung des RNAlater wurden die Gewebstücke dem Cryoröhrchen entnommen, auf einem Bett von Zellstoff sanft getrocknet und das Gewicht anschließend in einer sterilen Petrischale (Falcon 100x20 mm, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) mittels Waage (Sartorius CP224S, Sartorius, Göttingen) bestimmt. Das Gewebe wurde mit einem sterilen Skalpell in jeweils 30 µg schwere Stücke zerteilt. Je 30 µg Zellmaterial wurden in 350 µl Lysepuffer eingelegt und mit Hilfe einer Schwingmühle (Qiagen TissueLyser, Retsch GmbH&Co KG, Haan) aufgeschlossen. Anschließend wurde die totale RNA mit Hilfe des Qiagen Minikits (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden) aus den Proben isoliert. Die Isolierung der RNA erfolgte hierbei gemäß den Angaben des Herstellers. Nach erfolgter Isolierung wurde die Reinheit der RNA Lösung über eine photometrische Messung kontrolliert (Bio-Photometer 6131, Eppendorf, Hamburg). Sowohl die ermittelte RNA-Konzentration in µg/ml als auch die Ratio 260/280 nm, welche als Parameter für die Reinheit des RNA Eluats dient, wurden dokumentiert.

Im Anschluß an die RNA Extraktion erfolgte die cDNA Synthese auf der Grundlage der frisch isolierten RNA. Hierfür wurde ein Synthese-Kit eingesetzt (iScript cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad, Hercules, USA). Die Reagenzien wurden in 0,5 ml Tubes (Eppendorf, Hamburg) pipettiert. Nach Fertigstellung der 60 µl Ansätze wurden die Tubes in einen Mastercycler (Mastercycler, Eppendorf, Hamburg) eingesetzt und das Syntheseprogramm durchlaufen. Die hergestellte cDNA wurde photometrisch gemessen, mit RNase freiem H₂O auf eine Konzentration von 50 ng/µl verdünnt und in 1,5 ml Tubes (Eppendorf, Hamburg) pipettiert. Die cDNA Lösungen sowie die RNA Stocks wurden in einem Gefrierschrank bei -20°C verwahrt.

3.7 Methodik der PCR

Die *Polymerase Chain Reaction* (PCR) ist ein Verfahren welches eine hocheffiziente Vervielfältigung für genau definierte DNA-Abschnitte ermöglicht. Für die Durchführung einer PCR benötigt man eine DNA Matritze, ein äquimolares Gemisch von *forward* und *reverse* Primern, Nucleotide sowie eine DNA Polymerase. Zu Beginn eines Amplifikationszyklus wird zunächst die doppelsträngige DNA aufgeschmolzen, so dass die DNA Matritze in Form von Einzelsträngen vorliegt. Anschließend wird der Reaktionsansatz bis zum Erreichen der sogenannten Annealing Temperatur aufgewärmt. Bei der Annealing Temperatur handelt es sich um die Temperatur, bei welcher sich die Primer-Oligonukleotide optimal an die DNA Einzelstränge anlagern. Nach Anlagern der Primer an die DNA Einzelstränge wird der Reaktionsansatz auf die optimale Synthesetemperatur gebracht. Hierdurch binden die DNA Polymerase Moleküle an die Primer und es erfolgt die Synthese von zum Matritzenstrang komplementären Nukleotidketten. Dieser Schritt wird als Elongation bezeichnet. Nach Abschluß der Elongationsphase werden die DNA Doppelstränge durch Erhitzen wieder aufgeschmolzen, so dass ein neuer Amplifikationszyklus beginnen kann. Im Idealfall findet im Rahmen eines Amplifikationszyklus eine Verdoppelung der DNA-Menge statt, was zu einem exponentiellen Verlauf der DNA Menge führt.

3.8 Real-Time PCR

Die Real-time PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, welche auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion beruht und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während der Amplifikationszyklen durchgeführt. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR Produkte zu. Es gibt verschiedene Methoden, die Menge der vorliegenden DNA über Fluoreszenzsignale sichtbar zu machen. Unter anderem werden interkalierende Farbstoffe, TaqMan Sonden, Molecular Beacons, Scorpion-Primer und Lux-Primer eingesetzt. Die einfachste Möglichkeit der Quantifizierung des PCR Produktes ist hierbei der Einsatz von interkalierenden Farbstoffen wie z.B. SYBR Green. SYBR Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, dessen Fluoreszenz durch die Bindung an doppelsträngige DNA intensiv ansteigt. In ungebundenem Zustand ist die Fluoreszenz dieses Markers vernachlässigbar. Dieser Fluoreszenzfarbstoff ist allerdings nicht produktspezifisch, d.h. SYBR Green Moleküle lagern sich in gleicher Weise

an gewünschtes Amplifikationsprodukt und an eventuell anfallendes Fehlerprodukt an. Deshalb wird nach jeder Real Time PCR Analyse anhand der Schmelzkurve überprüft, ob „sauberes“ Amplifikat vorliegt. Im Rahmen der Schmelzkurvenanalyse wird die doppelsträngige DNA zunächst aufgeschmolzen. Das Aufschmelzen der DNA führt dazu, dass das Fluoreszenzsignal zunächst aufgehoben wird. Anschließend findet eine allmähliche Absenkung der Temperatur unter Registrierung des Fluoreszenzsignals statt. Wenn die für das jeweilige Amplifikationsprodukt spezifische Temperatur erreicht wird, bilden sich wieder DNA Doppelstränge aus, was zu einem sprunghaften Anstieg der Fluoreszenz führt. Je reiner das Amplifikat, desto steiler ist der Kurvenverlauf der Schmelzkurve und desto schmaler fällt die Spitze der Schmelzkurve aus.

3.8.1 Verwendete Materialien

Master Mix:

Für die Real-Time PCR Untersuchungen wurde der SybrGreen Master Mix von Applied Biosystems eingesetzt. Folgende Reagenzien sind in dem Kit enthalten:

- DyNAmo hot start Polymerase
- SYBR Green I
- Optimierter PCR Puffer
- 5 mM MgCl₂
- dNTP Mix

cDNA

Für die Real-Time PCR wurden die cDNA Lösungen verwendet, welche aus den RNA Extrakten der Gewebeproben hergestellt wurden. Die cDNA Konzentration lag dementsprechend standardmäßig bei 50 ng/μl.

Primer

Die Sequenzen für die Primer von IL-2, IL-6, IL-10, IL-18, TNF α , IFN γ , TGF β , B7-H1, PD-1, Foxp3, Fas, Fas-Ligand sowie VEGFA1-4 wurden aus fachspezifischer Literatur entnommen und von MWG-Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert und als Trockensubstanz geliefert.

Die Trockensubstanz wurde in mol bio grade H₂O aufgelöst und als Stocklösung in einer Konzentration von 100 pmol/μl bei -20°C gelagert. Für die Real-Time-PCR wurde stets mit Molbio grade H₂O eine Arbeitslösung von 10 pmol/μl hergestellt.

Die Primer für CD4, CTLA4 und IL-4 wurden von Qiagen erstanden (QuantiTect Primer Assay, Qiagen, Hilden).

Sequenzen der von MWG Biotech synthetisierten Primer:

GAPDH	Forward	5'-	GGT GAA GGT CGG TGT GAA CGG A	- 3'
GAPDH	Reverse	5'-	TGT TAG TGG GGT CTC GCT CCT G	- 3'
IL-2	Forward	5'-	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT	- 3'
IL-2	Reverse	5'-	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C	- 3'
IL-6	Forward	5'-	GAG GAT ACC ACT CCC AAC AGA CC	- 3'
IL-6	Reverse	5'-	AAG TGC ATC ATC GTT GTT CAT ACA	- 3'
IL-10	Forward	5'-	CCA GTA CAG CCG GGA AGA CA	- 3'
IL-10	Reverse	5'-	CTC TGG CCG ACT GGG AAG T	- 3'
IL-18	Forward	5'-	CAG GCC TGA CAT CTT CTG CAA	- 3'
IL-18	Reverse	5'-	TCT GAC ATG GCA GCC ATT GT	- 3'
IFN-gamma	Forward	5'-	CCT CAT GGC TGT TTC TGG CTG TTA	- 3'
IFN-gamma	Reverse	5'-	CAT TGA ATG CTT GGC GCT GGA CC	- 3'
TNF-alpha	Forward	5'-	GAA AGC ATG ATC CGC GAC GTG GA	- 3'
TNF-alpha	Reverse	5'-	TAC GAC GTG GGC TAC AGG CTT G	- 3'
TGF-beta1	Forward	5'-	CAC TGA TAC GCC TGA GTG	- 3'
TGF-beta1	Reverse	5'-	GTG AGC GCT GAA TCG AAA	- 3'
TGF-beta total	Forward	5'-	TGA CGT CAC TGG AGT TGT ACG G	- 3'
TGF-beta total	Reverse	5'-	GGT TCA TGT CAT GGA TGG TGC	- 3'
CD8-alpha	Forward	5'-	CCG TTG ACC CGC TTT CTG T	- 3'
CD8-alpha	Reverse	5'-	CGG CGT CCA TTT TCT TTG GAA	- 3'
PD-1	Forward	5'-	TTC ACC TGC AGC TTG TCC AA	- 3'
PD-1	Reverse	5'-	TGG GCA GCT GTA TGA TCT GG	- 3'
B71-H1	Forward	5'-	AAG CCT CAG CAC AGC AAC TT	- 3'
B71-H1	Reverse	5'-	ACA TCA TTC GCT GTG GCG TT	- 3'
Fas	Forward	5'-	TGC TCC CAG CTG CAG GC	- 3'
Fas	Reverse	5'-	GCC CGG TAG CTC TGG GTG TA	- 3'
Fas-Ligand	Forward	5'-	CAG CTC TTC CAC CTG CAG AAG G	- 3'
Fas-Ligand	Reverse	5'-	AGA TTC CTC AAA ATT GAT CAG AGA	- 3'
Foxp3	Forward	5'-	CCC AGG AAA GAC AGC AAC CTT	- 3'
Foxp3	Reverse	5'-	TTC TCA CAA CCA GGC CAC TTG	- 3'
VEGF-A1	Forward	5'-	GCC AGC ACA TAG GAG AGA TGA GC	- 3'
VEGF-A1	Reverse	5'-	CGG CTT GTC ACA TTT TTC TGG	- 3'
VEGF-A2	Forward	5'-	GCC AGC ACA TAG GAG AGA TGA GC	- 3'
VEGF-A2	Reverse	5'-	CAA GGC TCA CAG TGA TTT TCT GG	- 3'
VEGF-A3	Forward	5'-	GCC AGC ACA TAG GAG AGA TGA GC	- 3'
VEGF-A3	Reverse	5'-	AAC AAG GCT CAC AGT GAA CGC T	- 3'
VEGF-A4	Forward	5'-	TTA CTG CTG TAC CTC CAC C	- 3'
VEGF-A4	Reverse	5'-	ACA GGA CGG CTT GAA GAT G	- 3'

Tabelle 4: Sequenzen der Primer Oligopeptide

Reaktionsansatz für MWG Biomol Primer:

Volumen [µl]	Reagenz
3	cDNA Lösung
1	Primerlösung
6,5	H ₂ O
12,5	SYBR Green

Tabelle 5: Reaktionsansatz MWG Biomol Primer

Standardmäßig wurde mit 23 µl Ansätzen gearbeitet. Pro Ansatz wurden 3µl cDNA Lösung verwendet. Dies entspricht 150 ng cDNA und ergibt eine Template-Konzentration von 6,52ng/µl. Gemäß Hersteller des PCR-Kits sollte die Template Konzentration 10ng/µl nicht übersteigen. Pro Ansatz wurde 1µl Primer-Arbeitslösung eingesetzt. Dies entspricht einer Konzentration von 0,43pmol/µl bzw 0,43 µM. Nach Herstellerangaben liegt die optimale Primerkonzentration gewöhnlich zwischen 0,1 und 1µM, empfohlen werden 0,3µM. Schließlich enthält jeder Ansatz 12,5 µl SYBR Green. Dies ergibt in etwa eine Verdünnung des SYBR Greens von 1:2. Dies entspricht den Vorgaben des Herstellers. Der Reaktionsansatz wird durch die Zugabe von 6,5 µl H₂O auf das gewünschte Volumen von 23 µl gebracht. Bei unseren Versuchen wurde das DNA Template als letzte Komponente zu dem Reaktionsgemisch dazugegeben.

Reaktionsansatz für Qiagen Primer:

Volumen [µl]	Reagenz
2	cDNA Lösung
2,2	Primerlösung
6,8	H ₂ O
11	SYBR Green

Tabelle 6: Reaktionsansatz Qiagen Primer

Gemäß Herstellerempfehlungen wurde bei den Quiagen Primern eine Template Konzentration < 150 ng eingesetzt. Die Primerlösung wurde somit in dem 22 µl Reaktionsgemisch entsprechend der Vorgaben des Herstellers im Verhältnis von 1:10 verdünnt.

Die Real-Time PCR wurde unter Einsatz des Opticon Monitor (Opticon 2, MJ Research) durchgeführt.

3.8.2 Auswertung der PCR Daten

Die Fluoreszenzkurve bei einer Real-Time PCR zeigt ab einem bestimmten Punkt eine exponentielle Zunahme. Innerhalb dieses exponentiellen Bereiches kann man davon ausgehen, dass das DNA Produkt pro Zyklus um den gleichen Faktor anwächst. Im Idealfall findet mit jedem Amplifikationszyklus eine Verdoppelung der DNA Menge statt. In diesen exponentiellen Bereich wird ein willkürlich bestimmter Schwellenwert, der sogenannte „threshold“, gelegt. Die Quantifizierung erfolgt immer in diesem exponentiellen Bereich, also in der Reaktionsphase, in welcher die Fluoreszenzwerte deutlich über dem Hintergrundlevel liegen, aber noch nicht so viele Zyklen abgelaufen sind, dass Reaktionskomponente knapp werden [88]. Mit Hilfe des *Threshold* wird der C(t) Wert von jedem Ansatz bestimmt. Der C(t) Wert besagt, wieviele Zyklen in einem bestimmten Well stattfinden mußten, bis der Threshold erreicht wurde. Wird eine relative und keine absolute Quantifizierung durchgeführt, so kann ein C(t) Werte nicht für sich alleine gewertet werden, sondern muß immer im Vergleich zu anderen Werten beurteilt werden. Eine anerkannte Methode der relativen Quantifizierung besteht darin, die C(t) Werte der ausgetesteten Gene gegen einen internen Standard zu vergleichen. Als interner Standard bieten sich die sogenannten "*housekeeping genes*" an, also Gene, von denen bekannt ist, dass sie in allen Zellen konstitutiv exprimiert werden. Als interner Standard wurde stets GAPDH verwendet, also ein klassisches *Housekeeping Gene*, welches als Referenzgen für Untersuchungen am kolorektalen Karzinom geeignet ist [89]. Gegen die Basisexpression des Referenzgenes werden die anderen Gene mit Hilfe des sogenannten $\Delta C(t)$ Wertes verglichen. Der $\Delta C(t)$ Wert berechnet sich folgendermaßen:

$$\Delta C(t) = C(t)_{\text{Target Gene}} - C(t)_{\text{Housekeeping Gene}}$$

Ein $\Delta C(t) = 4$ bedeutet, dass ein bestimmtes Target Gene den Threshold vier Zyklen nach dem Housekeeping Gene erreicht hat. Geht man davon aus, dass pro Zyklus eine Verdoppelung des Genmaterials stattfindet, so kann man darauf schließen, dass ursprünglich $2^4 = 16$ x mehr Housekeeping-Gen DNA im Ansatz vorhanden war als Target-Gen DNA. Bei sämtlichen Real-Time PCR Untersuchungen wurde dasselbe GAPDH Gen als interner Standard verwendet.

3.8.3 Darstellung der Ergebnisse: Berechnung des Fold Factors

Im Rahmen der Auswertung wurden die Werte der behandelten Mäuse gegen die Werte der Kontrollgruppe verglichen. Bei den Kontrolltieren handelt es sich um Versuchstiere, welche unter den selben Bedingungen wie die behandelten Mäuse gehalten wurden, aber keine Manipulation erfuhren.

Zunächst wurden die $\Delta C(t)$ Werte für die Mäuse aus der Kontrollgruppe berechnet. Hierfür wurde für jedes Zielgen der Mittelwert aus den $\Delta C(t)$ Werten der drei Kontrolltiere errechnet. Dieser Mittelwert wurde als Vergleichsbasis für die behandelten Tiere verwendet. Für jedes Versuchstier und jedes Zielgen wurde der spezifische Fold Faktor berechnet. Anschließend wurde aus den Einzelwerten der Versuchstiere der Fold Factor-Mittelwert für jede Versuchsgruppe errechnet. Der Foldfaktor bezieht sich auf den $\Delta C(t)$ Mittelwert der Kontrolltiere und berechnet sich auf folgende Weise:

$$\text{Fold Factor} = 2^{-(\Delta C(t)\text{Behandelt} - \Delta C(t)\text{Kontrolle})}$$

Diese Art der Berechnung wird auch als $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ -Methode bezeichnet. Bei dieser Methode geht man davon aus, dass alle Reaktionen mit maximaler und gleichbleibender Effizienz ablaufen [90].

Gilt Fold-Faktor = 3, so bedeutet dies, dass das Zielgen in den behandelten Tieren dreimal stärker exprimiert war als in den Kontrolltieren. Ein Foldfaktor von 1 zeigt dagegen, dass das Zielgen in Kontrolltieren und behandelten Tieren in gleichem Maße exprimiert wird. Für die Darstellung unserer Ergebnisse wurde innerhalb einer Behandlungsgruppe der Mittelwert der berechneten Fold Faktoren bestimmt und die Standardabweichung der Foldfaktoren kalkuliert. Mit dem T-Test wurden die Werte der drei Versuchsgruppen gegeneinander verglichen und auf signifikante Unterschiede untersucht. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sowie hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,01$) wurden tabellarisch aufgelistet und durch Schattierung der Zelle gekennzeichnet.

3.9 Immunhistologische Analyse

Direkt nach der Organentnahme wurden Stücke der Lebermetastasen in TissueTek eingebettet, in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend in einem Kühlschrank bei -80 Grad C verwahrt. Von den Gewebelöcken wurden für die immunhistochemischen

Untersuchungen 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Es wurden zuerst Einzelfärbungen, anschließend Doppelfärbungen an Maus-Lebergewebe durchgeführt, um die Qualität der Antikörper (AK) und deren Konzentration (in µg/ml) für eine optimierte Reaktion mit dem Gewebe auszutesten. Zudem wurde in der Vorbereitungsphase ermittelt, welcher AK mit welchem Markerenzym, entweder Meerrettichperoxidase (HRP, Horseradish Peroxidase) oder alkalische Phosphatase (AP), die beste Bindung darstellt.

Durch Einfachfärbungen wurden IL-2, IL-4, IL-10, TGFβ, IFNγ, TNFα, VEGF, VEGF-Rezeptor, Fas-Ligand und Fas dargestellt. Die Doppelfärbetechnik wurde bei den Markerkombinationen CD4/CD8, CD4/CD25, CD4/CTLA4 sowie CD4/Foxp3 eingesetzt.

Tabelle 8 gibt einen Überblick über die verwendeten Primär-AK, deren Antigen mit Funktion sowie über Zellen die dieses Antigen exprimieren. Dazu passende Sekundärantikörper finden sich in Tabelle 9.

Antikörper	Firma	Verdünnung
IL-2	Biolegend (San Diego) 503811 Clone JES6-5H4;rat	1:50
IL-4	Serotec (Oxford) (MCA1492) Clone BVD6-24G2;rat	1:100
IL-10	Serotec (Oxford) (MCA1302G) Clone JES5-2A5;rat	1:100
TNFα	Serotec (Oxford) MCA1488 Clone ; rat	1:50
TGFβ	Abcam (Cambridge, UK) ab25121-100;rabbit	1:50
IFNγ	Abcam (Cambridge, UK) ab10744-25;goat	1:50
VEGF	Santa Cruz (A-20): sc-152; rabbit	1:50
VEGFR3	eBioscience 14-5988-82 Clone AFL4; rat	1:50
CTLA-4	eBioscience 14-1522-85 Clone UC10-4B9;arm.ham.	1:50
FOXP3	eBioscience 14-5773-82 Clone FJK-16s;rat	1:50
CD25	eBioscience 14-0251 Clone PC61.5;rat	1:50
CD4	Serotec (Oxford) MCA1767 Clone YTS191.1;rat	1:100
CD8	Serotec (Oxford) MCA609G Clone KT15;rat	1:100
CD95 (FAS)	Santa Cruz (X-20):sc-1024; rabbit	1:50
CD178 (FAS-L)	Santa Cruz (MFL3): sc-19986; ham.	1:50

Tabelle 7 : Primärantikörper mit Produktionsdaten und Verdünnung

Antikörper	Firma	Verdünnung
Goat anti-Hamster IgG	JacksonImmunoResearch (Suffolk, UK) 127-055-099	1:100
Donkey Anti-Goat IgG HRP-konj.	JacksonImmunoResearch (Suffolk, UK) 705-036-147	1:100
Donkey Anti-rat IgG HRP-konj.	JacksonImmunoResearch (Suffolk, UK) 712-036-150	1:100
Donkey Anti-rat IgG AP-konj.	JacksonImmunoResearch (Suffolk, UK) 712-056-150	1:100
Donkey Anti-rat IgG AP-konj.	JacksonImmunoResearch (Suffolk, UK) 711-036-152	1:100
Donkey Anti-Rabbit IgG HRP-konj.	JacksonImmunoResearch (Suffolk, UK) 705-036-147	1:100
	Normal Mouse Serum – biomedica MS007	1:10

Tabelle 8: Sekundärantikörper mit Produktionsdaten und Verdünnung

3.9.1 Einfachfärbung

Bei der angewandten Färbetechnik handelt es sich um eine indirekte Nachweismethode. Zunächst wurden die Gefrierschnitte über 10 Minuten in Aceton (Fa. Merck, Darmstadt) fixiert und anschließend luftgetrocknet. Der unkonjugierte Primär-AK wurde über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4° C inkubiert. Danach wurde das Gewebe in einem 0,5%igem BSA (Fa. Merck, Darmstadt) TRIS-HCl (Fa. Merck, Darmstadt)-NaCl (Fa. Merck, Darmstadt)-Puffer gewaschen, welcher mit einem pH-Meter (Fa. WTW, Darmstadt) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt worden war. Im nächsten Schritt wurde das Gewebe über 60 Minuten mit einem HRP-konjugierten Sekundär-AK inkubiert. Dieser polyklonale Sekundärantikörper ist spezifisch gegen die Tierspezies des Primärantikörpers gerichtet, was eine optimale Bindung zwischen den Antikörpern ermöglicht. Der entstandene Enzym-Substrat-Komplex wurde nun mit einem Chromogen (Fa. Biogenex, Liquid DAB, San Ramon, CA, USA oder NovaRed, Fa. Linaris, Wertheim), der sich auf dem Gewebe in einem „bräunlichen Farbton“ bzw. „ziegelsteinroter Farbton“ darstellt, sichtbar gemacht. Nach abschließend zweiminütiger Gegenfärbung in wässrigem Hämalaun, bestehend aus 2,4 g Hämatoxin (Fa. Merck, Darmstadt), 0,4 g Natriumjodat (Fa. Merck, Darmstadt), 100 g Kaliumaluminiumsulfat (Fa. Applichem, Hartenstein, Würzburg), 2 g Zitronensäure (Fa. Merck, Darmstadt) und 2000 ml destilliertem Wasser (Fa. Delta-Pharma, Pfullingen), wurde das Gewebe mit Glycergel (Fa. Dako, Hamburg) fixiert.

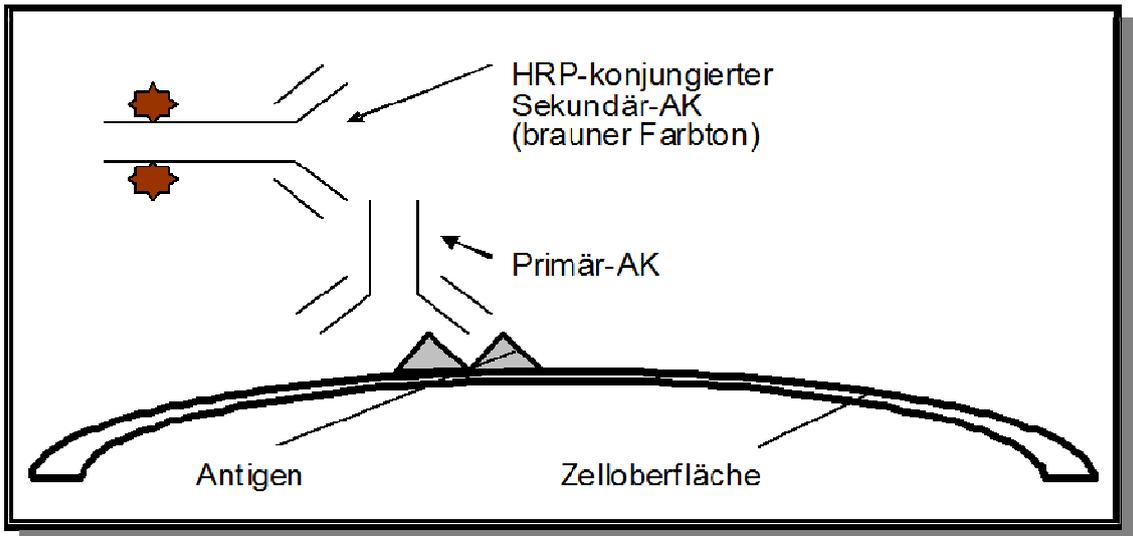


Abbildung 1: Schematische Darstellung der indirekten Nachweismethode mit dem ersten Enzym-Substrat-Komplex, bestehend aus Primär- und Sekundär-AK. Die HRP-Konjugation stellt sich auf dem Gewebe als bräunlicher Farbton dar. HRP, Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase); AK, Antikörper.

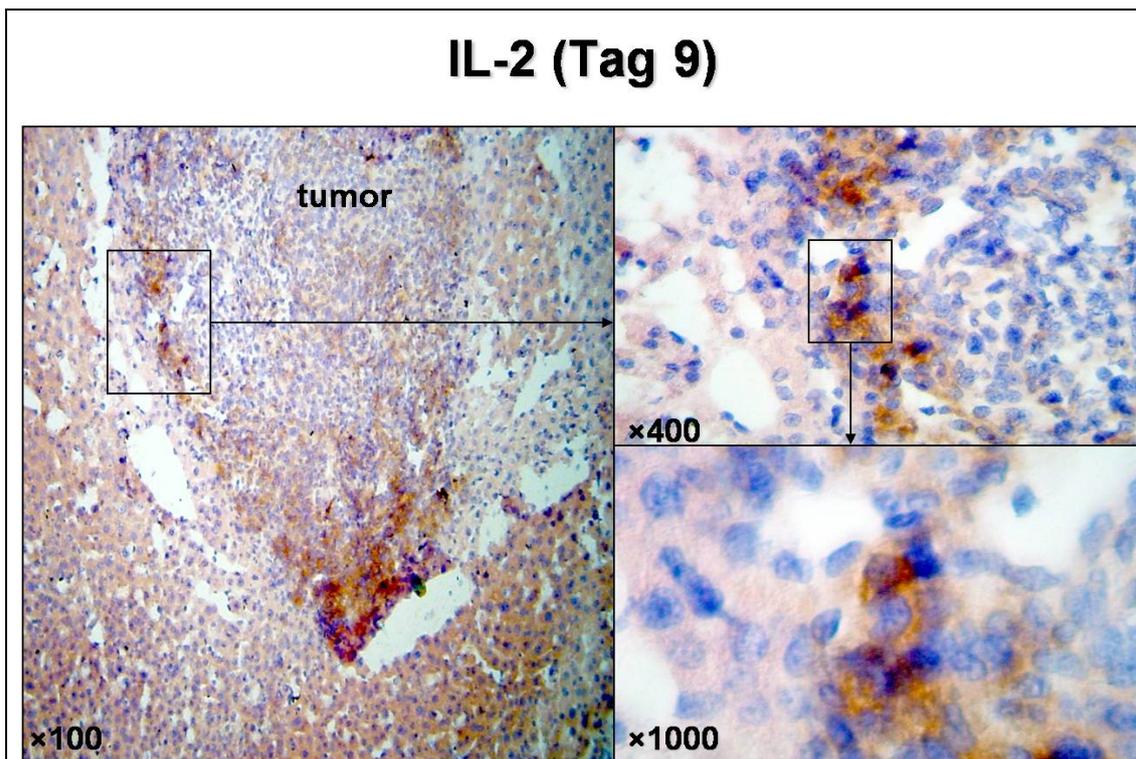


Abbildung 2: Darstellung des Zytokins IL-2 im Lebermetastasengewebe an Tag 9 nach intraportaler Injektion von 1×10^6 CT26WT Tumorzellen mittels Einfachfärbung. Die IL-2 positiven Zellen sind braun markiert.

3.9.2 Doppelfärbung

Mittels der in unserer Arbeitsgruppe entwickelten sequentiellen immunenzymatischen Doppelfärbung wurden zwei verschiedene Antigene auf dem untersuchten Lebermetastasengewebe nebeneinander sichtbar gemacht werden. Das Prinzip dieser Doppelfär-

bung beruht auf jeweils zwei eigenständig sukzessiv ablaufenden, so genannten indirekten Nachweismethoden. Dies bedeutet, dass ein spezifischer aber unkonjugierter Primär-AK an das Gewebe bindet, welcher in einem nächsten Schritt von einem entweder HRP- oder AP-konjugierten Sekundär-AK gebunden und durch Zugabe von Chromogen sichtbar gemacht wird. Der erste Färbeschritt ist identisch mit der oben beschriebenen Einfachfärbung.

Darauf folgend wurde nach einem Eluierungsschritt "MOI-Block" (Technologieangebot, Ref. B63042, BayernPatent) diese indirekte Nachweismethode wiederholt, um Kreuzreaktionen mit den Reagenzien der folgenden zweiten Färbesequenz zu verhindern. Bei dem zweiten Färbeschritt wurde ein Sekundärantikörper verwendet, welcher im Unterschied zu dem in der ersten Färbesequenz eingesetzten Sekundärantikörper mit AP verkoppelt war und mit dem Chromogen Fast Red (Fa. Dako, Fast Red, Hamburg) angefärbt wurde. Dieser 2. Enzym-Substrat-Komplex stellt sich auf dem Gewebe als 'roter Farbton' dar. Diese Antikörperkombination wurde bei den Markerkombinationen CD4/CTLA4 sowie CD4/CD25 eingesetzt. Bei den Doppelfärbungen der Markerkombinationen Foxp3/CD4 und CD4/CD8 wurde im zweiten Färbeschritt ein weiterer HRP-konjugierter Sekundärantikörper eingesetzt. Ni-DAB (Linaris, Wertheim) als Chromogen ist bei diesen Spezialfärbungen als schwarzer Farbton ersichtlich.

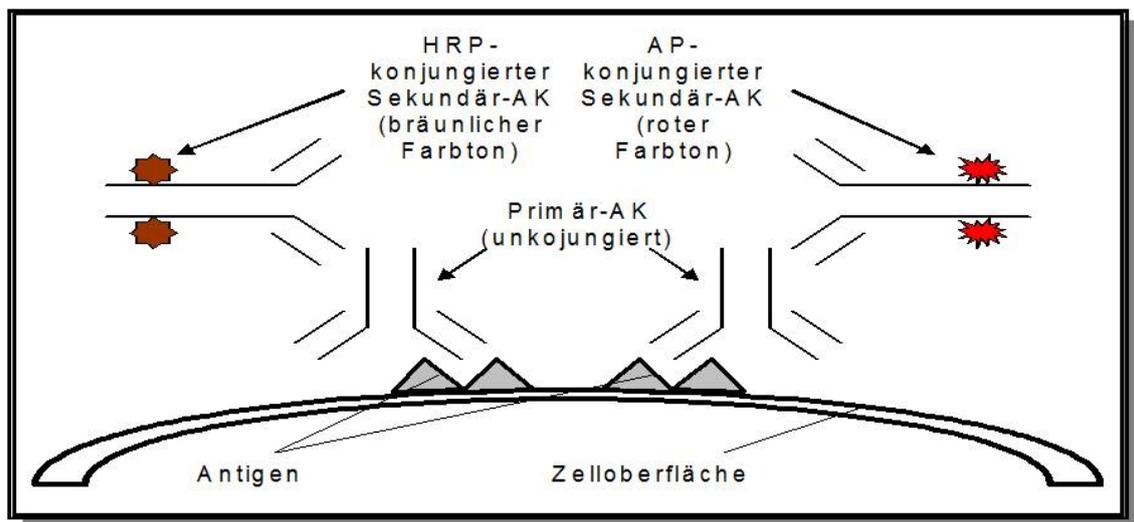


Abbildung 3: Schema der fertigen immunenzymatischen Doppelfärbung am Mausgewebe. Dargestellt ist die Bindung der Primär-AK und der HRP- (bräunlicher Farbton) bzw. AP- (roter Farbton) konjugierten Sekundär-AK. HRP, Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase); AP, alkalische Phosphatase; AK, Antikörper.

FOXP3/CD4 (Tag 19)

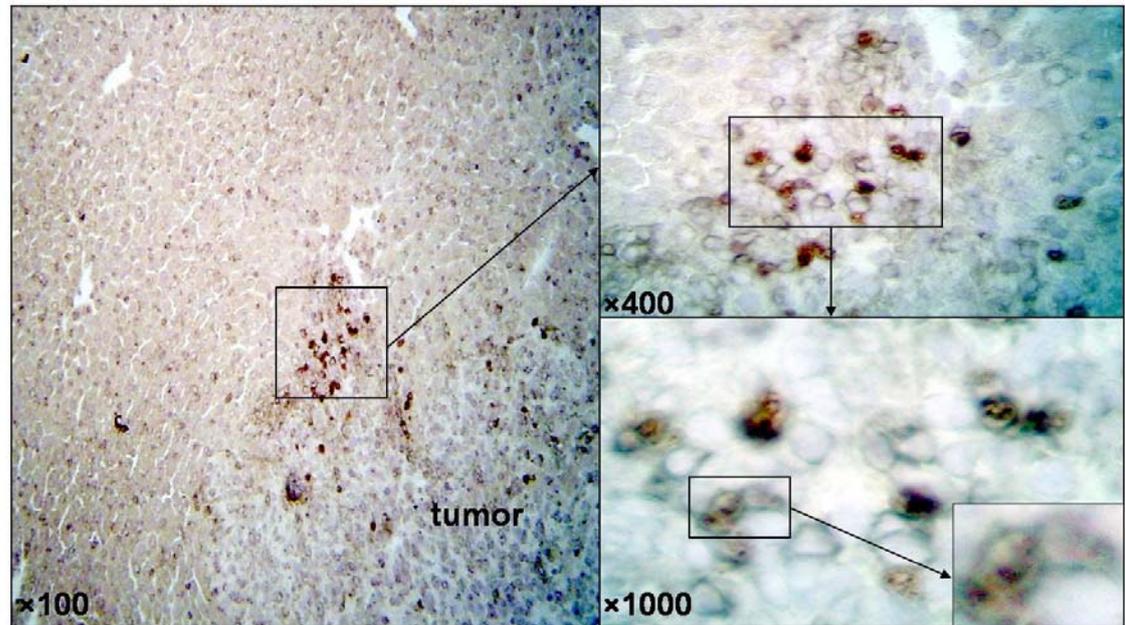


Abbildung 4: Darstellung der Marker CD4 und Foxp3 im Lebermetastatsengewebe an Tag 19 nach intraportaler Injektion von 1×10^6 CT26.WT Tumorzellen. Die Foxp3/CD4 positiven Zellen sind mit zwei Farbtönen (rot und braun) markiert.

Die anschließende Gegenfärbung mit Hämalaun und die Gewebsfixierung erfolgten so wie bei der Einzelfärbung beschrieben. Um eine unspezifische Hintergrundfärbung und damit eine falsch positive Reaktion durch das Chromogen (Liquid DAB in der ersten-, Fast Red in der zweiten Färbesequenz) zu verhindern, wurden die Primär-AK mit 0,5%igem BSA-TRIS-HCl-NaCl-Puffer verdünnt. Die Möglichkeit einer falsch positiven Reaktion besteht bei Gefrierschnitten auch in der endogenen AP-Enzymaktivität, beispielsweise in Gefäßen. Durch Substitution von Levamisol-Lösung (Fa. Dako, Hamburg) zum Chromogen der zweiten Färbesequenz Fast-Red (Fa. Dako, Hamburg) wurde auch dies verhindert. Auch durch die Verdünnung des Sekundär-AK mit Mausserum (Fa. Biozol, Eching) wurden falschpositive Reaktionen mit diesem und dem Gewebe verhindert.

3.9.3 Auswertung

Bei der Auswertung der Gewebsschnitte wurden die Tumorzellen und die den Tumor infiltrierenden Immunzellen jeweils getrennt voneinander beurteilt. Sowohl für die tu-

morinfiltrierenden Zellen als auch für die Tumorzellen wurde der für die jeweiligen Marker positive Anteil bestimmt.

Die Intensität, mit welcher die Zellen angefärbt wurden, wurde bei jedem der in die Auswertung einbezogenen Gewebsschnitte in sechs Gesichtsfeldern (Vergrößerung 400fach) bestimmt. Hierbei kam eine neunstufige Beurteilungsskala zur Anwendung. Die genaue Einteilung dieser Skala ist in Tabelle aufgeführt. Die in dieser Beurteilungsskala angegebenen Prozentwerte beziehen sich ausschließlich auf die jeweils untersuchte Zellgruppe, und nicht auf den gesamten Gewebsverband. Ist bei einer bestimmten Färbung für die Gruppe der tumorinfiltrierenden Zellen also ein Wert von 35% angegeben, so bedeutet dies dass 35% aller tumorinfiltrierenden Zellen in den sechs durchgemusterten Gesichtsfeldern für diesen Marker positiv sind.

Stufe	Prozentwert [%]
-	0
- / (+)	5
(+)	10
(+) / +	15
+	20
+ / ++	25
++	30
++ / +++	35
+++	>40

Tabelle 9: Immunhistochemisches Auswertungsschema

Bei den Färbungen von IL-2, IL-4, IL-10, TGF β , IFN γ und TNF α wurde der Anteil an positiven Zellen sowohl für die Tumorzellen als auch für die tumorinfiltrierenden Zellen ermittelt. Für VEGF, VEGF-Rezeptor, Fas-Ligand und Fas dargestellt wurde dieser Wert ausschließlich für die Tumorzellen bestimmt, während bei den Doppelfärbungen für die Markerkombinationen CD4/CD8, CD4/CD25, CD4/CTLA4 sowie CD4/Foxp3 ausschließlich die tumorinfiltrierenden Immunzellen ausgezählt wurden.

4 Ergebnisse:

Die makroskopische Untersuchung aller Versuchstiere der Gruppen A bis C zeigte eine deutliche Zunahme der Metastasengewebes im Verlauf des Wachstumszeitraumes von 10 Tagen, wobei die Tumorlast bei den Versuchstieren innerhalb einer Gruppe vergleichbar war, so dass ein Modell vorlag in welchem bei standardisierten Versuchsbedingungen ein reproduzierbares Tumorwachstum induziert wurde.

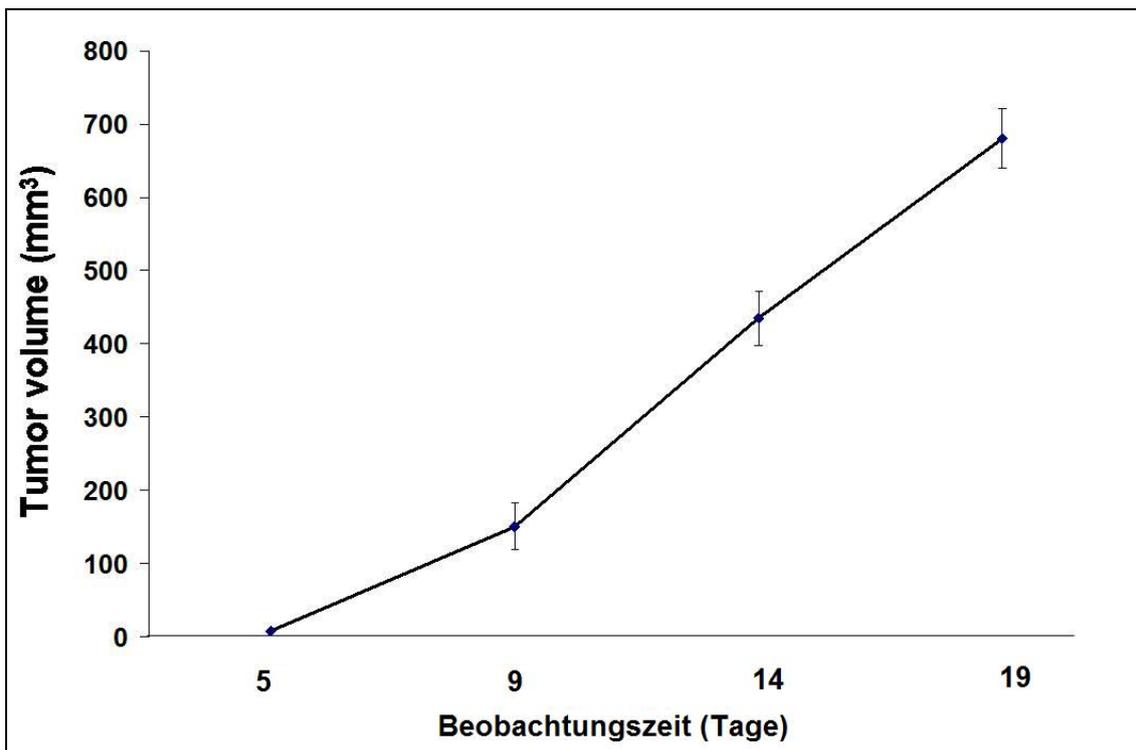


Abbildung 5: Darstellung der Entwicklung der Lebermetastasen nach intraportaler Injektion von 1×10^6 CT26.WT Tumorzellen. Es zeigte sich bei allen Tieren eine kontinuierliche Zunahme des Tumolvolumens innerhalb des Beobachtungszeitraums von 19 Tagen.

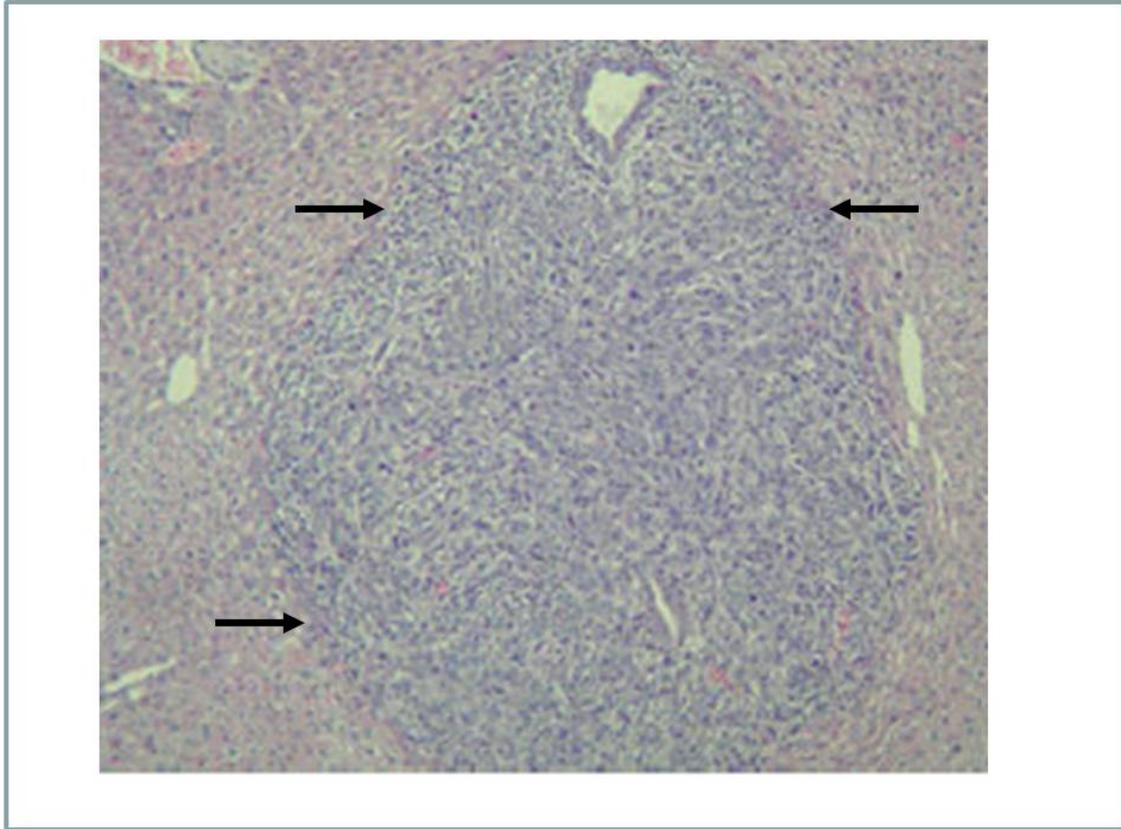


Abbildung 6: Histomorphologie einer repräsentativen Lebermetastase 15 Tage nach intraportaler Injektion von 1×10^6 CT26.WT Tumorzellen (Randbereich des Tumors mit Pfeilen markiert, HE, 400x).

Im Rahmen der Auswertung der PCR Daten wurde für jeden untersuchten Marker der Mittelwert in jeder der vier Tiergruppen ermittelt und anschließend der FoldFactor für die Experimentgruppen A, B und C bestimmt.

4.1 Th1/Th2 Immunantwort

4.1.1 Th1 Antwort

Die Zytokine, welche im Hinblick auf die Ausbildung einer Th1 Antwort untersucht wurden, sind IL-2, IL-18, IFN γ und TNF α .

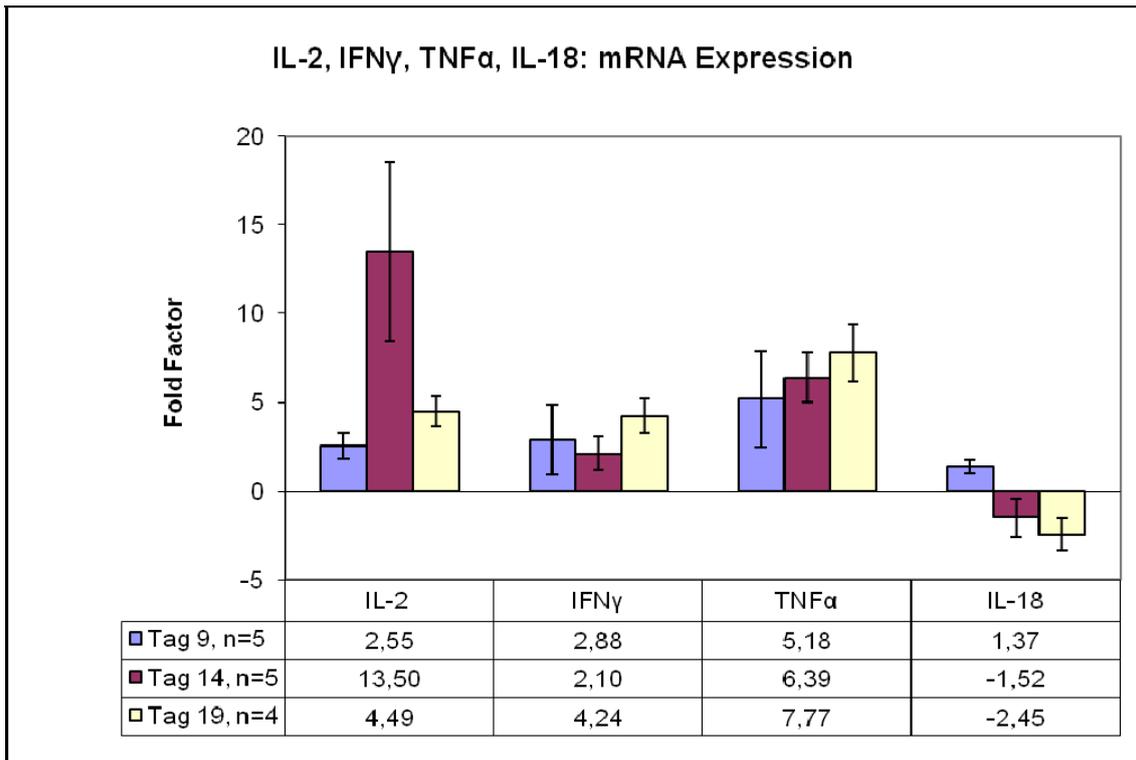


Abbildung 7: Darstellung der mRNA Expression der Zytokine IL-2, IFN γ , TNF α und IL-18 im zeitlichen Verlauf. Das Diagramm zeigt einen Peakwert der IL-2 mRNA an Tag 14, die Zunahme der IL-2 mRNA von Tag 10 auf Tag 14 ist hochsignifikant. Im Unterschied dazu liegt eine statistisch signifikante Abnahme der IL-18 mRNA Produktion zwischen Tag 10 und Tag 19 vor. Schließlich zeigt sich bezogen auf die Kontrollgruppe eine verstärkte Expression der mRNA von IFN γ und TNF α im Lebermetastasengewebe, zwischen Tag 10 und Tag 19 liegt allerdings keine statistisch signifikante Veränderung des Expressionsniveaus vor.

Signifikanzniveau (signifikant = $p < 0,05$; hochsignifikant = $p < 0,01$):

	9#14	14#19	9#19
IL-2	0,0058	0,0110	0,0087
IL-18	0,0229	0,1744	0,0026
IFN γ	0,2540	0,0125	0,1370
TNF α	0,2261	0,1394	0,0792

TNF α mRNA lag im Metastasengewebe im Vergleich zu gesundem Lebergewebe in sechsfach höherer Konzentration vor. Im zeitlichen Verlauf wiesen die TNF α mRNA Werte eine steigende Tendenz auf. Immunhistologisch stieg die Zahl der TNF α positiven Tumorzellen zwischen Tag 10 und Tag 19 deutlich an. Dagegen konnte nur bei einem sehr geringen Anteil der tumorinfiltrierenden Zellen eine TNF α Expression nachgewiesen werden. Dies ist ein deutlicher Hinweis dafür, dass ein beträchtlicher Teil des im Tumormilieu freigesetzten TNF α von den Tumorzellen selbst stammt.

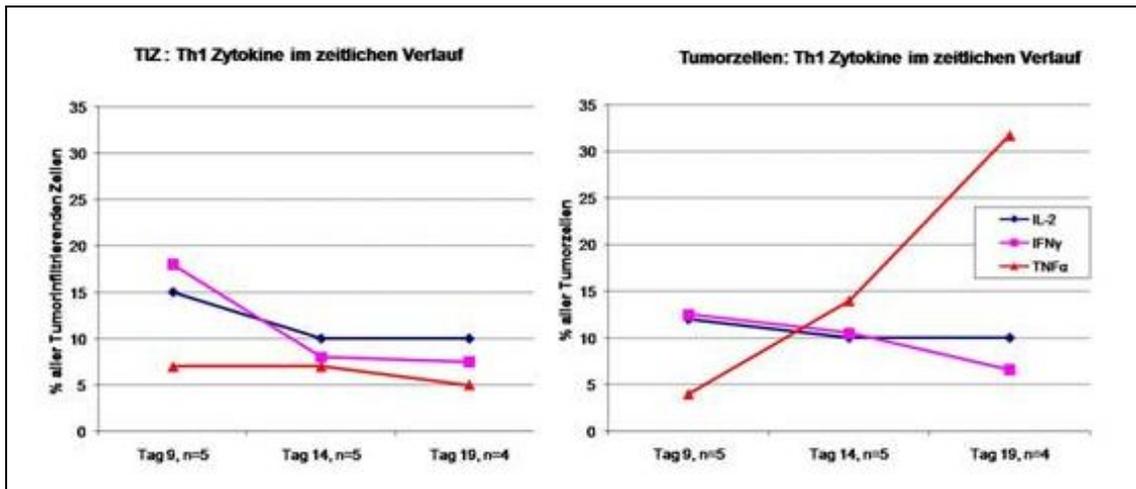


Abbildung 8: Graphische Darstellung der immunhistologisch erhobenen Werte der Zytokine IL-2, IFN γ und TNF α . Der Anteil aller tumorinfiltrierenden Zellen, welche diese Zytokine exprimieren, nimmt im zeitlichen Verlauf ab. Am deutlichsten zeigt sich dieser Trend bei IFN γ . Auch in der Gruppe der tumorinfiltrierenden Zellen verringert sich der Anteil der Zellen, welche die Zytokine IL-2 und IFN γ exprimieren. Der Anteil an Tumorzellen, welcher TNF α exprimiert, nimmt dagegen sprunghaft zu. Während an Tag 9 weniger als 5% aller Tumorzellen TNF α exprimierten, waren an Tag 19 30% aller Tumorzellen für TNF α positiv.

Das Zytokin IFN γ lag in den Lebermetastasen der Versuchsgruppe A in dreifach höherer Konzentration vor als in dem Kontrollgewebe. Im zeitlichen Verlauf war nur der Anstieg der mRNA Menge von Tag 14 auf Tag 19 statistisch signifikant. Immunhistochemisch zeigte sich sowohl bei den infiltrierenden Zellen als auch bei den Tumorzellen eine stetige Abnahme an IFN γ Expression. An Tag 19 wurde IFN γ nur noch in sehr geringen Mengen nachgewiesen.

Betrachtet man die Werte von IL-18, so fällt zunächst auf, dass dieses Zytokin im Lebermetastasengewebe im Vergleich zum Kontrollgewebe nicht hochreguliert war. Die mRNA Konzentration von IL-18 fiel im zeitlichen Verlauf im Metastasengewebe deutlich ab. So lag die Konzentration von IL-18 im Metastasengewebe nach 14 Tagen (Versuchsgruppe B) bei weniger als 50% des im Kontrollgewebe bestimmten Wertes, es liegt somit ein statistisch signifikanter Konzentrationsabfall vor. Zwischen den Werten von Tieren an Tag 14 und Tag 19 bestand kein statistisch signifikanter Unterschied.

IL-2 ist in der Gruppe der Th1 typischen Zytokine das Zytokin mit dem auffälligsten Verlauf. Am Tag 9 zeigte sich in den Lebermetastasen (Versuchsgruppe A) im Unterschied zum Normalgewebe eine doppelt so hohe IL-2 mRNA Expression, die sich an Tag 14 auf eine etwa 14-fach höhere mRNA Expression steigerte. Danach fiel die IL-2

mRNA an Tag 19 auf das 4,5-fache der Menge im Normalgewebe ab. Immunhistologisch zeigte sich im zeitlichen Verlauf eine stetige Abnahme sowohl der IL-2 positiven tumorinfiltrierenden Zellen als auch der IL-2 positiven Tumorzellen. Dies weist auf eine verstärkte Expression von IL-2 durch eine im zeitlichen Verlauf geringer werdende Zellpopulation hin.

4.1.2 Th2 Antwort

Als typische Zytokine der Th2 Immunantwort wurden IL-6, IL-4 und IL-10 untersucht. IL-6 konnte molekulargenetisch im Kontrollgewebe nicht nachgewiesen werden, dafür aber in dem Metastasengewebe zu allen Zeitpunkten. Von Tag 9 bis Tag 14 wurde eine statistisch signifikante Zunahme der IL-6 mRNA beobachtet.

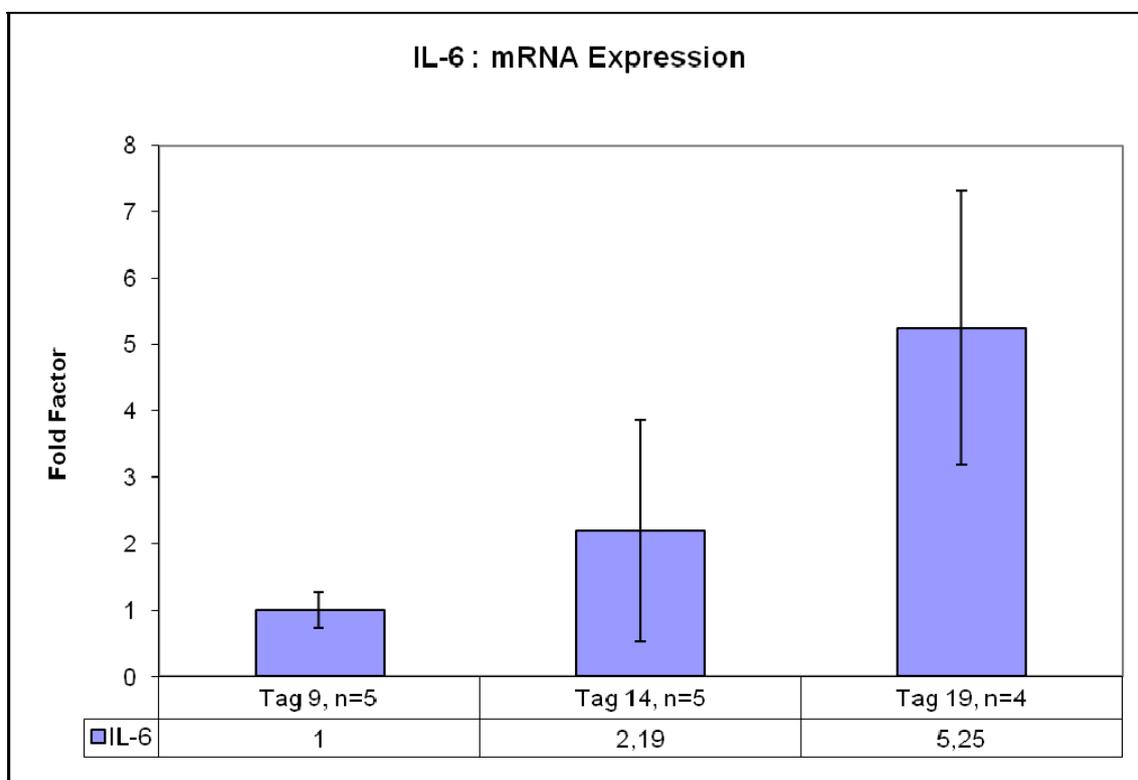


Abbildung 9 : Darstellung der IL-6 mRNA Expression im zeitlichen Verlauf. Während im Normalgewebe keine IL-6 mRNA nachweisbar war, fand sich eine erhöhte Expression an allen Beobachtungstagen (Werte an Tag 9 auf 1 genormt, Berechnung des Foldfaktors für Tag 14 und 19 auf der Basis von Tag 9)

Signifikanzniveau (signifikant = $p < 0,05$; hochsignifikant = $p < 0,01$):

	9#14	14#19	9#19
IL-6	0,1518	0,1042	0,0315

IL-10 mRNA wurde im Metastasengewebe an Tag 9 (Versuchsgruppe A) in ca. 1,5-fach höherer Konzentration als im Normalgewebe nachgewiesen. Von Tag 9 bis Tag 14 fand

eine deutliche Zunahme der IL-10 mRNA auf das Sechsfache statt. Am Tag 19 fiel die IL-10 mRNA Expression auf ca. 50% der Werte an Tag 14, was etwa dem dreifachen Kontrollwert entsprach.

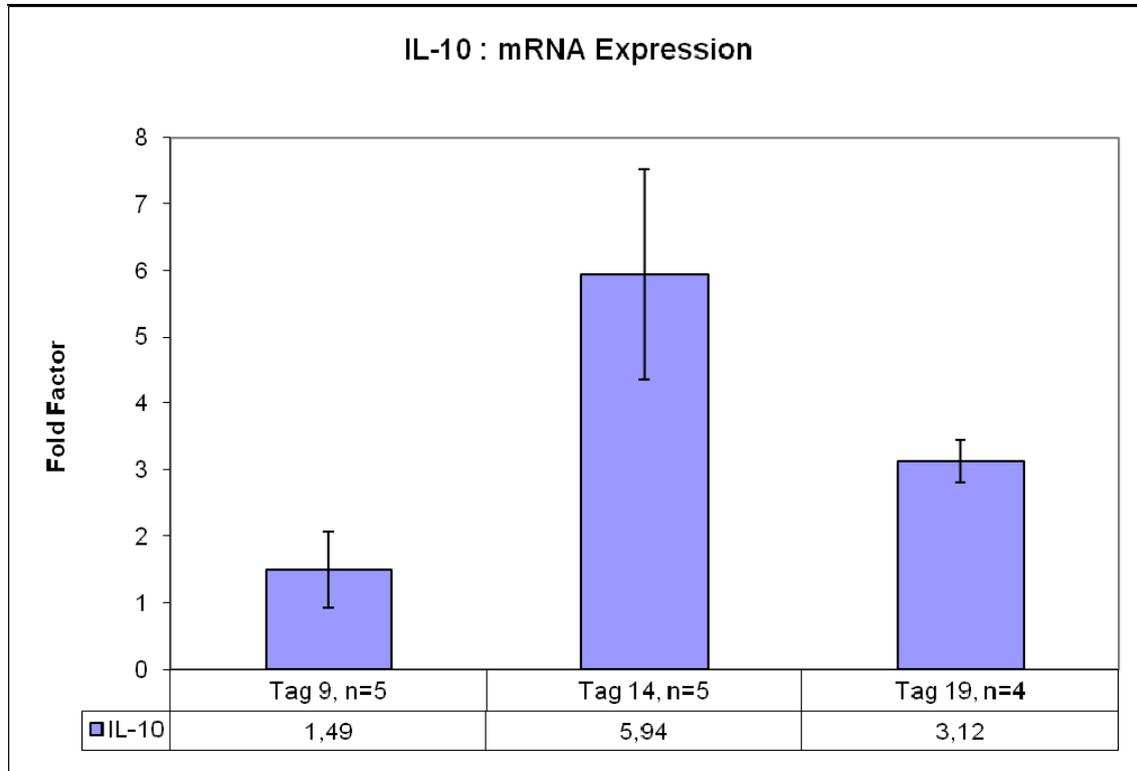


Abbildung 10 : Darstellung IL-10 mRNA Expression im zeitlichen Verlauf. Von Tag 10 bis Tag 14 wurde eine hochsignifikante Zunahme, von Tag 14 bis Tag 19 eine signifikante Abnahme des IL-10 mRNA Expressionslevels beobachtet. An Tag 14 liegt ein Peakwert der IL-10 mRNA vor.

Signifikanzniveau (signifikant = $p < 0,05$; hochsignifikant = $p < 0,01$):

	9#14	14#19	9#19
IL-10	0,0016	0,0110	0,0012

Dieser Verlauf wurde immunhistologisch für tumorinfiltrierende Zellen bestätigt. Auffällig ist hierbei, dass der Anteil der IL-10 exprimierenden Tumorzellen im zeitlichen Verlauf deutlich geringer wird. Der Anteil IL-10 exprimierender Tumorzellen fiel von 25% auf 10 % im Verlauf ab.

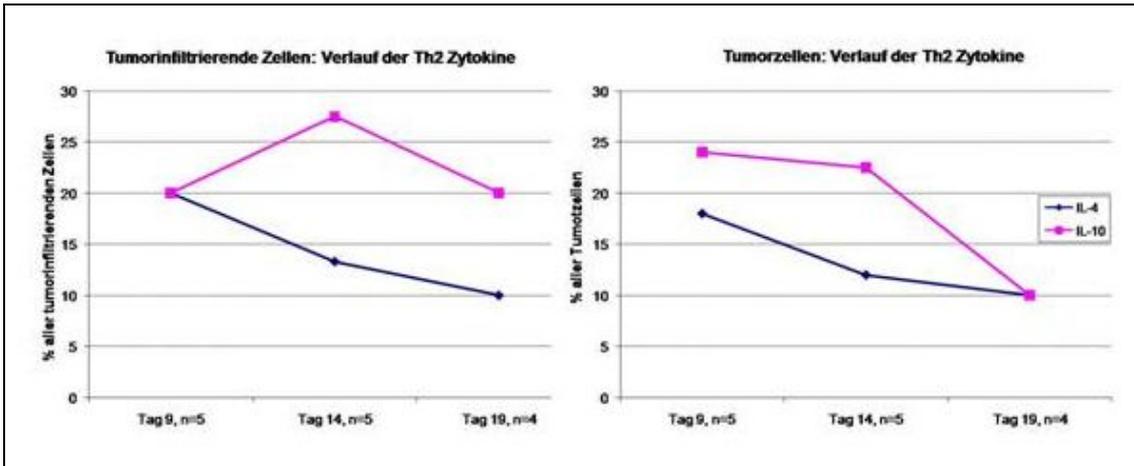


Abbildung 11 : Immunhistologisch erhobene Werte für IL-4 und IL-10. Das Diagramm zeigt, dass der Anteil der Tumorzellen, welche IL-4 und IL-10 exprimierten, im zeitlichen Verlauf abnimmt. Bei den tumorinfiltrierenden Zellen zeigte sich ebenfalls eine stetige Abnahme des Anteils IL-4 positiver Zellen. Die Population IL-10 positiver tumorinfiltrierender Zellen erreichte an Tag 14 einen Peakwert, fiel aber bis Tag 19 wieder auf den Ausgangswert ab.

IL-4 mRNA konnte in der Real-Time PCR weder im Kontrollgewebe noch in den Lebermetastasen signifikant nachgewiesen werden. Immunhistologisch zeigte sich eine schwache IL-4 Expression tumorinfiltrierender Zellen und Tumorzellen. Der Anteil der schwach IL-4 positiven Tumorzellen sank im zeitlichen Verlauf von 18% auf 10% ab.

4.1.3 IL-2 und IL-10 Expressionskinetik

Der Vergleich der molekulargenetischen Daten zu IL-2 und IL-10 zeigt, dass die Expressionskinetik dieser beiden Zytokine sehr ähnlich verlief.

Die mRNA Expression von IL-10 und IL-2 nahm von Tag 10 bis Tag 14 zunächst um das Vier- bis Fünffache zu. Anschließend nahm die mRNA Konzentration von Tag 14 bis Tag 19 sowohl bei IL-10 als auch bei IL-2 deutlich auf lediglich das Doppelte des Ausgangswertes von Tag 10 ab. Der ähnliche Verlauf der Expressionskinetik dieser beiden Zytokine wird noch deutlicher, wenn das Expressionslevel von IL-2 und IL-10 des ersten Beobachtungszeitpunktes (Tag 9, Versuchsgruppe A) auf 1 normiert und die Fold-Factor Werte an den Tagen 14 und 19 (Versuchsgruppen B und C) auf dieser Grundlage berechnet werden.

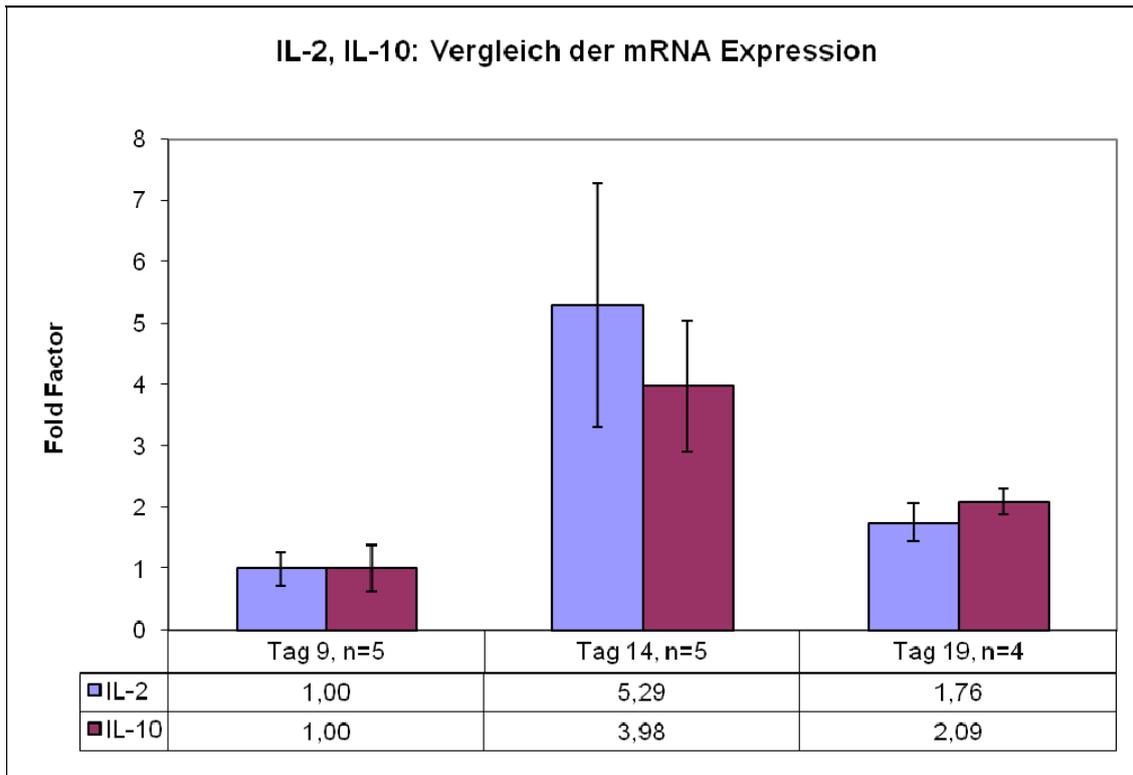


Abbildung 12: Fold-Factor basierte Darstellung der mRNA Expression der Zytokine IL-2 und IL-10 im zeitlichen Verlauf. Die für den Tag 9 bestimmten Werte wurden sowohl für IL-2 als auch für IL-10 auf den Wert 1 genormt. Die Foldfactor-Werte für den Tag 14 und 19 wurden auf dieser Basis berechnet. Vergleicht man die Fold-Factor Werte von IL-2 und IL-10 innerhalb jeweils einer Gruppe, so ergibt sich für keines der drei Gruppen-Paare ein statistisch signifikanter Unterschied. Hinsichtlich der mRNA Expression ergibt sich für die Zytokine IL-2 und IL-10 eine identische Kinetik.
Signifikanzniveau (signifikant = $p < 0,05$; hochsignifikant = $p < 0,01$):

	IL-2/IL-10, Tag 14	IL-2/IL-10, Tag 19
p-Wert	0,2618	0,3201

Bei dieser Darstellungsweise besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Expressionskinetik von IL-2 und IL-10.

4.2 T-Zell Subpopulationen

Als Marker wurden die Faktoren CD4, CD8 α und PD-1 immunhistologisch und molekulargenetisch untersucht.

CD4 mRNA wurde im Metastasengewebe an Tag 9 (Versuchsgruppe A) verglichen mit Normalgewebe in 3,5-fach höherer Konzentration nachgewiesen. Nach weiteren 5 Tagen fiel der Wert auf das 1,7-fache des Kontrollwertes ab. Bis zum Tag 19 stieg die mRNA Konzentration wieder auf das 3,5-fache des Wertes im Normalgewebe an. Immunhistologisch zeigte sich ein deutlicher Anstieg der CD4 positiven tumorinfiltrierenden Zellen von 16% an Tag 9 über 22% an Tag 14 auf 36,7% an Tag 19 an.

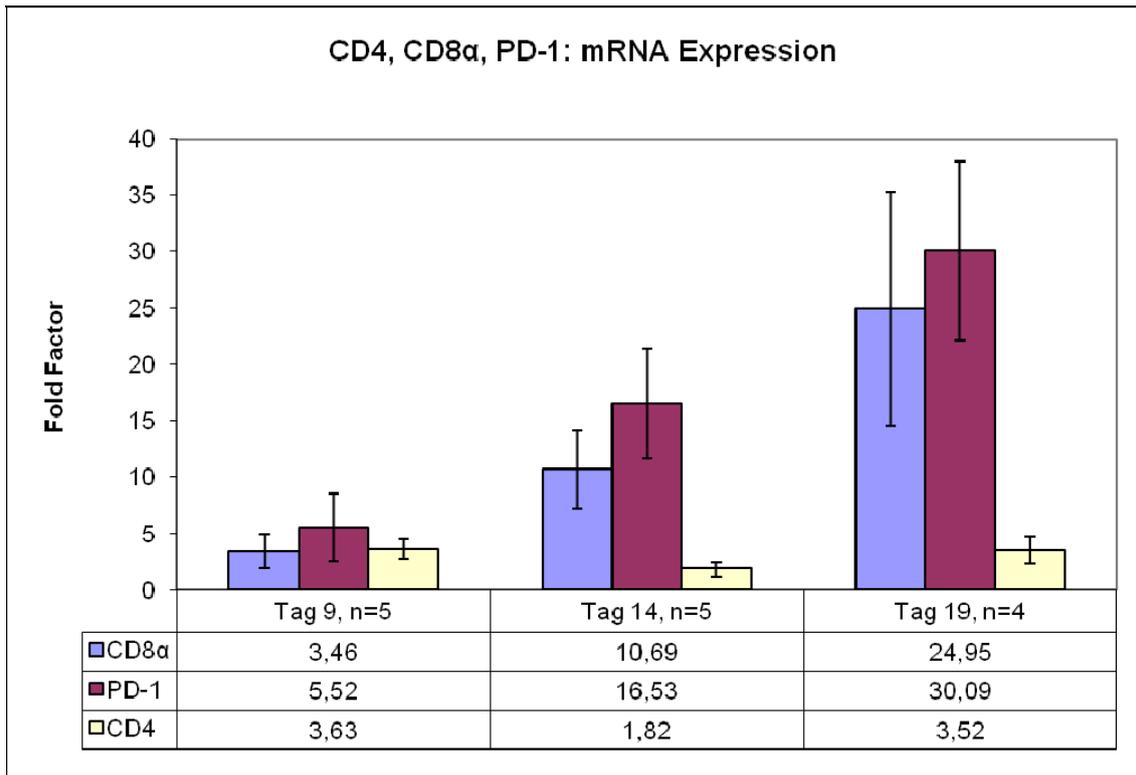


Abbildung 13 : Darstellung der mRNA Expression der Zellmarker CD4 und CD8 α zusammen mit PD-1 im zeitlichen Verlauf. Die für den Tag 9 bestimmten Werte wurden für CD8 α , CD4 und PD-1 auf den Wert 1 genormt. Die Fold-Factor-Werte für die Tage 14 und 19 wurden auf dieser Basis berechnet. Es zeigte sich eine hochsignifikante Zunahme der CD8 α mRNA und PD-1 mRNA von Tag 9 bis Tag 14 sowie eine signifikante Zunahme von Tag 14 bis Tag 19. Hinsichtlich der mRNA Expression von CD4 fiel eine signifikante Abnahme um 50% von Tag 9 bis Tag 14 sowie eine signifikante Zunahme um 100% von Tag 14 bis Tag 19 auf. Die CD4 mRNA Expressionslevels von Tag 9 und Tag 19 waren annähernd gleich. **Signifikanzniveau** (signifikant = $p < 0,05$; hochsignifikant = $p < 0,01$):

	9#14	14#19	9#19
CD8 α	0,0052	0,0467	0,0178
PD-1	0,0042	0,0253	0,0041
CD4	0,0356	0,0234	0,2340

CD8 α mRNA zeigte sich im Metastasengewebe an Tag 9 (Versuchsgruppe A) gegenüber dem Normalgewebe ca. vierfach erhöht. Von Tag 9 bis Tag 14 nahm die Expression der CD8 α mRNA um das 2,5-fache zu, dies entsprach dem 10-fachen Kontrollwert. Am Tag 19 stieg die mRNA Konzentration sogar auf das etwa 25-fache dessen im Normalgewebe. Im zeitlichen Verlauf fand damit eine hochsignifikante Zunahme der CD8 α mRNA in den Metastasen statt. Immunhistologisch ließ sich dagegen mit einem Anstieg von 20% an Tag 9 auf 23% an Tag 19 nur eine geringe Zunahme der CD8 α positiven tumorinfiltrierenden Zellen verzeichnen.

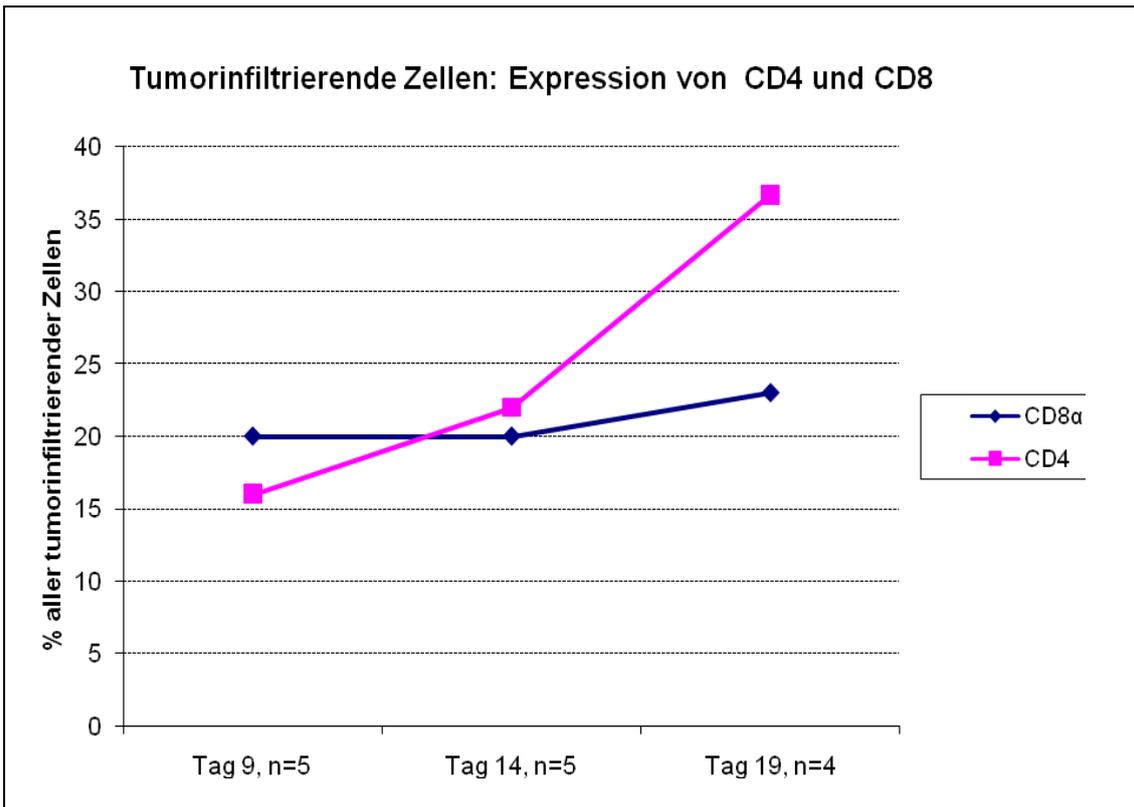


Abbildung 14 : Darstellung der immunhistologisch erhobenen Werte für CD8 α und CD4. Die Graphik zeigt eine deutliche Zunahme des Anteils CD4 positiver tumorinfiltrierender Zellen im zeitlichen Verlauf. Der Anteil der CD8 α positiven tumorinfiltrierenden Zellen blieb dagegen zwischen Tag 9 und 19 mit einem Niveau von ca. 20% relativ konstant.

Neben CD8 α und CD4 mRNA wurde PD-1 mRNA untersucht. PD-1 zeigte einen ähnlichen zeitlichen Verlauf wie CD8 α . Zunächst lag die PD-1 mRNA Expression an Tag 9 bei dem Fünffachen des Kontrollwertes. Von Tag 9 bis Tag 14 verdreifachte sich die Expression der PD-1 mRNA auf das 15-fache des Kontrollwertes um von Tag 14 bis Tag 19 schließlich auf das 30-fache bezogen auf das Normalgewebe anzusteigen.

4.3 Regulatorische T-Zellen

In dieser Arbeit wurden die Marker CD4, CTLA4, Foxp3 und TGF β untersucht, um Hinweise über mögliche regulatorische T-Zellen unter den tumorinfiltrierenden T-Zellen zu erhalten.

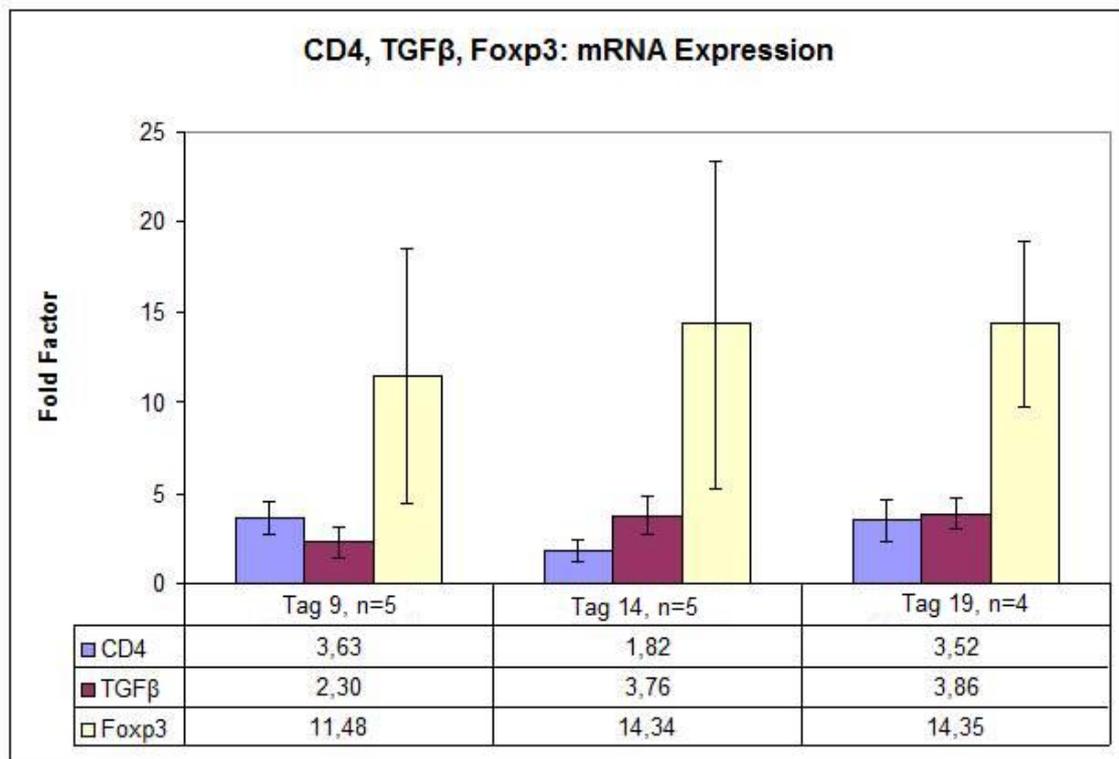


Abbildung 15: Darstellung der CD4 und Foxp3 sowie der TGFβ mRNA Expression im zeitlichen Verlauf. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Foxp3 mRNA Expressionswerten im zeitlichen Verlauf. Dagegen stellte sich ein signifikanter Anstieg der TGFβ mRNA Expression von Tag 9 bis Tag 14 dar. Von Tag 14 bis Tag 19 fand dagegen kein weiterer signifikanter Anstieg der TGFβ mRNA Expression statt.

Signifikanzniveau (signifikant = $p < 0,05$; hochsignifikant = $p < 0,01$):

	9#14	14#19	9#19
CD4	0,0356	0,0234	0,2340
Foxp3	0,3168	0,4989	0,2685
TGFβ	0,0325	0,4496	0,0253

Foxp3 mRNA war im Metastasengewebe an Tag 9 (Versuchsgruppe A) etwa zehnfach höher exprimiert als im Normalgewebe. Es bestand kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Foxp3 Expressionswerte im zeitlichen Verlauf (Tag 9, 14 und 19). Immunhistologisch war dagegen ein deutlicher Anstieg zu erkennen. An Tag 9 waren 10% der tumorinfiltrierenden Zellen für Foxp3 positiv, an Tag 19 stieg der Anteil Foxp3 positiver tumorinfiltrierender Zellen auf 20% an. Immunhistologisch zeigte sich dies besonders deutlich in Form Foxp3 positiver Zellen im Bereich der Tumorzellnester. Dies könnte auf eine vermehrte Einwanderung regulatorischer T-Zellen in die Metastasen hindeuten.

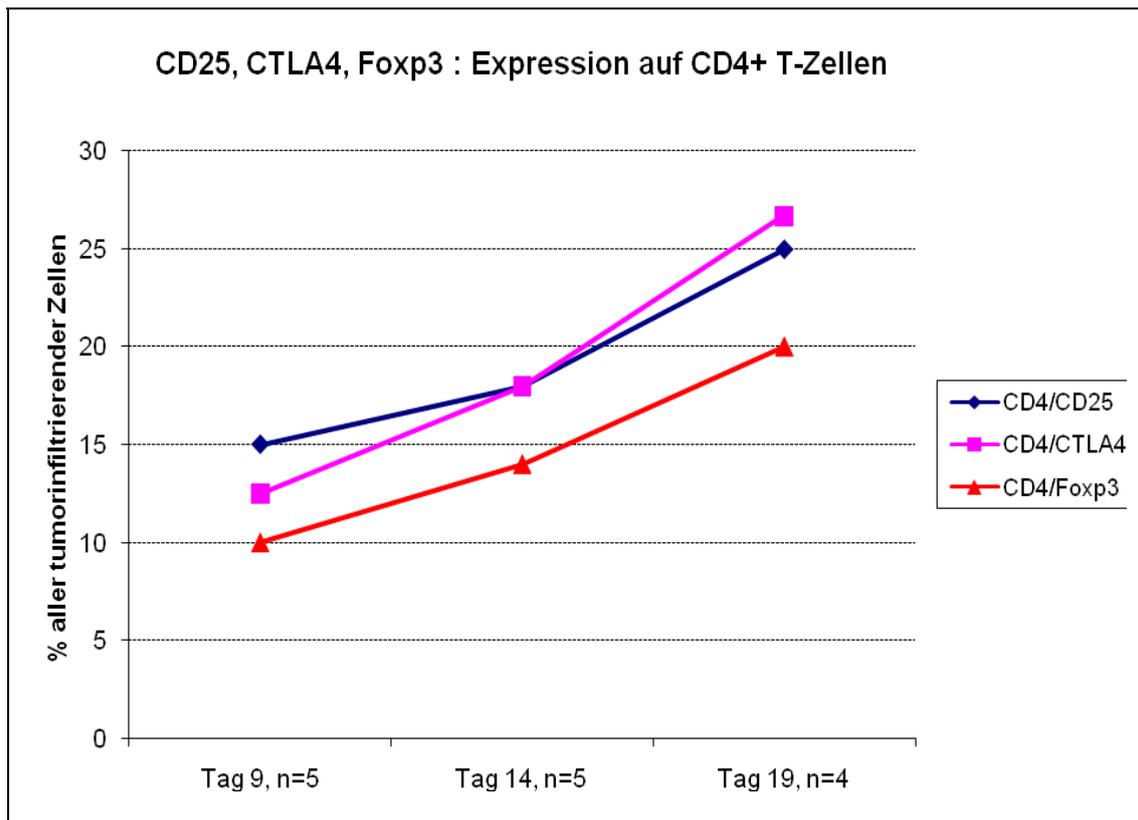


Abbildung 16 : Graphische Darstellung der immunhistologisch erhobenen Werte für folgende Doppelbestimmungen: CD4/CD25, CD4/CTLA4 und CD4/Foxp3. Es wurde bestimmt, welcher Anteil der tumorinfiltrierenden Zellen die genannten Marker-Kombinationen exprimierte. Für alle drei Marker-Kombinationen konnte im zeitlichen Verlauf eine Zunahme doppelt positiver Zellen festgestellt werden. Weiterhin wiesen alle drei Marker-Kombinationen einen vergleichbaren aufsteigenden Trend auf.

Immunhistologisch fand sich zwischen den Tagen 9 und 19 ein Anstieg der CD4+/CD25+ Zellen von 15 auf 25% an. Auch der Anteil der CD4+/CTLA4+ sowie der CD4+/Foxp3+ T-Zellen wuchs im zeitlichen Verlauf etwa auf das Doppelte des Ausgangswertes an. Die Kombination CD4/CTLA4 doppelt positive Zellen wurden im Metastasengewebe an Tag 19 verstärkt nachgewiesen (27% aller tumorinfiltrierenden Zellen), während zeitgleich etwa 20% aller tumorinfiltrierender Zellen in der Doppelfärbung für CD4/Foxp3 doppelt positiv waren.

CTLA4 konnte molekulargenetisch im Normalgewebe nicht nachgewiesen werden, dagegen aber im Metastasengewebe zu allen Beobachtungszeitpunkten.

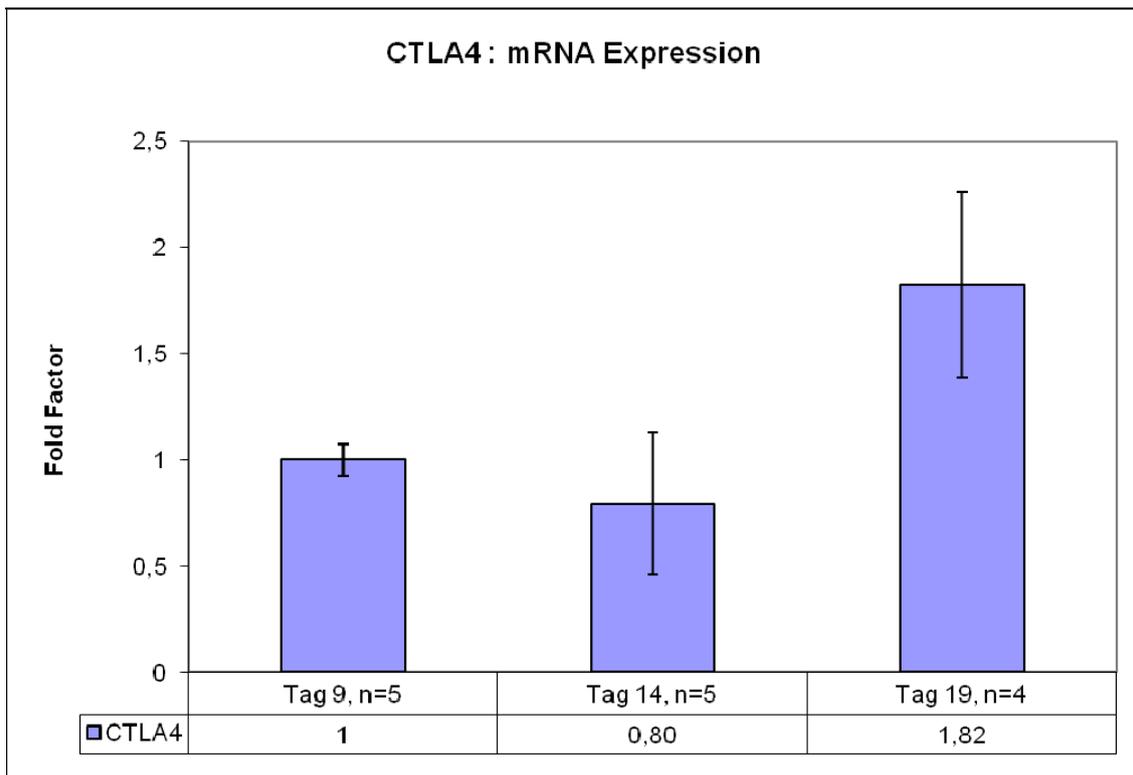


Abbildung 17 : Darstellung der CTLA4 mRNA Expressionswerte im zeitlichen Verlauf. CTLA-4 mRNA fand sich nicht im Normalgewebe. Die am Tag 9 in den Metastasen erhobenen Werte wurden auf 1 genormt, und der Fold-Factor für die Tage 14 und 19 auf dieser Basis berechnet. Es zeigt sich eine signifikante Zunahme der CTLA4 mRNA von Tag 14 bis Tag 19, während das Expressionsniveau von Tag 9 bis Tag 14 etwa gleich bleibt.

Signifikanzniveau (signifikant = $p < 0,05$; hochsignifikant = $p < 0,01$):

	9#14	14#19	9#19
CTLA4	0,1844	0,0096	0,0223

Es bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich der CTLA4 mRNA Expression in den Metastasen zwischen Tag 9 und Tag 14.

Das Metastasengewebe wies dagegen an Tag 19 eine fast doppelt so hohe CTLA4 mRNA Konzentration auf. In der Immunhistologisch stieg der Prozentsatz der CTLA4 exprimierenden tumorinfiltrierenden Zellen von 12,5 % über 18 % auf 26,7% an.

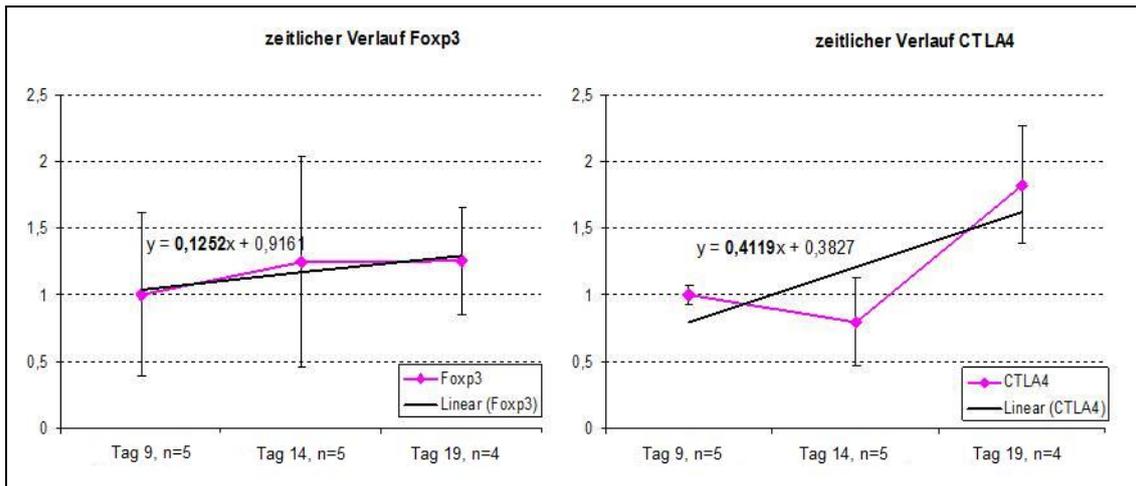


Abbildung 18: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Zellmarker Fxp3 und CTLA4. Es handelt sich um molekulargenetische Daten. Sowohl bei Fxp3 als auch bei CTLA4 wurden die für Tag 9 erhobenen Werte auf 1 genormt. Auf der Basis dieser Ausgangswerte wurden die Fold-Factoren für Tag 14 und 19 proportional umgerechnet. Sowohl für Fxp3 als auch für CTLA4 wurde eine Regressionsgerade in den zeitlichen Verlauf gelegt. Die den Werten von CTLA4 zugehörige Regressionsgerade weist mit $m=0,412$ eine größere Steigung auf als die Regressionsgerade zum Verlauf der Fxp3 Werte ($m=0,125$).

CTLA4 zeigte einen deutlich stärkeren Aufwärtstrend als Fxp3. Die Zunahme der CTLA4 mRNA Expression lieferte einen Hinweis darauf, dass über den Untersuchungszeitraum von zehn Tagen eine große Zahl von Fxp3 positiven T-Zellen aktiviert wird.

Die TGF β mRNA Konzentration weist eine deutliche Zunahme von Tag 9 bis Tag 14 auf. Im Metastasengewebe von Tag 9 lag verglichen mit dem Normalgewebe eine doppelt so hohe TGF β mRNA Konzentration vor, diese stieg an Tag 14 auf das Vierfache des Normalgewebes. Zwischen Tag 14 und Tag 19 bestand kein statistisch relevanter Unterschied. Immunhistologisch zeigte sich ein deutlicher Anstieg sowohl der TGF β positiven Tumorzellen als auch der TGF β positiven tumorinfiltrierenden Zellen von Tag 14 bis Tag 19.

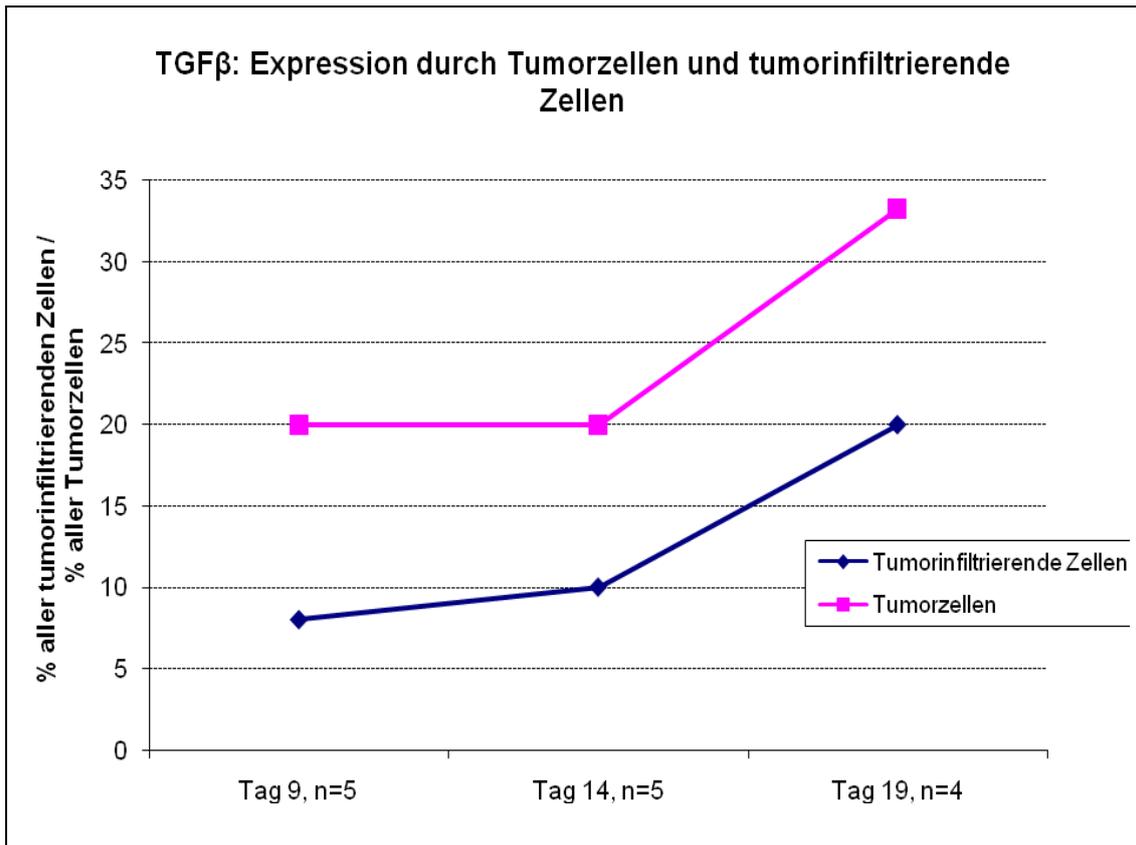


Abbildung 19: Immunhistologisch erhobene Werte für TGFβ. Sowohl bei den Tumorzellen als auch bei den tumorinfiltrierenden Zellen ist der Anteil TGFβ positiver Zellen an Tag 9 und Tag 14 als konstant zu betrachten. Von Tag 14 bis Tag 19 ließ sich dagegen in beiden Zellgruppen eine starke Zunahme der TGFβ positiven Zellen nachweisen.

4.4 VEGF Isoformen in Normalgewebe und in Lebermetastasen

VEGF-A wurde als Marker der Tumorneoangiogenese untersucht. Die VEGF-A Isoformen VEGF-A 1-4 wurden mittels RT-PCR gesondert untersucht.

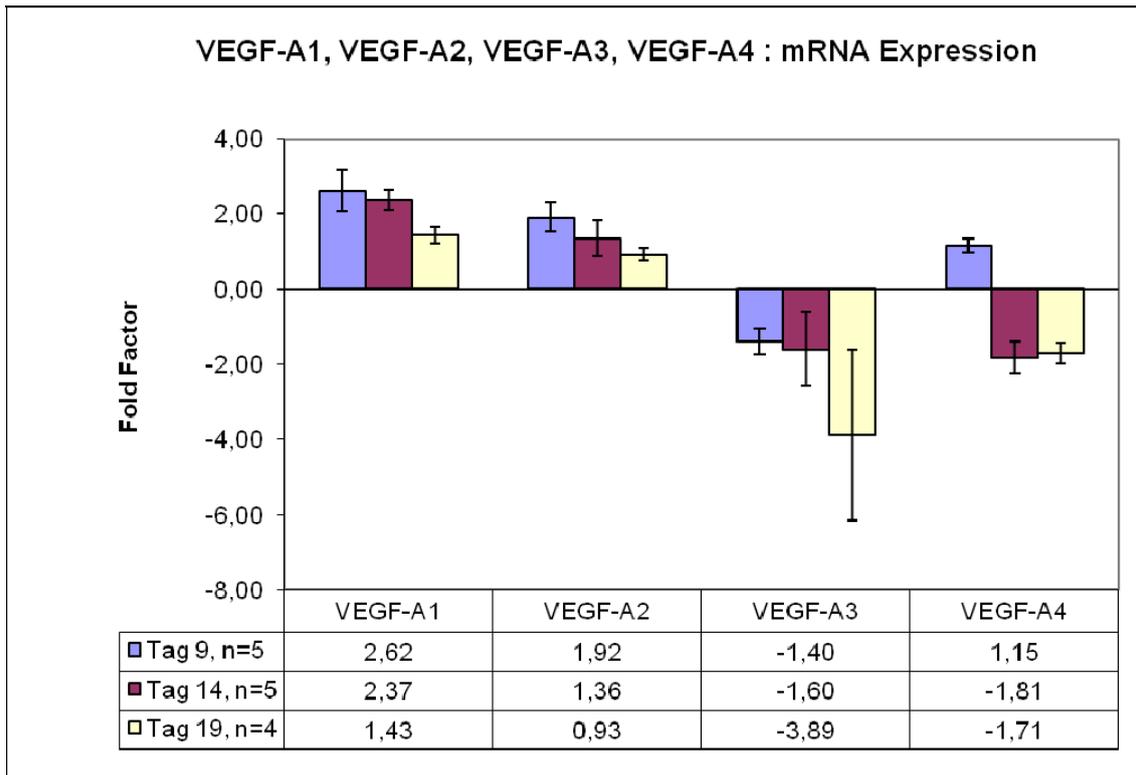


Abbildung 20: Darstellung der mRNA Expression der VEGF-A-Isoformen VEGF-A1 bis VEGF-A4. Der Unterschied zwischen den Werten von Tag 9 und Tag 19 ist bei VEGF-A1, VEGF-A2 und VEGF-A4 hochsignifikant. Für die Expressionskinetik der VEGF-A3 mRNA läßt sich ein abnehmender Trend belegen.

Signifikanzniveau (signifikant = $p < 0,05$; hochsignifikant = $p < 0,01$):

	9#14	14#19	9#19
VEGF-A1	0,2315	0,0019	0,0052
VEGF-A2	0,0523	0,0780	0,0019
VEGF-A3	0,3742	0,0749	0,0621
VEGF-A4	0,1980	0,4346	0,2887

Sowohl bei VEGF-A1 und VEGF-A2 ließ sich im Vergleich zum Normalgewebe an Tag 9 eine erhöhte mRNA Konzentration nachweisen. An Tag 9 lag im Metastasengewebe im Vergleich zum Normalgewebe eine 2,5-fach höhere VEGF-A1 mRNA Konzentration vor. Danach zeigte sich eine deutliche abnehmende Tendenz, an Tag 19 betrug die VEGF-A1 mRNA Konzentration nur noch das 1,5-fache des für das Normalgewebe erhobenen Wertes. Bei VEGF-A2 zeigte sich ein ähnlicher Verlauf. An Tag 9 (Versuchsgruppe A) wurde für VEGF-A2 eine zweifach höhere mRNA Konzentration nachgewiesen als im Normalgewebe, dieser Wert fiel bis Tag 14 auf das 1,5-Fache. An Tag 19 entsprach die VEGF-A2 mRNA Expression der Expression im Normalgewebe. VEGF-A3 mRNA lag zu allen Beobachtungszeitpunkten etwa im Bereich des Normalgewebes. Die Expression der VEGF-A4 mRNA fiel an den Tagen 14 und 19 unter das Niveau des Normalgewebes ab.

Anhand der molekulargenetischen Daten wurde weiterhin das mengenmäßige Verhältnis untersucht, in welchem die VEGF-A Isoformen zueinander stehen. VEGF-A4 mRNA war die Isoform, welche im Normalgewebe am stärksten exprimiert wurde.

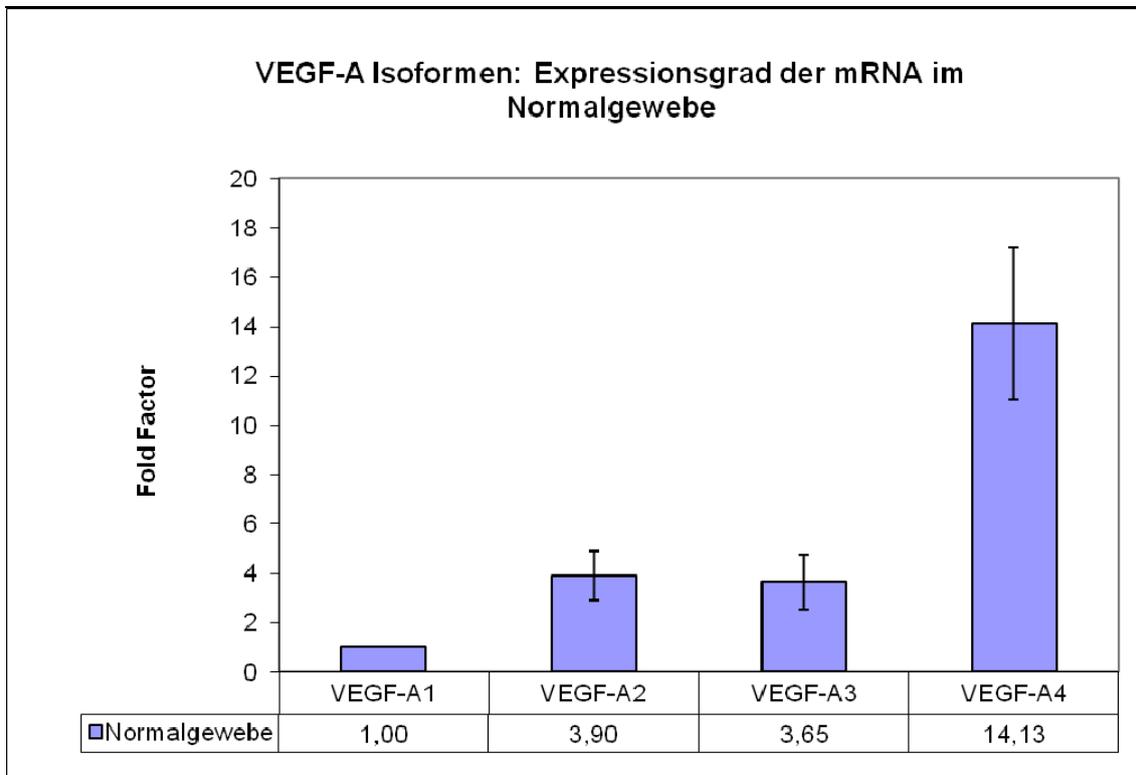


Abbildung 21 : Darstellung des mengenmäßigen Verhältnisses, in welchem die VEGF-A Isoformen im Normalgewebe zueinander stehen. Der Berechnung zu Grunde gelegt wurden die $\Delta C(t)$ Werte der Kontrollwerte der einzelnen Isoformen. VEGF-A1 wurde als Isoform mit dem höchsten $\Delta C(t)$ Wert auf 1 normiert. Bezogen auf diese Basis wurden die Foldfaktoren für die anderen Isoformen nach folgender Formel berechnet: $2^{(\Delta C(t)_{\text{Isoform}} - \Delta C(t)_{\text{VEGF-A1}})}$. Die Ergebnisse dieser Berechnung sind in dem vorliegenden Diagramm dargestellt. Die Berechnungen zeigen, dass im Normalgewebe die Isoform VEGF-A4 in der größten Menge vorliegt, gefolgt von den Isoformen VEGF-A2 und VEGF-A3 welche ähnliche Werte aufweisen.

Rechnet man die Mengenverhältnisse auf den kinetischen Verlauf um, so zeigt VEGF-A4 die im zeitlichen Verlauf stärkste abnehmende Tendenz. Bis auf VEGF-A1 zeigen alle VEGF Isoformen eine deutlich abnehmende Tendenz. Die molekulargenetischen Daten zeigten, dass an Tag 19 die mRNA von VEGF-A2 und VEGF-A4 am stärksten exprimiert wurde.

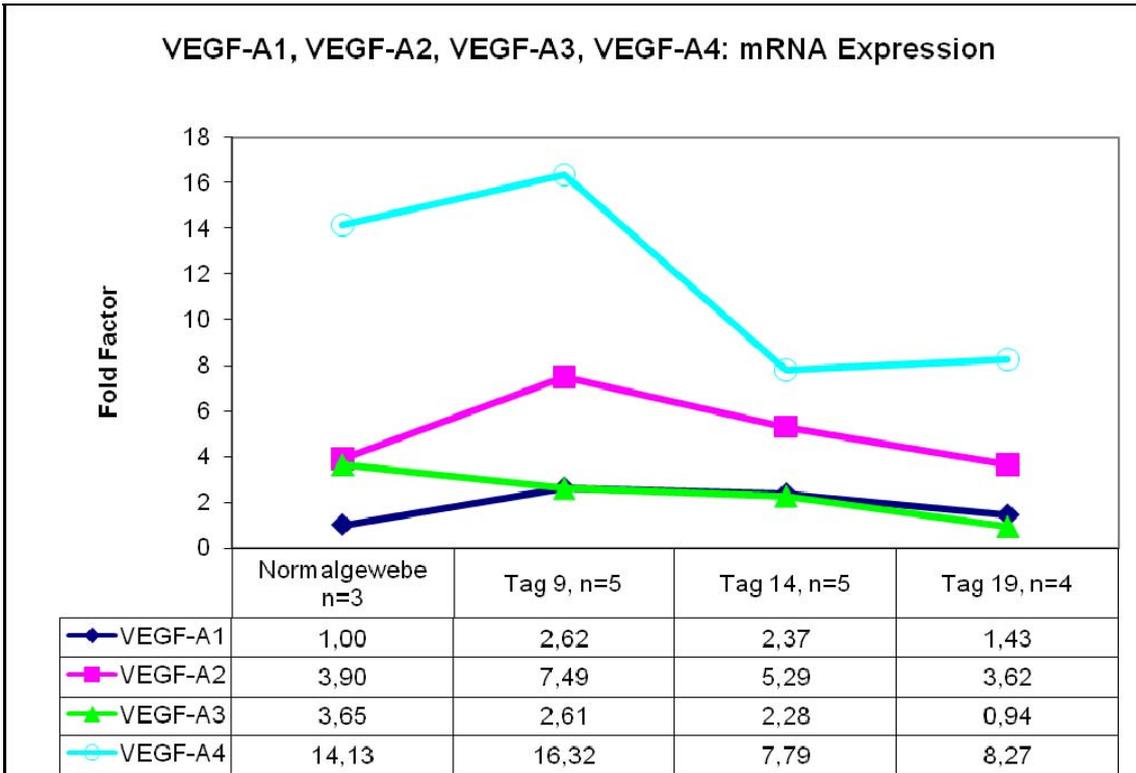


Abbildung 22: Darstellung der mRNA Expression der VEGF-A Isoformen unter Berücksichtigung der Mengenverhältnisse (vergleiche Abb 17). VEGF-A4 wies zu allen Zeitpunkten die höchste mRNA Konzentration aufweist. Die mRNA Expression aller vier VEGF-A Isoformen nimmt im zeitlichen Verlauf ab, wobei die Abnahme bei VEGF-A4 am stärksten ausgeprägt ist.

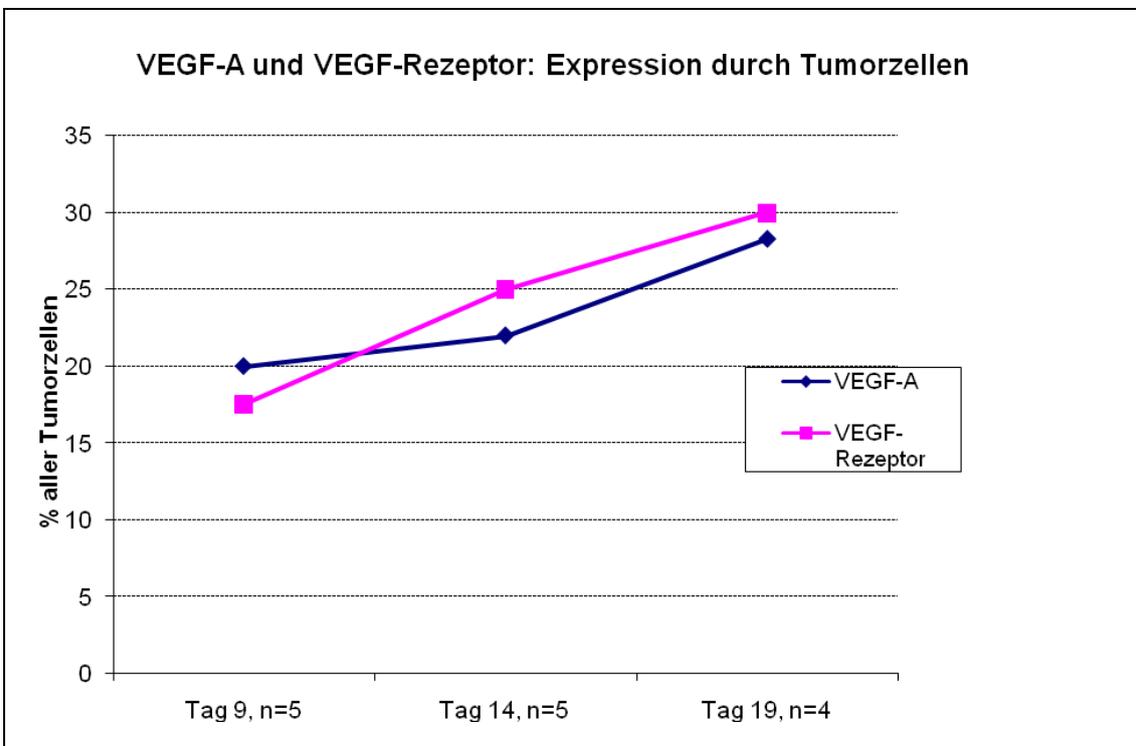


Abbildung 23: Darstellung der immunhistologischen Daten von VEGF-A und VEGF-Rezeptor. Sowohl der Anteil VEGF positiver Tumorzellen als auch der Anteil VEGF-R positiver Tumorzellen stieg im zeitlichen Verlauf an. Der Anteil VEGF-R exprimierender Tumorzellen verdoppelte sich von Tag 10 auf Tag 19.

Immunhistologisch zeigte sich eine deutliche Zunahme der VEGF-A Expression. An Tag 9 waren 20% der Tumorzellen für VEGF positiv, an Tag 14 22% sowie an Tag 19 28,3%. Die VEGF-R Expression nahm ebenfalls zu, der Prozentsatz der für VEGF-R positiv gefärbten Tumorzellen stieg von 17,5 auf 30% an.

5 Beantwortung der Fragestellungen

5.1 Th1/Th2 Immunantwort

In dieser Arbeit wurde die Expressionskinetik der für eine Th1 und Th2 Immunantwort typischen Zytokine an kolorektalen Lebermetastasen tierexperimentell sowohl molekulargenetisch mittels Real-Time PCR als auch auf Proteinebene an Einzel- und Doppelfärbungen immunhistologisch untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass im Lebermetastasengewebe des untersuchten Maus-Kolonkarzinommodells eine gemischte T-zelluläre Immunantwort vorliegt. IL-6, ein Zytokin der Th2 prävalenten Immunantwort, stieg als einziges der untersuchten Zytokine im zeitlichen Verlauf konstant an. IL-2 stellte das dominierende Th1 spezifische Zytokin auf mRNA Ebene dar, es wies als einziges Zytokin der Th1 Immunantwort eine gesteigerte mRNA Expression auf. Diese war zeitlich begrenzt. Immunhistologisch fand sich während der Tumorprogression insgesamt eine abnehmende Zahl von tumorinfiltrierenden Zellen, welche Th1- oder Th2-typische Zytokine wie IL-2, IL-4, TNF α und IFN γ exprimierten.

Die histomorphologischen und molekulargenetischen Ergebnisse weisen auf eine zunehmend abgeschwächte Immunantwort im Verlauf der Tumorprogression hin. Für die Zytokine der Th1 Immunantwort konnte kein über den gesamten Beobachtungszeitraum anhaltender positiver Trend festgestellt werden. Für die Th2 Immunantwort zeigt sich parallel dazu ein im zeitlichen Verlauf schwächer werdendes Expressionsmuster, wie an der abnehmenden Zahl IL-4 exprimierender tumorinfiltrierender Lymphozyten zu erkennen ist.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse auf eine anfangs Th1-geprägte Immunantwort hin, welche im Verlauf der Tumorerkrankung durch eine sich entwickelnde Th2 Immunantwort überlagert und negativ beeinflusst wird. Das Expressionsmuster der untersuchten Zytokine an den drei Beobachtungszeitpunkten liefert Hinweise auf eine insgesamt im zeitlichen Verlauf schwächer werdende Immunantwort.

Der Anstieg und nachfolgende Abfall der IL-2 Expression ging proportional mit der Kinetik der mRNA von IL-10, einem Zytokin der Th2 Immunantwort, einher. Die molekulargenetischen Daten zeigten eine deutliche Zunahme der mRNA Expression dieser beiden Zytokine von Tag 9 bis Tag 14. Bis Tag 19 fiel die mRNA Expression von IL-2 und IL-10 wieder auf das etwa Doppelte des Ausgangswertes von Tag 9 ab. Immunhistologisch zeigte sich dagegen eine leichte Abnahme des Anteils tumorinfiltrierender

Zellen, welche IL-2 exprimieren. So ist es wahrscheinlich, dass die verstärkte IL-2 mRNA Expression eher eine verstärkte IL-2 Produktion innerhalb einer spezifischen T-Zellsubpopulation widerspiegelt. Der IL-2 Gipfel könnte daher möglicherweise als Hinweis auf die verstärkte Proliferation und Differenzierung einer spezifischen Gruppe von Lymphozyten gewertet werden.

5.2 T-Zell Populationen

Immunhistologisch zeigte sich, dass CD4⁺ T-Zellen im Verlauf der Tumorprogression in die Lebermetastasen einwandern. Molekulargenetisch lagen hierbei lediglich geringe Schwankungen der CD4 mRNA vor, so dass auf eine starke Einwanderung von CD4⁺ Zellen in die Tumorzellverbände bei konstant bleibender Gesamtpopulation der CD4⁺ Zellen bezogen auf das Tumolvolumen geschlossen werden kann.

Im zeitlichen Verlauf stellte sich dagegen ein starker Anstieg der CD8 mRNA dar, der auf eine deutliche Zunahme tumorinfiltrierender CD8⁺ T-Zellen hinweist. Es fällt auf, dass die PD-1 mRNA eine Expressionskinetik aufwies, welche der Expressionskinetik der CD8 mRNA sehr ähnlich war. Sind es CD8⁺ T-Zellen, die PD-1 exprimieren, so könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass ein großer Anteil dieser CD8⁺ T-Zellen einerseits aktiviert ist, andererseits aber auch negativ reguliert werden könnte. Immunhistologisch zeigte sich interessanterweise nur eine geringe Zunahme des Anteils CD8 positiver T-Zellen an der Gesamtheit der tumorinfiltrierenden Zellen. Zusammenfassend können folgende Aussagen getroffen werden: Die Menge der CD4 positiven T-Zellen bleibt von Tag 9 bis Tag 19 weitestgehend konstant, es erfolgt aber eine verstärkte Migration von CD4⁺ T-Zellen in die proliferierenden Tumorzellnester. Die Subpopulation der CD8⁺ T-Zellen wächst hingegen deutlich an, der Verlauf des Markers PD-1 deutet darauf hin, dass große Anteile dieser Zellpopulation aktiviert sein müssten. Der Anteil an CD8⁺ T-Zellen im Bereich der Tumorzellnester nimmt dagegen kaum zu. CD8⁺ T-Zellen scheinen nicht in der Lage zu sein, in die Bereiche höchster Tumorzelldichte einzuwandern. Denkbar wäre auch eine erhöhte Apoptoserate in der CD8⁺ T-Zellpopulation, möglicherweise mitbedingt durch die verstärkte PD-1 Expression.

5.3 Regulatorische T-Zellen

Die morphologische und molekulare Untersuchung der Marker CD4, CD25, Foxp3 und CTLA4 sowie des Zytokins TGF β sollte die Populationsdynamik regulatorischer T-Zellen im Verlauf der Entstehung von Lebermetastasen näher charakterisieren. Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten eine starke Zunahme der Foxp3 mRNA an Tag 9 gegenüber dem Normalgewebe, also zu einem Zeitpunkt zu welchem es bereits zu einem fortgeschrittenen Tumorbefallsmuster der Leber gekommen war. Diese Expression blieb im weiteren Verlauf konstant. Die starke Zunahme der CTLA4 mRNA Expression von Tag 9 bis Tag 19 läßt zusammen mit den immunhistologischen Ergebnissen vermuten, dass ein Teil der Foxp3 positiven regulatorischen T-Zellen sich in ruhendem Zustand befindet und erst nach und nach aktiviert wird. Untermuert wird diese Annahme durch die immunhistochemisch nachgewiesene starke Zunahme der CTLA4+/CD4+ tumorinfiltrierenden T-Zellen. Die Daten lassen zusammenfassend auf eine im zeitlichen Verlauf konstant bleibende Gesamtpopulation von T-Zellen mit regulatorischen Charakteristika schließen, bzw. auf einen Pool von Foxp3+/CD4+ T-Zellen, welche im Zuge ihrer Aktivierung CTLA4 exprimieren.

Die immunhistologische Doppelfärbung zeigt für CD4/CD25, CD4/CTLA4 und CD4/Foxp3 im Bereich der Tumorzellnester eine stark zunehmende Infiltration von für diese Markerkombinationen positiven Zellen. Dies deutet auf eine deutliche Steigerung des Anteils regulatorischer T-Zellen unter den tumorinfiltrierenden T-Zellen in den Tumorzellnestern hin.

Insgesamt liefern die immunhistologischen und molekulargenetischen Daten Hinweise darauf, dass die Subpopulation von T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften innerhalb der ersten 9 Tage nach Tumorzellimplantation eine starke Expansion erfährt und in der weiteren Wachstumszeit weitestgehend statisch bleibt. Dies könnte bedeuten, dass die Zunahme aktiver regulatorischer T-Zellen ab einem frühen Zeitpunkt in der wachsenden Metastase vor allem durch die Aktivierung und Differenzierung bereits vorhandener Foxp3 positiver Zellen stattfindet. Möglicherweise ist die Zunahme Foxp3 positiver Zellen binnen der ersten Tage nach Tumorzellimplantation mitentscheidend für die weitere Entwicklung der peritumoralen Subpopulation regulatorischer T-Zellen.

Ein wichtiges Signal bei der Induktion von regulatorischen T-Zellen stellt das Zytokin TGF β dar. Real-Time PCR und Immunhistologie zeigen gleichermaßen eine Zunahme der TGF β Expression, immunhistologisch steigt der Anteil TGF β exprimierender Zellen sowohl bei den Tumorzellen als auch bei den tumorinfiltrierenden Zellen deutlich an. In

zahlreichen Publikationen wird diskutiert, dass die Zytokine TGF β und IL-2 die Differenzierung von T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften fördern. Möglicherweise wird der Differenzierungs- und Proliferationsschub der tumorinfiltrierenden Lymphozyten im Rahmen der sich ausbildenden tumorspezifischen Immunantwort mittels einer erhöhten tumoralen und lymphozytären TGF β Produktion blockiert. T-regulatorische Vorgänge im Tumor könnten damit einen *Tumor Escape Mechanismus* andeuten, durch welchen T-Zellen, die sich gerade in einem IL-2 induzierten Proliferationsschub befinden, über ansteigende TGF β Spiegel in einen Differenzierungspfad gelenkt werden, welcher zur Ausbildung von regulatorischen Eigenschaften führt.

Gleichzeitig muß berücksichtigt werden, dass durch die Expression von TGF β die Produktion von IL-6, einem proangiogenetischen und das Tumorwachstum fördernden Faktor, herunterreguliert wird. Die Stärkung der Subpopulation regulatorischer T-Zellen könnte somit mit einem Verlust an proangiogenetischen Faktoren erkauft sein.

5.4 Pro- und antiangiogenetische Faktoren

Unter den untersuchten Faktoren besitzen IL-6, TNF α und VEGF eine proangiogenetische Wirkung. IFN γ und IL-18 stellen dagegen antiangiogenetische Faktoren dar. Unsere Daten ergeben einen im zeitlichen Verlauf deutlichen Anstieg der proangiogenetischen Faktoren. IL-6 weist auf mRNA Ebene eine deutlich ansteigende Kinetik auf, immunhistochemisch konnte sowohl für VEGF als auch für TNF α gezeigt werden, dass diese Moleküle von einem wachsenden Anteil der Tumorzellen exprimiert werden.

Die antiangiogenetischen Faktoren zeigen dagegen im zeitlichen Verlauf ein gleichbleibendes Expressionsniveau bzw. eine leichte Abnahme. Die Expression der IFN γ mRNA bleibt im zeitlichen Verlauf weitestgehend unverändert, während die Expression der IL-18 mRNA deutlich abfällt. Immunhistologisch stellt sich eine deutliche Abnahme IFN γ exprimierender Tumorzellen dar.

Zusammenfassend spricht dies für die Ausbildung eines Tumormikromilieus, in welchem proangiogenetische Faktoren deutlich überwiegen. Deutlich wird außerdem, dass proliferierende Tumorzellen im Gewebsverbund offensichtlich aktiv in das Zytokin-gleichgewicht eingreifen und durch die Expression von Molekülen wie TNF α und VEGF ein Umfeld schaffen, welches Vorgänge der Neoangiogenese begünstigt. Auch trägt die Ausbildung einer Immunantwort, in welcher eine Th2 gerichtete Antwort überwiegt, zu einem proangiogenetischen Umfeld bei.

Als wichtigstes proangiogenetisches Molekül wurde VEGF-A untersucht. Die Analyse der Expression der vier häufigsten Isoformen erfolgte über RT-PCR. Die Daten zeigen für alle vier Isoformen eine im zeitlichen Verlauf abnehmende Überexpression. Dagegen nahm immunhistologisch der Anteil VEGF-A produzierender Tumorzellen zu. Es ist naheliegend, dass die VEGF-A Expression an der Tumordinvasionsfront hinsichtlich des Ausmaßes und der Geschwindigkeit der Tumorexpansion am aussagekräftigsten ist. Dagegen stellt die Messung der VEGF-A mRNA einen Durchschnittswert der VEGF-A Expression dar, in welchem sowohl das peritumorale Stroma als auch die ruhenden bis hochproliferativen Tumorbereiche erfasst werden.

Die Ergebnisse der RT-PCR scheinen somit für die differenzierte Analyse der VEGF-A Expression im Metastasengewebe nur zusammen mit der Immunhistologie geeignet zu sein. Die Immunhistologie ermöglicht eine differenzierte Analyse der VEGF-A Expression im Lebermetastasengewebe und stellt damit eine effiziente Technik zur Erfassung der Neoangiogenese und Tumorprogression dar.

5.5 Klinischer Bezug

Im Verlauf der untersuchten Wachstumszeit von 19 Tagen bildet sich im weit fortgeschrittenen Metastasengewebe zunehmend eine Th2 gerichtete Immunantwort aus. Auffällig erscheint das IL-2/IL-10 mRNA Expressionsmaximum am Tag 14, das möglicherweise den Wendepunkt markiert, an welchem die Tumorabwehr sich zu einer Th2 dominierten Antwort verändert. Durch Gabe von IL-2 bzw. von IL-10 blockierenden Antikörper könnte deshalb versucht werden, eine Th1 dominierte Immunantwort zu entwickeln. Weiterhin wäre es von Interesse festzustellen, ob die Serumspiegel von IL-2 und IL-10 einen ähnlichen zeitlichen Verlauf aufweisen wie die intratumorale mRNA Expression dieser Zytokine. Wäre dies der Fall, so könnte im Rahmen von Screeninguntersuchungen ein Anstieg von IL-2 und IL-10 unter Umständen als Zeichen für eine drohende Tumorexpansion genutzt werden.

IL-6 ist ein weiterer Parameter, dessen gesteigerte Expression als Hinweis für eine weitere Tumorprogression gewertet werden könnte. Die IL-6 mRNA Expression steigt mit Zunahme der Tumorlast deutlich an. Somit wäre IL-6 als Verlaufsp parameter bei kolorektalen Karzinomen zu überprüfen.

Die Real-Time PCR Ergebnisse zeigen ferner einen deutlichen Anstieg der mRNA Expression für die Oberflächenmarker PD-1 und CD8 α was für eine Zunahme des kosti-

mulatorischen Signals PD-1 und der CD8+ Zellen im Metastasengewebe spricht. Immunhistologisch zeigte sich hingegen eine während der Tumorprogression relativ konstant bleibende Population CD8 positiver T-Zellen. In die Tumorzellnester einwandernde CD8+ T-Zellen könnten folglich einer gesteigerten Apoptoseneigung unterliegen. Unter der Überlegung, dass eine erhöhte Apoptoseneigung teilweise durch die verstärkte Expression von PD-1 erklärt sein kann, wäre es von Interesse, mittels weiterer Versuche die Auswirkungen einer PD-1 Blockade zu untersuchen.

Interessanterweise zeigte sich immunhistologisch dagegen eine starke Zunahme des Anteils an CD4 positiven Zellen innerhalb der tumorinfiltrierenden Zellen, was gleichzeitig von einer konstant erhöhten CD4 mRNA Expression begleitet war. Die Foxp3 mRNA steigt bis Tag 9 beträchtlich an und bleibt danach erhöht. Dies spricht für eine Einwanderung bzw. Proliferation regulatorischer T-Zellen bis Tag 9, die sich im weiteren Verlauf aufrecht erhält. Möglicherweise kommt der Expansion der Subpopulation regulatorisch wirksamer T-Zellen eine zentrale Rolle bei der mangelhaften Ausbildung einer tumorspezifischen Immunantwort zu. Dementsprechend wäre es von Interesse die Auswirkung einer Blockade der regulatorischer T-Zellen zu untersuchen, z.B. mittels eines spezifischen Antikörpers gegen CTLA4.

Die zunehmende TGF β Expression wäre als ein weiterer auslösender Faktor für die Expansion der Subpopulation regulatorischer T-Zellen anzusehen. Die gesteigerte TGF β Expression innerhalb der tumorinfiltrierenden Zellen könnte mit gewisser Wahrscheinlichkeit auch auf die Zunahme regulatorischer T-Zellen zurückzuführen sein. Über die Verabreichung von IL-2 bzw. eines TGF β neutralisierenden Antikörpers könnte möglicherweise positiv Einfluss auf die Ausbildung einer effizienten tumorspezifischen Immunabwehr genommen werden.

Die Untersuchung der anti- und proangiogenetischen Faktoren zeigt, dass in dem Lebermetastasengewebe ein proangiogenetisches Milieu herrscht. Die Konzentration der proangiogenetischen Faktoren nimmt jedoch im zeitlichen Verlauf nicht in dem gleichen Maße zu wie die Tumorlast. Dies führt zu einer unzureichenden Blutersorgung des Tumorgewebes und zu der Ausbildung von Nekrosen. Eine weitere Blockade von proangiogenetischen Faktoren ist ein vielversprechender Ansatz zur Verlangsamung des Tumorwachstums in der Metastase. Die klinische Anwendung des VEGF blockierenden Antikörpers Bevacizumab hat bereits Eingang in die Klinik gefunden und wird zur Therapie von Patienten mit nicht kurativ resektablen kolorektalen Lebermetastasen eingesetzt. Bei Bevacizumab handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, der alle

VEGF Isoformen bindet. Die Ergebnisse zeigen, dass innerhalb des Lebermetastasengewebes VEGF-A4 sowie VEGF-A2 im höchsten Ausmaß exprimiert werden. Somit wäre es von Interesse, die Auswirkungen einer selektiven Blockade von VEGF-A4 zu untersuchen.

Daneben zeigen die Untersuchungen, dass die immunhistologische Untersuchung der VEGF Expression hinsichtlich der Wachstumsdynamik und Neoangiogenese des Metastasengewebes aussagekräftiger ist als über RT-PCR ermittelte Daten zur VEGF mRNA Expression. Da Wachstum und Invasion auf bestimmte, vorwiegend im Randbereich des Tumorgewebes lokalisierte Areale konzentriert sind, ist es sinnvoll diese Abschnitte gezielt zu untersuchen. Dagegen erscheint eine molekulargenetische Erfassung bestimmter Gewebeabschnitte problematisch und nur schwer standardisierbar.

6 Diskussion

6.1 Th1/Th2 Immunantwort

Die erhobenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass sich im Lebermetastasengewebe der Versuchstiere eine gemischte Th1 und Th2 gerichtete Immunantwort ausbildet. Eine relevante Th2 gerichtete Antwort würde zahlreiche Vorteile für das weitere Tumorstadium mitbringen, ein von Th2 Zytokinen dominiertes Mikromilieu im Tumor kann zudem als günstig für die notwendige Gefäßneubildung angesehen werden [21].

Weiterhin zeigt sich, dass die proangiogenetischen Faktoren TNF α und IL-6 während der Tumorstadium zunehmen, während antiangiogenetische Faktoren wie IL-18 und IFN γ unterdrückt werden. Damit ergibt sich im Bereich der Lebermetastasen ein deutlich überwiegendes proangiogenetisches Zytokinmilieu. Im Folgenden sollen die untersuchten Zytokine einzeln besprochen werden.

6.1.1 Th1 Antwort

Immunhistologisch exprimieren die tumorinfiltrierenden Zellen im Verlauf der Tumorstadium deutlich weniger IFN γ . Dies läßt auf eine abgeschwächte IFN γ Expression in den Tumorzellnestern schließen. IFN γ ist ein Zytokin, welches unter anderem auch die proangiogenetische Wirkung von TNF α unterdrückt. Indem IFN γ zusätzlich auf den Tumorzellen herunterreguliert wird, wird demnach ein Milieu gefördert, welches die Gefäßneubildung begünstigt. Dafür spricht auch die in dieser Arbeit getroffene Beobachtung, dass die Anzahl der TNF α exprimierenden Tumorzellen im zeitlichen Verlauf der Tumorentwicklung stark zunimmt. Gleichzeitig exprimieren die tumorinfiltrierenden Zellen weniger TNF α . Neben seiner proangiogenetischen Wirkung fördert TNF α zelluläre Prozesse, welche für das Fortschreiten einer Tumorerkrankung essentiell sind, so wie Wachstum, Invasion und Metastasierung [34]. Die gesteigerte tumoreigene TNF α Expression könnte demnach als ein Hinweis für das wachsende Metastisierungspotential der Tumorzellen gewertet werden. Die histomorphologischen Ergebnisse deuten folglich darauf hin, dass die verstärkte Expression von TNF α im zeitlichen Verlauf einen tumoreigenen Prozeß auf der Tumorzelle zurückgeführt werden kann. Ein weiteres Indiz für diese Schlußfolgerung stellt die IL-18 mRNA Konzentration dar. Im zeitlichen Verlauf der Tumorentwicklung zeigte sich eine signifikante Abnahme der IL-18 mRNA. IL-18 gilt als der stärkste IFN γ induzierende Faktor. Die Beobachtung,

dass IL-18 herunterreguliert wird, lässt sich daher gut damit in Einklang bringen, dass in der untersuchten Beobachtungszeit von einem frühen bis zu einem weit fortgeschrittenen Tumorstadium kein signifikanter Anstieg der IFN γ mRNA zu verzeichnen war. Sowohl IFN γ als auch IL-18 selbst üben eine antiangiogenetische Wirkung aus, so dass durch die geringe Expression dieser Zytokine ein angiogenesefreundliches Mikromilieu im Lebermetastasengewebe anzunehmen ist.

6.1.2 Th2 Antwort

IL-6, IL-4 und IL-10 wurden als typische Zytokine der Th2 Immunantwort untersucht. IL-6 mRNA war im Normalgewebe vernachlässigbar nachweisbar, im Metastasengewebe dagegen deutlich. Die IL-6 mRNA Expression stieg in fortgeschrittenen Tumormetastasen auf das etwa Fünffache des Ausgangswertes an. IL-6 ist ein Faktor, welcher zudem für die Gefäßneubildung im Rahmen der physiologischen Wundheilung essentiell ist und auch eine wichtige Rolle in der Tumorneoangiogenese spielt [21]. Die erhöhte Expression von IL-6 ist somit als Zeichen für einen wachsenden, angiogenetisch aktiven Tumor zu werten. Da IL-6 ein parakriner Wachstumsfaktor für die Tumorzellen ist, erscheint es nicht überraschend, dass der IL-6 Verlauf mit der Größenzunahme der Metastasen positiv korreliert. Es ist bekannt, dass die IL-6 Konzentration im Serum von Patienten mit kolorektalem Karzinom erhöht ist, wobei unter den Arbeitsgruppen unterschiedliche Ansichten hinsichtlich der Eignung des Serumspiegels von IL-6 als prognostischem Faktor bestehen [91, 92]. Wir stellten hierzu eine deutliche Korrelation zwischen der Höhe des IL-6 Expression im Tumorgewebe und dem Fortschreiten der Tumorerkrankung fest. Dies lässt sich gut mit den Ergebnissen von Chung et al in Einklang bringen [93]. Diese Arbeitsgruppe stellte fest, dass die erhöhte IL-6 Expression im Tumorgewebe von kolorektalen Karzinomen mit aggressivem Tumorwachstum und schlechter Prognose korreliert war. So wäre zu überlegen, ob der Spiegel der intratumoralen IL-6 Expression als Verlaufsparemeter bzw. als Prognosefaktor eingesetzt werden kann.

IL-4 mRNA konnte über Real-Time PCR Messungen weder im Normalgewebe noch im Metastasengewebe detektiert werden. Immunhistologisch zeigten sich allerdings sowohl wenige IL-4 positive tumorinfiltrierende Zellen als auch wenige IL-4 positive Tumor-

zellen. Sowohl der Anteil an IL-4 positiven Tumorzellen als auch der IL-4 positiver tumorinfiltrierender Zellen nahm dabei im zeitlichen Verlauf ab.

Bereits in anderen Studien war es nicht möglich gewesen, IL-4 mRNA über RT-PCR nachzuweisen [30]. Als IL-4 Primer wurden in den eigenen Untersuchungen Oligopeptide von Qiagen unter Befolgung des Herstellerprotokolls verwendet, so dass davon auszugehen ist, dass die Primer funktionstüchtig waren. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass die IL-4 mRNA so instabil ist, dass sie sich über herkömmliche RNA Extraktionsverfahren nicht intakt gewinnen läßt. Zu überlegen wäre auch, ob das im Gewebe nachgewiesene IL-4 möglicherweise aus dem systemischen Kreislauf stammt und sich an der Oberfläche von Zellen mit den entsprechenden Rezeptoren anreichert. Es ist bekannt, dass IL-4 bei Tumorpatienten im Serum erhöht ist [30, 94], so dass das immunhistologisch im Tumorgewebe nachgewiesene IL-4 auch systemisch entstanden sein könnte, so z.B. durch periphere Blutlymphozyten. Immunhistologisch waren jedoch eindeutig intrazytoplasmatische IL-4 Anreicherungen nachweisbar, welche für eine endogene IL-4 Produktion sprechen. Möglicherweise handelt es sich um ein multifaktorielles Problem, welches daraus entsteht, dass nur eine sehr geringe Zahl von Zellen tatsächlich IL-4 mRNA produziert und diese mRNA nur unzureichend aus den Gewebeproben extrahiert wurde. Systemisches IL-4 kann bei immunohistochemischem Nachweis zu einer falsch hohen Zahl an IL-4 positiven Zellen geführt haben.

Die Immunhistologie zeigt, dass die IL-4 Produktion sowohl der Tumorzellen als auch der tumorinfiltrierenden Zellen um 50% abnimmt. IL-4 ist ein für die Th2 Immunantwort typisches Zytokin, so dass mit IL-4 eine wichtige Komponente der Th2 Immunantwort herunterregelt ist.

Ebenso wie bei IL-6 wäre es von Interesse gewesen, die systemischen Konzentrationen von IL-4 aus dem Blut der Versuchstiere zu bestimmen um zu überprüfen, ob die Immunhistologie die systemische IL-4 Konzentrationen widerspiegelt.

Die IL-10 mRNA Expression sowie der Anteil tumorinfiltrierender Zellen, welche IL-10 exprimieren, zeigen einen ähnlichen Verlauf. Die Ergebnisse zeigen eine besonders ausgeprägte IL-10 Expression in fortgeschrittenen Lebermetastasen (Tag 14). Auf diesen Gipfel folgt ein deutlicher Abfall bis Tag 19. Auffällig ist, dass die Abnahme von IL-10 und auch von IL-2 mit einer verstärkten Expression von TGF β zusammenfällt. TGF β hemmt die Produktion von Zytokinen der Th1/Th2 Immunantwort, so dass der

Anstieg von TGF β ein Grund für die abnehmende mRNA Expression von IL-2 und IL-10 in weiter fortgeschrittenen Tumoren nach Tag 14 sein könnte.

6.1.3 IL-2 und IL-10 Expressionskinetik

Die RT-PCR Ergebnisse zeigen eine starke Zunahme der IL-10 und IL-2 mRNA Expression während der Tumorprogression von Tag 9 bis Tag 14. Dagegen nimmt die Zahl IL-2 exprimierender Zellen histomorphologisch ab. Dieser mRNA Expressionsgipfel könnte einen deutlichen Proliferations- und Differenzierungsschub innerhalb einer spezifischen Subpopulation von Lymphozyten bedeuten. Damit würde sich in dem wachsenden Metastasengewebe eine tumorspezifische Immunantwort ausbilden.

6.2 T-Zell Populationen

CD4 und CD8 wird auf CD4+ bzw CD8+ T-Zellen konstitutiv exprimiert [96]. Die in unseren RT-PCR Untersuchungen erhobenen Ergebnisse zu der CD4 mRNA Expression lassen auf eine im Gesamtverlauf statische CD4+ T-Zellpopulation schließen. Histologisch zeigt sich dagegen ein deutlicher Anstieg an CD4+ T-Zellen innerhalb der tumorinfiltrierenden Zellen von 16% auf 37%. Hierbei muss beachtet werden, dass im Rahmen der Immunhistologie von Tumorzellen dicht durchsetzte Gewebsareale analysiert und ausgezählt wurden. Das weiter entfernte peritumorale Stroma wurde dagegen nicht in die Auswertung mit einbezogen. Über RT-PCR wurden hingegen auch diese Areale miterfasst. Die über RT-PCR und Immunhistologie erhobenen Werte lassen zusammenfassend darauf schließen, dass CD4+ T-Zellen im zeitlichen Verlauf vermehrt in Tumorzellnestern einwandern. Bei unverändert erscheinender CD4+ T-Zell-Gesamtpopulation findet also eine Migration von CD4+ T-Zellen in den Bereich der Tumorzellnester statt. Immunhistologisch zeigt sich interessanterweise, dass die Anzahl der CTLA4+/Foxp3+ T-Zellen parallel dazu deutlich zunimmt. Dies ließe auf einen Anteil regulatorischer T-Zellen unter den CD4+ T-Zellen schließen.

Die parallel mit der CD8 α mRNA während der Tumorprogression zunehmend exprimierte PD-1 mRNA könnte zusammen mit den histomorphologischen Ergebnissen ein Hinweis darauf sein, dass die im Gewebe vorliegenden CD8+ T-Zellen sich in einem aktivierten Zustand befinden. Das PD-1 Molekül vermittelt über den T-Zellrezeptor kostimulatorisch negative Signale, welche zu einem Zellzyklusarrest führen. Aus der Literatur ist bekannt, dass bei chronischen viralen Infektionen wie einer HIV- und

HCV-Infektion eine Überexpression von PD-1 auf der Oberfläche von CD8+ T-Zellen ein Zeichen für den bevorstehenden Funktionsverlust der T-Zelle ist [97, 98]. Möglicherweise führt ein ähnlicher Mechanismus bei tumorspezifischen CD8+ Zellen zu einem „Erschöpfungszustand“, welcher die Immunantwort gegen den wachsenden Tumor beeinträchtigt. Es wäre von Interesse zu untersuchen, ob der Expressionsverlauf von PD-1 tatsächlich mit der Effizienz der Tumorimmunabwehr korreliert.

Osada et al bezifferten in ihrer Studie über kolorektale Lebermetastasen die Anteile der CD8+ T-Zellen und CD4+ T-Zellen an den tumorinfiltrierenden Lymphozyten mit 3% bzw 21,1 % [99]. Allerdings berichten andere Arbeitsgruppen, dass der Anteil allein der CD4+CD25+ regulatorischen T Zellen mehr als 20% des lymphozytären Tumorinfiltrates ausmachen kann [72], so dass davon auszugehen ist, dass über Migration und Proliferation einzelne Subpopulationen von T Zellen erheblich zunehmen können. Unsere immunhistochemischen Ergebnisse weisen ebenfalls auf eine starke Wachstumsdynamik der CD4+ T-Zellpopulation hin. Interessant wäre in diesem Zusammenhang gewesen, über FACS Analyse genaueren Aufschluss über die CD4+ und CD8+ T-Zell Populationskinetik im Lebermetastasengewebe zu erhalten.

6.3 Regulatorische T-Zellen

Unsere molekulargenetischen Ergebnisse zeigen einen Anstieg der Foxp3 mRNA im zeitlichen Verlauf der Tumorprogression. Untersuchungen zu CTLA4 haben ergeben, dass die Kinetik der intrazellulären CTLA4 Expression nach Stimulation mit anti-CD3 mAK parallel zu der Kinetik des Moleküls auf der Zelloberfläche verläuft [100]. Unsere Ergebnisse zeigen einen parallelen Verlauf der CTLA4 Expression auf mRNA- und Proteinebene, so dass unsere Ergebnisse im Einklang damit stehen. Perkins et al zeigten weiterhin, dass in nicht stimulierten T-Zellen keine CTLA4 mRNA vorliegt und dass CTLA4 auf Transkriptionsebene reguliert wird [101]. Dafür spricht, dass es sich bei den wenigen nachgewiesenen Foxp3 positiven Zellen im Normalgewebe um ruhende Vorstufen handelt, welche noch nicht aktiviert wurden und dementsprechend kein CTLA4 exprimieren. Dass sich die Foxp3 mRNA im Verlauf der Tumorprogression im Wesentlichen auf einem gleichbleibend erhöhten Niveau bewegt kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass die Proliferation bzw. Zuwanderung Foxp3 positiver Zellen bereits vor Tag 9 weitestgehend abgeschlossen erscheint, und dass die aktiven regulatorischen

T-Zellen in den Tumorzellnestern sich aus diesem Pool ruhender, Foxp3 positiver Zellen rekrutieren könnten.

Als charakteristisches Zytokin der regulatorischen T-Zellen wurde TGF β untersucht. Die TGF β mRNA stieg während des weiteren Tumorwachstums ab Tag 14 deutlich an. Die Kinetik von TGF β lässt also eine verstärkte Aktivität regulatorischer T-Zellen vermuten.

Interessant erscheint auch die histologisch nachgewiesene zunehmende TGF β Expression auf den Tumorzellen. Eventuell handelt es sich hierbei um eine Hemmung der Immunantwort durch den Tumor und damit um einen Mechanismus mit dem der Tumor lernt, der Tumorummunantwort zu entkommen. Der in dieser Arbeit beobachtete Abfall der IL-2 mRNA im proliferierenden Tumorgewebe wird begleitet von einem Anstieg der TGF β mRNA Expression durch die Tumorzellen. Während also aktivierte T-Zellen in das Tumorgewebe einwandern, exprimieren die Tumorzellen mit TGF β ein Zytokin, welches in Kombination mit dem Proliferations- und Differenzierungsfaktor IL-2 die Entstehung regulatorischer T-Zellen fördern könnte

6.4 VEGF Isoformen in Normalgewebe und Lebermetastasen

Von besonderem Interesse in dieser Arbeit ist der *Vascular Endothelial Growth Factor*, (VEGF) als wichtiger Faktor für die Neoangiogenese. Es zeigte sich für alle untersuchten VEGF-A Isoformen eine abnehmende Expression im zeitlichen Verlauf des Tumorwachstums. Während sich VEGF-A1 noch zu allen Meßzeitpunkten erhöht zeigte, sanken die mRNA Konzentrationen der anderen drei Isoformen unter die im Normalgewebe bestimmten Werte. Immunhistologisch war dagegen eine leicht zunehmende Expression für VEGF-A positive Tumorzellen zu verzeichnen. In der Literatur wird beschrieben, dass die VEGF Expression in einem Metastasenherd weitestgehend der VEGF Expression im Primärtumor entspricht [86]. Die höchste VEGF Expression ist in einem sich entwickelnden Adenom zu verzeichnen. Die einzelnen Karzinomstadien unterscheiden sich nicht hinsichtlich ihrer VEGF Expression [82, 85]. Unsere RT-PCR Ergebnisse weisen ebenfalls auf eine relativ konstante bzw. leicht abnehmende VEGF Expression im zeitlichen Verlauf hin. Zu beachten ist hierbei allerdings, dass in normalem Lebergewebe normalerweise eine bis zu vierfach höhere VEGF Expression vorliegt als im Gewebe eines Kolonkarzinoms bzw. im entsprechenden Metastasengewebe [86].

Insofern ist es auffällig, dass die VEGF-A Isoformen 1,2 und 4 über dem Niveau des Kontrollgewebes liegen. In der frühen Phase der Metastasenetablierung werden diese VEGF Isoformen offenbar stärker exprimiert, fallen dann aber deutlich ab.

Der Umstand, dass VEGF auf Protein- nicht aber mRNA Ebene im Verlauf der Tumorphprogression verstärkt exprimiert wird läßt sich damit erklären, dass für immunhistologische Untersuchungen bevorzugt Tumorproben aus den vitalen Tumorrändern entnommen werden, während die Ergebnisse der Real-Time PCR einen Mittelwert des Gesamtgewebes darstellen. Es ist bekannt, dass angiogenetische Prozesse vornehmlich in den Randgebieten des Tumors, also an der Invasionsfront stattfinden. Es besteht im Hinblick auf die Gefäßdichte im Tumor ein Gradient, welcher von der Peripherie in Richtung Tumorzentrum abnimmt. Im Tumorzentrum sind oftmals eher Nekrosen minderperfundierter Tumorareale zu finden [1]. So sind durchaus deutliche Unterschiede zwischen immunhistologischen und Real-Time PCR Ergebnissen vorstellbar, zumal das Metastasengewebe, aus welchem mRNA extrahiert wurde, nicht aus den Randgebieten des Tumors stammt.

6.5 Klinischer Bezug

In der klinischen Praxis werden bereits zahlreiche immunmodulatorische Therapiestrategien eingesetzt, weitere Therapiekonzepte werden in klinischen Studien auf ihre Wirksamkeit hin getestet.

So ist die systemische Anwendung von IL-2 bei der Therapie des Nierenzellkarzinoms [102] sowie des malignen Melanoms fest etabliert [103]. Limitierender Faktor für die systemische Anwendbarkeit von IL-2 sind schwere Nebenwirkungen, so insbesondere das *Vascular Leakage Syndrome* [104, 105]. Die lokoregionäre Anwendung von IL-2 bietet eine Möglichkeit zur Umgehung schwerer systemischer Nebenwirkungen. Studien am Mausmodell lieferten Hinweise auf eine therapeutische Wirksamkeit von lokoregionär angewandtem IL-2 bei kolorektalen Karzinomen. Auch die Kombination von IL-2 mit Chemotherapie scheint vielversprechend [106-110]. Möglicherweise wäre eine Chemoembolisation von hepatischen kolorektalen Metastasen in Verbindung mit einer Injektion von IL-2 in das Tumorgewebe therapeutisch wirksam.

Auch hinsichtlich einer Immuntherapie mittels TGF β Blockade gibt es bereits Vorstöße im klinischen Bereich. Ein TGF β neutralisierender Antikörper wird bereits in einer klinischen Phase 1 Studie ausgetestet [111].

Andere Studien weisen darauf hin, dass die Expression von PD-L1 bei Tumorentitäten wie dem Pankreaskarzinom [112] und Ösophaguskarzinom [113] mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Dementsprechend wird die Blockade des PD-L1/PD-1 Signalwegs als vielversprechende neue immunmodulatorische Strategie gewertet.

Weiterhin wurde ein CTLA4 neutralisierender Antikörper entwickelt, welcher im Rahmen einer klinischen Phase 3 Studie auch bei Patienten mit kolorektalem Karzinom eingesetzt wird [114].

Die Entwicklung dieser unterschiedlichen Antikörper wird möglicherweise den Weg für eine Vielzahl von neuen Therapiekonzepten ebnen. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass immunmodulatorische Strategien auch bei hepatischen Metastasen des kolorektalen Karzinoms aussichtsreich sind.

Bevacizumab als VEGF-Antikörper ist mittlerweile in der Therapie nicht operabler kolorektaler Metastasen etabliert. Problematisch erscheint, dass nur ein Teil der Patienten auf diese Therapie anspricht. Es gibt Hinweise darauf, dass die Wirksamkeit dieses Antikörpers von dem Gleichgewicht der einzelnen Isoformen im Tumormikromilieu abhängig ist [115]. Ein Screeningverfahren zur Feststellung des VEGF Expressionsmusters im Tumorgewebe könnte dabei helfen, Patienten zu identifizieren, welche von einer Therapie mit Bevacizumab profitieren können. Eine Entwicklung von weiteren, spezifisch gegen einzelne VEGF Isoformen gerichteten Antikörpern wäre folglich eine Möglichkeit, jedem Patienten eine maßgeschneiderte, auf sein jeweiliges VEGF Profil zugeschnittene antiangiogenetische Therapie zu bieten.

Von den untersuchten Markern zeigt IL-6 die stärkste Korrelation mit dem Verlauf des Tumorleidens im Mausmodell. In zahlreichen Studien wurde eine Korrelation von IL-6 mit dem Tumorstadium bei kolorektalen Karzinomen beschrieben [42, 116]. Die Eignung von IL-6 als unabhängigem prognostischem Faktor ist jedoch fraglich. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass IL-6 möglicherweise als Verlaufsparemeter des kolorektalen Karzinoms geeignet ist.

Hinsichtlich des von uns beobachteten IL-10/IL-2 Gipfels während des Metastasenwachstums gab es in der Literatur keine vergleichbaren Daten. Es wäre deswegen von Interesse, dieses Phänomen weiter zu untersuchen und möglicherweise im Rahmen von weiterführenden Experimenten erneut zu belegen, da dieser Zytokinspitzenpiegel den

Wendepunkt in der Ausbildung der körpereigenen Immunabwehr markieren könnte. Ein Screening hinsichtlich dieser beiden Zytokine könnte außerdem bei der Identifikation von Patienten mit hohem Risikoprofil für ein Metastasenwachstum dienen.

7 Zusammenfassung

Das Kolonkarzinom besitzt aufgrund seiner hohen Inzidenz und der zahlreichen Möglichkeiten, mittels moderner Therapiestrategien auf den Krankheitsverlauf Einfluss zu nehmen, eine hohe Relevanz für den klinischen Alltag. Etwa die Hälfte der an einem kolorektalen Karzinom erkrankten Patienten weisen Lebermetastasen auf, welche entweder bereits bei der primären Diagnosestellung vorliegen oder sich im weiteren Krankheitsverlauf ausbilden. Bei der Mehrzahl der Patienten mit Lebermetastasen ist derzeit nur eine palliative Therapie möglich. Die genaue Analyse kolorektaler Lebermetastasen ist somit unerlässlich, um eine gezielte Entwicklung neuer, effizienter Therapiestrategien für dieses große Patientenkollektiv zu ermöglichen.

Ziel dieser Arbeit war es, möglichst genau Zytokinprofil, lymphozytäres Infiltrationsmuster und Verhältnis von pro- zu antiangiogenetischen Faktoren im Lebermetastasengewebe über einen biologisch maßgeblichen Wachstumszeitraum zu charakterisieren, um zu einem besseren Verständnis von Tumorimmunologie und Wachstumsverhalten kolorektaler Lebermetastasen beizutragen. Zu diesem Zweck wurde in einem Mausmodell die Ausbildung kolorektaler Lebermetastasen nach intraportaler Injektion von Tumorzellen (CT26.WT) untersucht.

Im Lebermetastasengewebe bildete sich im Beobachtungszeitraum von insgesamt 19 Tagen eine Immunantwort mit Zeichen eines leicht überwiegenden Th2 Musters aus. Am auffälligsten erschien hierbei die verstärkte Expression von IL-6 parallel zur Entwicklung der Lebermetastasen. Eine Betonung der IL-2 Immunantwort stellt für die wachsende Lebermetastase einen Vorteil hinsichtlich der Immunabwehr dar. Zudem kam es bei weiter fortgeschrittenem Metastasenbefall in der Leber (Tag 14) zu einem parallel nachweisbaren starken Anstieg von IL-2 und IL-10 im Lebermetastasengewebe. Eine Th1 betonte Immunantwort, für die es im vorliegenden Modell keine Hinweise gibt, wäre nach heutiger Erkenntnis für die Etablierung einer effizienten Tumorabwehr günstiger. Daher wäre zu überlegen, ob durch eine Gabe von IL-2 sowie von IL-10 blockierenden Antikörpern eine Th1 gerichtete Immunantwort verstärkt induziert werden könnte. Auch wären die Zytokine IL-2 und IL-10 möglicherweise als Screening Parameter von Nutzen, da deren Anstieg eine stattfindende Tumorexpanansion widerspiegeln könnte.

Hinsichtlich des lymphozytären Infiltrationsmusters liefern die Ergebnisse deutliche Hinweise darauf, dass im Bereich der Tumorzellnester eine Zunahme der regulatori-

schen CD4⁺ T-Zellen stattfindet, während die Subpopulation der CD8⁺ T-Zellen abnimmt. Als Ursache kämen eine unzureichende Zellmigration in die Metastasen oder eine durch die hohe PD-1 Expression bedingte Apoptoseneigung der CD8⁺ T-Zellen in Betracht. Es wäre somit von Interesse festzustellen, ob über eine antikörperbasierte Blockade von PD-1 ein positiver Einfluß auf die CD8⁺ T-Zell Subpopulation genommen werden kann.

Weiterhin gibt es Hinweise, dass regulatorische T-Zellen bereits zu einem frühen Zeitpunkt im Metastasengewebe expandieren und während des weiteren Metastasenwachstums aktiviert vorliegen. Dementsprechend wäre es von Interesse zu untersuchen, ob über eine Blockade des TGF β Signals die Aktivierung und weitere Differenzierung der Population regulatorischer T-Zellen gehemmt werden kann. Ein weiterer möglicher Ansatz wäre eine Blockade von CTLA4 mittels eines spezifischen Antikörpers.

Die Untersuchung der pro- und antiangiogenetischen Faktoren im zeitlichen Verlauf ergab die Ausbildung eines deutlich proangiogenetischen Milieus im Metastasengewebe. Im Gegensatz zu IL-6 und TNF α nimmt die VEGF mRNA Expression im zeitlichen Verlauf allerdings nicht zu, vielmehr lässt sich bei zunächst vorliegender Überexpression der VEGF Isoformen eine abnehmende Tendenz feststellen. Im Metastasengewebe vorhandene nekrotische Areale können als Hinweis darauf gewertet werden, dass der Umfang der Neoangiogenese im Metastasengewebe trotz des proangiogenetischen Milieus langfristig unzureichend ist. Eine Blockade des im Metastasengewebe am stärksten exprimierten VEGF Isoform VEGF-A4 mittels Antikörper ist deshalb eine vielversprechende Strategie, um das Tumorstadium zu verlangsamen und eine Nekrose größerer Tumorknoten herbeizuführen.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten werden nun dazu verwendet, gezielt neue immunologische und antiangiogenetische Therapieansätze zu erarbeiten.

8 Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Schematische Darstellung der indirekten Nachweismethode mit dem ersten Enzym-Substrat-Komplex, bestehend aus Primär- und Sekundär-AK. Die HRP-Konjugation stellt sich auf dem Gewebe als bräunlicher Farbton dar. HRP, Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase); AK, Antikörper.	32
Abbildung 2: Darstellung des Zytokins IL-2 im Lebermetastasengewebe an Tag 9 nach intraportaler Injektion von 1×10^6 CT26WT Tumorzellen mittels Einfachfärbung. Die IL-2 positiven Zellen sind braun markiert.	32
Abbildung 3: Schema der fertigen immunenzymatischen Doppelfärbung am Mausgewebe. Dargestellt ist die Bindung der Primär-AK und der HRP- (bräunlicher Farbton) bzw. AP- (roter Farbton) konjugierten Sekundär-AK. HRP, Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase); AP, alkalische Phosphatase; AK, Antikörper.	33
Abbildung 4: Darstellung der Marker CD4 und Foxp3 im Lebermetastasengewebe an Tag 19 nach intraportaler Injektion von 1×10^6 CT26.WT Tumorzellen. Die Foxp3/CD4 positiven Zellen sind mit zwei Farbtönen (rot und braun) markiert.	34
Abbildung 5: Darstellung der Entwicklung der Lebermetastasen nach intraportaler Injektion von 1×10^6 CT26.WT Tumorzellen. Es zeigte sich bei allen Tieren eine kontinuierliche Zunahme des Tumorumfanges innerhalb des Beobachtungszeitraums von 19 Tagen.....	36
Abbildung 6: Histomorphologie einer repräsentativen Lebermetastase 15 Tage nach intraportaler Injektion von 1×10^6 CT26.WT Tumorzellen (Randbereich des Tumors mit Pfeilen markiert, HE, 400x). 37	37
Abbildung 7: Darstellung der mRNA Expression der Zytokine IL-2, $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ und IL-18 im zeitlichen Verlauf. Das Diagramm zeigt einen Peakwert der IL-2 mRNA an Tag 14, die Zunahme der IL-2 mRNA von Tag 10 auf Tag 14 ist hochsignifikant. Im Unterschied dazu liegt eine statistisch signifikante Abnahme der IL-18 mRNA Produktion zwischen Tag 10 und Tag 19 vor. Schließlich zeigt sich bezogen auf die Kontrollgruppe eine verstärkte Expression der mRNA von $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ im Lebermetastasengewebe, zwischen Tag 10 und Tag 19 liegt allerdings keine statistisch signifikante Veränderung des Expressionsniveaus vor.	38
Abbildung 8: Graphische Darstellung der immunhistologisch erhobenen Werte der Zytokine IL-2, $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$. Der Anteil aller tumorinfiltrierenden Zellen, welche diese Zytokine exprimieren, nimmt im zeitlichen Verlauf ab. Am deutlichsten zeigt sich dieser Trend bei $IFN\gamma$. Auch in der Gruppe der tumorinfiltrierenden Zellen verringert sich der Anteil der Zellen, welche die Zytokine IL-2 und $IFN\gamma$ exprimieren. Der Anteil an Tumorzellen, welcher $TNF\alpha$ exprimiert, nimmt dagegen sprunghaft zu. Während an Tag 10 weniger als 5% aller Tumorzellen $TNF\alpha$ exprimierten, waren an Tag 19 30% aller Tumorzellen für $TNF\alpha$ positiv.	39
Abbildung 9 : Darstellung der IL-6 mRNA Expression im zeitlichen Verlauf. Während im Normalgewebe keine IL-6 mRNA nachweisbar war, fand sich eine erhöhte Expression an allen Beobachtungstagen (Werte an Tag 9 auf 1 genormt, Berechnung des Foldfaktors für Tag 14 und 19 auf der Basis von Tag 9).....	40
Abbildung 10 : Darstellung IL-10 mRNA Expression im zeitlichen Verlauf. Von Tag 10 bis Tag 14 wurde eine hochsignifikante Zunahme, von Tag 14 bis Tag 19 eine signifikante Abnahme des IL-10 mRNA Expressionslevels beobachtet. An Tag 14 liegt ein Peakwert der IL-10 mRNA vor.	41
Abbildung 11: Immunhistologisch erhobene Werte für IL-4 und IL-10. Das Diagramm zeigt, dass der Anteil der Tumorzellen, welche IL-4 und IL-10 exprimierten, im zeitlichen Verlauf abnimmt. Bei den tumorinfiltrierenden Zellen zeigte sich ebenfalls eine stetige Abnahme des Anteils IL-4 positiver Zellen. Die Population IL-10 positiver tumorinfiltrierender Zellen erreichte an Tag 14 einen Peakwert, fiel aber bis Tag 19 wieder auf den Ausgangswert ab.	42
Abbildung 12: Fold-Factor basierte Darstellung der mRNA Expression der Zytokine IL-2 und IL-10 im zeitlichen Verlauf. Die für den Tag 9 bestimmten Werte wurden sowohl für IL-2 als auch für IL-10 auf den Wert 1 genormt. Die Foldfactor-Werte für den Tag 14 und 19 wurden auf dieser Basis berechnet. Vergleicht man die Fold-Factor Werte von IL-2 und IL-10 innerhalb jeweils einer Gruppe, so ergibt sich	

für keines der drei Gruppen-Paare ein statistisch signifikanter Unterschied. Hinsichtlich der mRNA Expression ergibt sich für die Zytokine IL-2 und IL-10 eine identische Kinetik. 43

Abbildung 13: Darstellung der mRNA Expression der Zellmarker CD4 und CD8 α zusammen mit PD-1 im zeitlichen Verlauf. Die für den Tag 9 bestimmten Werte wurden für CD8 α , CD4 und PD-1 auf den Wert 1 genormt. Die Fold-Factor-Werte für die Tage 14 und 19 wurden auf dieser Basis berechnet. Es zeigte sich eine hochsignifikante Zunahme der CD8 α mRNA und PD-1 mRNA von Tag 9 bis Tag 14 sowie eine signifikante Zunahme von Tag 14 bis Tag 19. Hinsichtlich der mRNA Expression von CD4 fiel eine signifikante Abnahme um 50% von Tag 9 bis Tag 14 sowie eine signifikante Zunahme um 100% von Tag 14 bis Tag 19 auf. Die CD4 mRNA Expressionslevels von Tag 9 und Tag 19 waren annähernd gleich. 44

Abbildung 14: Darstellung der immunhistologisch erhobenen Werte für CD8 α und CD4. Die Graphik zeigt eine deutliche Zunahme des Anteils CD4 positiver tumorinfiltrierender Zellen im zeitlichen Verlauf. Der Anteil der CD8 α positiven tumorinfiltrierenden Zellen blieb dagegen zwischen Tag 9 und 19 mit einem Niveau von ca. 20% relativ konstant. 45

Abbildung 15: Darstellung der CD4 und Foxp3 sowie der TGF β mRNA Expression im zeitlichen Verlauf. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Foxp3 mRNA Expressionswerten im zeitlichen Verlauf. Dagegen stellte sich ein signifikanter Anstieg der TGF β mRNA Expression von Tag 9 bis Tag 14 dar. Von Tag 14 bis Tag 19 fand dagegen kein weiterer signifikanter Anstieg der TGF β mRNA Expression statt. 46

Abbildung 16: Graphische Darstellung der immunhistologisch erhobenen Werte für folgende Doppelbestimmungen: CD4/CD25, CD4/CTLA4 und CD4/Foxp3. Es wurde bestimmt, welcher Anteil der tumorinfiltrierenden Zellen die genannten Marker-Kombinationen exprimiert. Für alle drei Marker-Kombinationen konnte im zeitlichen Verlauf eine Zunahme doppelt positiver Zellen festgestellt werden. Weiterhin wiesen alle drei Marker-Kombinationen einen vergleichbaren aufsteigenden Trend auf. 47

Abbildung 17: Darstellung der CTLA4 mRNA Expressionswerte im zeitlichen Verlauf. CTLA-4 mRNA fand sich nicht im Normalgewebe. Die am Tag 9 in den Metastasen erhobenen Werte wurden auf 1 genormt, und der Fold-Factor für die Tage 14 und 19 auf dieser Basis berechnet. Es zeigt sich eine signifikante Zunahme der CTLA4 mRNA von Tag 14 bis Tag 19, während das Expressionsniveau von Tag 9 bis Tag 14 etwa gleich bleibt. 48

Abbildung 18: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Zellmarker Foxp3 und CTLA4. Es handelt sich um molekulargenetische Daten. Sowohl bei Foxp3 als auch bei CTLA4 wurden die für Tag 9 erhobenen Werte auf 1 genormt. Auf der Basis dieser Ausgangswerte wurden die Fold-Faktoren für Tag 14 und 19 proportional umgerechnet. Sowohl für Foxp3 als auch für CTLA4 wurde eine Regressionsgerade in den zeitlichen Verlauf gelegt. Die den Werten von CTLA4 zugehörige Regressionsgerade weist mit $m=0,412$ eine größere Steigung auf als die Regressionsgerade zum Verlauf der Foxp3 Werte ($m=0,125$). 49

Abbildung 19: Immunhistologisch erhobene Werte für TGF β . Sowohl bei den Tumorzellen als auch bei den tumorinfiltrierenden Zellen ist der Anteil TGF β positiver Zellen an Tag 9 und Tag 14 als konstant zu betrachten. Von Tag 14 bis Tag 19 ließ sich dagegen in beiden Zellgruppen eine starke Zunahme der TGF β positiven Zellen nachweisen. 50

Abbildung 20: Darstellung der mRNA Expression der VEGF-A-Isoformen VEGF-A1 bis VEGF-A4. Der Unterschied zwischen den Werten von Tag 9 und Tag 19 ist bei VEGF-A1, VEGF-A2 und VEGF-A4 hochsignifikant. Für die Expressionskinetik der VEGF-A3 mRNA läßt sich ein abnehmender Trend belegen. 51

Abbildung 21: Darstellung des mengenmäßigen Verhältnisses, in welchem die VEGF-A Isoformen im Normalgewebe zueinander stehen. Der Berechnung zu Grunde gelegt wurden die $\Delta C(t)$ Werte der Kontrollwerte der einzelnen Isoformen. VEGF-A1 wurde als Isoform mit dem höchsten $\Delta C(t)$ Wert auf 1 normiert. Bezogen auf diese Basis wurden die Foldfaktoren für die anderen Isoformen nach folgender Formel berechnet: $2^{(\Delta C(t)_{\text{Isoform}} - \Delta C(t)_{\text{VEGF-A1}})}$. Die Ergebnisse dieser Berechnung sind in dem vorliegenden Diagramm dargestellt. Die Berechnungen zeigen, dass im Normalgewebe die Isoform VEGF-A4 in der größten Menge vorliegt, gefolgt von den Isoformen VEGF-A2 und VEGF-A3 welche ähnliche Werte aufweisen. 52

Abbildung 22: Darstellung der mRNA Expression der VEGF-A Isoformen unter Berücksichtigung der Mengenverhältnisse (vergleiche Abb 17). VEGF-A4 wies zu allen Zeitpunkten die höchste mRNA Konzentration aufweist. Die mRNA Expression aller vier VEGF-A Isoformen nimmt im zeitlichen Verlauf ab, wobei die Abnahme bei VEGF-A4 am stärksten ausgeprägt ist. 53

Abbildung 23: Darstellung der immunhistologischen Daten von VEGF-A und VEGF-Rezeptor. Sowohl der Anteil VEGF positiver Tumorzellen als auch der Anteil VEGF-R positiver Tumorzellen stieg im zeitlichen Verlauf an. Der Anteil VEGF-R exprimierender Tumorzellen verdoppelte sich von Tag 10 auf Tag 19.....53

9 Literaturverzeichnis

1. Giatromanolaki, A., E. Sivridis, and M.I. Koukourakis, *Angiogenesis in colorectal cancer: prognostic and therapeutic implications*. Am J Clin Oncol, 2006. **29**(4): p. 408-17.
2. Weitz, J., et al., *Colorectal cancer*. Lancet, 2005. **365**(9454): p. 153-65.
3. Itzkowitz, S.H. and X. Yio, *Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **287**(1): p. G7-17.
4. Bernstein, C.N., et al., *Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study*. Cancer, 2001. **91**(4): p. 854-62.
5. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-7.
6. Compton, C.C. and F.L. Greene, *The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond*. CA Cancer J Clin, 2004. **54**(6): p. 295-308.
7. Mocellin, S., et al., *Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(1): p. 35-53.
8. Antoniou, A., et al., *Meta-analysis of clinical outcome after first and second liver resection for colorectal metastases*. Surgery, 2007. **141**(1): p. 9-18.
9. Hurwitz, H.I., et al., *Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(15): p. 3502-8.
10. Takeda, A., et al., *Role of angiogenesis in the development and growth of liver metastasis*. Ann Surg Oncol, 2002. **9**(7): p. 610-6.
11. Mi, J., et al., *A comparison of antiangiogenic therapies for the prevention of liver metastases*. J Surg Res, 2006. **131**(1): p. 97-104.
12. 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.
13. Janeway, C.A., Jr., *A trip through my life with an immunological theme*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 1-28.
14. Yamazaki, T., et al., *Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC*. J Immunol, 2002. **169**(10): p. 5538-45.
15. Carreno, B.M. and M. Collins, *The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 29-53.
16. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 303-10.
17. Jago, C.B., et al., *Differential expression of CTLA-4 among T cell subsets*. Clin Exp Immunol, 2004. **136**(3): p. 463-71.
18. Ghosh, P., et al., *Gradual loss of T-helper 1 populations in spleen of mice during progressive tumor growth*. J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(19): p. 1478-83.
19. Nishimura, T., et al., *Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo*. J Exp Med, 1999. **190**(5): p. 617-27.
20. DuBois, R.N., *Cyclooxygenase-2 and colorectal cancer*. Prog Exp Tumor Res, 2003. **37**: p. 124-37.

21. O'Byrne, K.J. and A.G. Dalgleish, *Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy*. Br J Cancer, 2001. **85**(4): p. 473-83.
22. Sharma, S., et al., *Cyclooxygenase 2 inhibition promotes IFN-gamma-dependent enhancement of antitumor responses*. J Immunol, 2005. **175**(2): p. 813-9.
23. Kondo, T., et al., *Favorable prognosis of renal cell carcinoma with increased expression of chemokines associated with a Th1-type immune response*. Cancer Sci, 2006. **97**(8): p. 780-6.
24. Mashino, K., et al., *Effective strategy of dendritic cell-based immunotherapy for advanced tumor-bearing hosts: the critical role of Th1-dominant immunity*. Mol Cancer Ther, 2002. **1**(10): p. 785-94.
25. Huang, J., et al., *Modulation by IL-2 of CD70 and CD27 expression on CD8+ T cells: importance for the therapeutic effectiveness of cell transfer immunotherapy*. J Immunol, 2006. **176**(12): p. 7726-35.
26. Kamimura, D., et al., *IL-2 in vivo activities and antitumor efficacy enhanced by an anti-IL-2 mAb*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 306-14.
27. Tanaka, F., et al., *Rapid generation of potent and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes by interleukin 18 using dendritic cells and natural killer cells*. Cancer Res, 2000. **60**(17): p. 4838-44.
28. Nakamori, M., et al., *Intensification of antitumor effect by T helper 1-dominant adoptive immunogene therapy for advanced orthotopic colon cancer*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(6): p. 2357-65.
29. Cao, R., et al., *Interleukin-18 acts as an angiogenesis and tumor suppressor*. Faseb J, 1999. **13**(15): p. 2195-202.
30. Csiszar, A., et al., *The pattern of cytokine gene expression in human colorectal carcinoma*. Pathol Oncol Res, 2004. **10**(2): p. 109-16.
31. Choo, M.K., et al., *Stimulation of cultured colon 26 cells with TNF-alpha promotes lung metastasis through the extracellular signal-regulated kinase pathway*. Cancer Lett, 2005. **230**(1): p. 47-56.
32. Lejeune, F.J., et al., *Efficiency of recombinant human TNF in human cancer therapy*. Cancer Immun, 2006. **6**: p. 6.
33. Lee, H., et al., *Modulation of IFN-gamma production by TNF-alpha in macrophages from the tumor environment: significance as an angiogenic switch*. Int Immunopharmacol, 2006. **6**(1): p. 71-8.
34. Khatib, A.M., et al., *Characterization of the host proinflammatory response to tumor cells during the initial stages of liver metastasis*. Am J Pathol, 2005. **167**(3): p. 749-59.
35. Simiantonaki, N., C. Jayasinghe, and C.J. Kirkpatrick, *Effect of pro-inflammatory stimuli on tumor cell-mediated induction of endothelial cell adhesion molecules in vitro*. Exp Mol Pathol, 2002. **73**(1): p. 46-53.
36. Tremblay, P.L., F.A. Auger, and J. Huot, *Regulation of transendothelial migration of colon cancer cells by E-selectin-mediated activation of p38 and ERK MAP kinases*. Oncogene, 2006. **25**(50): p. 6563-73.
37. Yan, B., et al., *Tumor necrosis factor-alpha is a potent endogenous mutagen that promotes cellular transformation*. Cancer Res, 2006. **66**(24): p. 11565-70.
38. Beatty, G. and Y. Paterson, *IFN-gamma-dependent inhibition of tumor angiogenesis by tumor-infiltrating CD4+ T cells requires tumor responsiveness to IFN-gamma*. J Immunol, 2001. **166**(4): p. 2276-82.
39. Rincon, M., et al., *Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells*. J Exp Med, 1997. **185**(3): p. 461-9.

40. Maggi, E., et al., *Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones*. J Immunol, 1992. **148**(7): p. 2142-7.
41. Skapenko, A., et al., *The IL-4 receptor alpha-chain-binding cytokines, IL-4 and IL-13, induce forkhead box P3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells from CD25-CD4+ precursors*. J Immunol, 2005. **175**(9): p. 6107-16.
42. Chung, Y.C. and Y.F. Chang, *Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer*. J Surg Oncol, 2003. **83**(4): p. 222-6.
43. Galizia, G., et al., *Prognostic significance of circulating IL-10 and IL-6 serum levels in colon cancer patients undergoing surgery*. Clin Immunol, 2002. **102**(2): p. 169-78.
44. Nilsson, M.B., R.R. Langley, and I.J. Fidler, *Interleukin-6, secreted by human ovarian carcinoma cells, is a potent proangiogenic cytokine*. Cancer Res, 2005. **65**(23): p. 10794-800.
45. Becker, C., et al., *TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 491-501.
46. Becker, C., et al., *IL-6 signaling promotes tumor growth in colorectal cancer*. Cell Cycle, 2005. **4**(2): p. 217-20.
47. Walia, B., et al., *TGF-beta down-regulates IL-6 signaling in intestinal epithelial cells: critical role of SMAD-2*. Faseb J, 2003. **17**(14): p. 2130-2.
48. Adris, S., et al., *IL-10 expression by CT26 colon carcinoma cells inhibits their malignant phenotype and induces a T cell-mediated tumor rejection in the context of a systemic Th2 response*. Gene Ther, 1999. **6**(10): p. 1705-12.
49. Kokura, S., et al., *Interleukin-10 plasmid DNA inhibits subcutaneous tumor growth of Colon26 adenocarcinoma in mice*. Cancer Lett, 2005. **218**(2): p. 171-9.
50. Mocellin, S., F.M. Marincola, and H.A. Young, *Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(5): p. 1043-51.
51. Ademmer, K., et al., *Effector T lymphocyte subsets in human pancreatic cancer: detection of CD8+CD18+ cells and CD8+CD103+ cells by multi-epitope imaging*. Clin Exp Immunol, 1998. **112**(1): p. 21-6.
52. Naito, Y., et al., *CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer*. Cancer Res, 1998. **58**(16): p. 3491-4.
53. Pages, F., et al., *Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(25): p. 2654-66.
54. Horwitz, D.A., S.G. Zheng, and J.D. Gray, *The role of the combination of IL-2 and TGF-beta or IL-10 in the generation and function of CD4+ CD25+ and CD8+ regulatory T cell subsets*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(4): p. 471-8.
55. Casares, N., et al., *CD4+/CD25+ regulatory cells inhibit activation of tumor-primed CD4+ T cells with IFN-gamma-dependent antiangiogenic activity, as well as long-lasting tumor immunity elicited by peptide vaccination*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 5931-9.
56. Shevach, E.M., *CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(6): p. 389-400.
57. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
58. Wolf, A.M., et al., *Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(2): p. 606-12.

59. Sasada, T., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression*. *Cancer*, 2003. **98**(5): p. 1089-99.
60. Okita, R., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with breast cancer and non-small cell lung cancer*. *Oncol Rep*, 2005. **14**(5): p. 1269-73.
61. Ormandy, L.A., et al., *Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma*. *Cancer Res*, 2005. **65**(6): p. 2457-64.
62. Loddenkemper, C., et al., *In situ analysis of FOXP3+ regulatory T cells in human colorectal cancer*. *J Transl Med*, 2006. **4**: p. 52.
63. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. *Science*, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
64. Khattri, R., et al., *An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(4): p. 337-42.
65. Yagi, H., et al., *Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells*. *Int Immunol*, 2004. **16**(11): p. 1643-56.
66. Fantini, M.C., et al., *Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7*. *J Immunol*, 2004. **172**(9): p. 5149-53.
67. Fu, S., et al., *TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors*. *Am J Transplant*, 2004. **4**(10): p. 1614-27.
68. Buckner, J.H. and S.F. Ziegler, *Regulating the immune system: the induction of regulatory T cells in the periphery*. *Arthritis Res Ther*, 2004. **6**(5): p. 215-22.
69. Levings, M.K. and M.G. Roncarolo, *T-regulatory 1 cells: a novel subset of CD4 T cells with immunoregulatory properties*. *J Allergy Clin Immunol*, 2000. **106**(1 Pt 2): p. S109-12.
70. Weiner, H.L., *Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells*. *Immunol Rev*, 2001. **182**: p. 207-14.
71. Damoiseaux, J., *Regulatory T cells: back to the future*. *Neth J Med*, 2006. **64**(1): p. 4-9.
72. Wahl, S.M., J. Wen, and N. Moutsopoulos, *TGF-beta: a mobile purveyor of immune privilege*. *Immunol Rev*, 2006. **213**: p. 213-27.
73. Becker, C., M.C. Fantini, and M.F. Neurath, *TGF-beta as a T cell regulator in colitis and colon cancer*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006. **17**(1-2): p. 97-106.
74. Bian, X.W., et al., *Angiogenesis as an immunopharmacologic target in inflammation and cancer*. *Int Immunopharmacol*, 2004. **4**(12): p. 1537-47.
75. 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.
76. Folkman, J., *What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?* *J Natl Cancer Inst*, 1990. **82**(1): p. 4-6.
77. Takebayashi, Y., et al., *Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma*. *Cancer*, 1996. **78**(2): p. 226-31.
78. Ellis, L.M., *Angiogenesis and its role in colorectal tumor and metastasis formation*. *Semin Oncol*, 2004. **31**(6 Suppl 17): p. 3-9.
79. Bruns, C.J., et al., *Vascular endothelial growth factor is an in vivo survival factor for tumor endothelium in a murine model of colorectal carcinoma liver metastases*. *Cancer*, 2000. **89**(3): p. 488-99.

80. Tanigawa, N., et al., *Tumor angiogenesis and mode of metastasis in patients with colorectal cancer*. *Cancer Res*, 1997. **57**(6): p. 1043-6.
81. Giatromanolaki, A., et al., *Combined role of tumor angiogenesis, bcl-2, and p53 expression in the prognosis of patients with colorectal carcinoma*. *Cancer*, 1999. **86**(8): p. 1421-30.
82. Hanrahan, V., et al., *The angiogenic switch for vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, VEGF-B, VEGF-C, and VEGF-D in the adenoma-carcinoma sequence during colorectal cancer progression*. *J Pathol*, 2003. **200**(2): p. 183-94.
83. Park, J.E., G.A. Keller, and N. Ferrara, *The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF*. *Mol Biol Cell*, 1993. **4**(12): p. 1317-26.
84. Hicklin, D.J. and L.M. Ellis, *Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(5): p. 1011-27.
85. Wong, M.P., et al., *Vascular endothelial growth factor is up-regulated in the early pre-malignant stage of colorectal tumour progression*. *Int J Cancer*, 1999. **81**(6): p. 845-50.
86. Kuramochi, H., et al., *Vascular endothelial growth factor messenger RNA expression level is preserved in liver metastases compared with corresponding primary colorectal cancer*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(1): p. 29-33.
87. Galizia, G., et al., *Determination of molecular marker expression can predict clinical outcome in colon carcinomas*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(10): p. 3490-9.
88. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(9): p. e45.
89. Andersen, C.L., J.L. Jensen, and T.F. Orntoft, *Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets*. *Cancer Res*, 2004. **64**(15): p. 5245-50.
90. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
91. Galizia, G., et al., *Prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in colon cancer patients undergoing curative surgery*. *Ann Surg Oncol*, 2006. **13**(6): p. 823-35.
92. Esfandi, F., S. Mohammadzadeh Ghobadloo, and G. Basati, *Interleukin-6 level in patients with colorectal cancer*. *Cancer Lett*, 2006. **244**(1): p. 76-8.
93. Chung, Y.C., Y.L. Chaen, and C.P. Hsu, *Clinical significance of tissue expression of interleukin-6 in colorectal carcinoma*. *Anticancer Res*, 2006. **26**(5B): p. 3905-11.
94. Zaloudik, J., et al., *Significance of pre-treatment immunological parameters in colorectal cancer patients with unresectable metastases to the liver*. *Hepatogastroenterology*, 1999. **46**(25): p. 220-7.
95. Ebert, E.C., R.E. Brolin, and A.I. Roberts, *Characterization of activated lymphocytes in colon cancer*. *Clin Immunol Immunopathol*, 1989. **50**(1 Pt 1): p. 72-81.
96. Mocellin, S., et al., *Use of quantitative real-time PCR to determine immune cell density and cytokine gene profile in the tumor microenvironment*. *J Immunol Methods*, 2003. **280**(1-2): p. 1-11.

97. Urbani, S., et al., *PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion*. J Virol, 2006. **80**(22): p. 11398-403.
98. Barber, D.L., et al., *Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection*. Nature, 2006. **439**(7077): p. 682-7.
99. Osada, T., H. Nagawa, and Y. Shibata, *Tumor-infiltrating effector cells of alpha-galactosylceramide-induced antitumor immunity in metastatic liver tumor*. J Immune Based Ther Vaccines, 2004. **2**(1): p. 7.
100. Alegre, M.L., et al., *Regulation of surface and intracellular expression of CTLA4 on mouse T cells*. J Immunol, 1996. **157**(11): p. 4762-70.
101. Perkins, D., et al., *Regulation of CTLA-4 expression during T cell activation*. J Immunol, 1996. **156**(11): p. 4154-9.
102. Klapper, J.A., et al., *High-dose interleukin-2 for the treatment of metastatic renal cell carcinoma : a retrospective analysis of response and survival in patients treated in the surgery branch at the National Cancer Institute between 1986 and 2006*. Cancer, 2008.
103. Verma, S., et al., *Biochemotherapy for the treatment of metastatic malignant melanoma: a clinical practice guideline*. Curr Oncol, 2008. **15**(2): p. 85-89.
104. Baluna, R. and E.S. Vitetta, *Vascular leak syndrome: a side effect of immunotherapy*. Immunopharmacology, 1997. **37**(2-3): p. 117-32.
105. Orucevic, A., S. Hearn, and P.K. Lala, *The role of active inducible nitric oxide synthase expression in the pathogenesis of capillary leak syndrome resulting from interleukin-2 therapy in mice*. Lab Invest, 1997. **76**(1): p. 53-65.
106. Den Otter, W., et al., *Local therapy of cancer with free IL-2*. Cancer Immunol Immunother, 2008.
107. Jacobs, J.J., D. Sparendam, and W. Den Otter, *Local interleukin 2 therapy is most effective against cancer when injected intratumorally*. Cancer Immunol Immunother, 2005. **54**(7): p. 647-54.
108. Brivio, F., et al., *[Clinical role of interleukin-2 in the surgical treatment of liver metastasis due to colon adenocarcinoma]*. Minerva Chir, 2004. **59**(6): p. 573-82.
109. Caporale, A., et al., *Locoregional IL-2 therapy in the treatment of colon cancer. Cell-induced lesions of a murine model*. Anticancer Res, 2007. **27**(2): p. 985-9.
110. Lissoni, P., et al., *Enhancement of the efficacy of chemotherapy with oxaliplatin plus 5-fluorouracil by pretreatment with IL-2 subcutaneous immunotherapy in metastatic colorectal cancer patients with lymphocytopenia prior to therapy*. In Vivo, 2005. **19**(6): p. 1077-80.
111. Teicher, B.A., *Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(21): p. 6247-51.
112. Nomi, T., et al., *Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(7): p. 2151-7.
113. Ohigashi, Y., et al., *Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(8): p. 2947-53.
114. Camacho, L.H., *Novel therapies targeting the immune system: CTLA4 blockade with tremelimumab (CP-675,206), a fully human monoclonal antibody*. Expert Opin Investig Drugs, 2008. **17**(3): p. 371-85.
115. Varey, A.H., et al., *VEGF 165 b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance*

- of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy.* Br J Cancer, 2008. **98**(8): p. 1366-79.
116. Belluco, C., et al., *Interleukin-6 blood level is associated with circulating carcinoembryonic antigen and prognosis in patients with colorectal cancer.* Ann Surg Oncol, 2000. **7**(2): p. 133-8.
117. Janeway, C., Travers, P., *Immunobiology*, Garland Science 6 th edition, 2005, p. 423-24

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Johanna Dorothea Strehl
Eltern: Georg Strehl und Sonia Gontijo-Strehl
Geburtsdatum: 22.08.1979
Geburtsort: Coburg
Anschrift: Spinnereistraße 28
91052 Erlangen
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulausbildung:

1986 - 1990: Grundschule Ebern
1991 - 1999: Friedrich-Rückert-Gymnasium Ebern
1995/1996: 1. Bundessieger Bundeswettbewerb Fremdsprachen,
Wettbewerbssprache Englisch
1997: 3. Bundessieger Bundeswettbewerb Fremdsprachen,
Wettbewerbssprachen: Englisch, Französisch, Portugie-
sisch
1999: Allgemeine Hochschulreife, Aufnahme in die Bayerische
Begabtenförderung

Studium der Biologie:

WS 1999 - WS 2000/01: Universität Ulm

Studium der Humanmedizin:

SS 2001 - WS 2007/08: Julius-Maximilians-Universität Würzburg
SS 2001 - WS 2002/03: Vorklinisches Studium
03/2003: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung,
Notendurchschnitt 1,0
SS 2003 - WS 2007/08: Klinisches Studium
11/2007: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung,
Notendurchschnitt 1,5

Berufliche Tätigkeit:

Seit 01/2008: Assistenzärztin am Institut für Pathologie, Universitätskli-
nikum Erlangen

Erlangen, den 19.05.2009

(Johanna Strehl)

Danksagung

Für die freundliche Überlassung des Themas sowie die umfassende Betreuung und Unterstützung möchte ich Frau Professor Waaga-Gasser sowie Herrn Priv.-Doz. Gasser meinen herzlichen Dank aussprechen. Des Weiteren danke ich Herrn Dr. med. Martin Grimm für die umfangreiche Hilfe im immunhistologischen Teil meiner Arbeit. Mein Dank gilt zudem Frau Dr. rer. nat. Nichiporuk, deren Diskussionsbereitschaft und konstruktive Kritik wesentlich zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Herzlich bedanken möchte ich mich außerdem bei Frau Sabine Müller für die Einarbeitung in die Techniken der RNA-Extraktion und Real-Time PCR.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich an dieser Stelle für die wunderbare Unterstützung während des ganzen Studiums danken.