

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt
Hämatologie, Onkologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

DISSERTATION

**In-situ-Analyse der Infiltration kolorektaler Karzinome durch
FOXP3⁺ regulatorische T-Zellen, CD3⁺ und CD8⁺ T-Zellen:
Zusammenhänge mit der TAA-spezifischen T-Zell-Antwort,
dem Stadium und dem Überleben**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Martin Schernus
aus Wolfenbüttel

Gutachter: 1. PD Dr. med. Dirk Nagorsen

2. Prof. Dr. med. M.F. Neurath

3. PD Dr. med. Ch. Scholz

Datum der Promotion: 18.11.2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	8
1.1 Immunüberwachung von Tumorwachstum	8
1.2 Tumorassoziierte Antigene	9
1.3 Tumorreaktive T-Zellen	12
1.3.1 Aktivierung tumorreaktiver T-Zellen	12
1.3.1.1 Aktivierung von CD8 ⁺ T-Zellen	12
1.3.1.2 Aktivierung von CD4 ⁺ T-Zellen	14
1.3.2 Tumorreaktive T-Zellen beim kolorektalen Karzinom	15
1.3.3 Nachweis antigenspezifischer T-Zellen	16
1.4 Aktuelle Therapiekonzepte des kolorektalen Karzinoms	17
1.5 Immuntherapie des kolorektalen Karzinoms	20
1.6 Regulatorische T-Zellen	22
1.6.1 Phänotypische Eigenschaften und Marker regulatorischer T-Zellen	22
1.6.2 Immunsuppressive Mechanismen regulatorischer T-Zellen..	23
1.6.3 Regulatorische T-Zellen bei nicht-malignen Erkrankungen des Kolon	25
1.6.4 Regulatorische T-Zellen bei malignen Erkrankungen	26
1.7 Zielsetzung und Durchführung der Arbeit	29
2 Material und Methoden	30
2.1 Patienten und Untersuchungsmaterialien	30
2.2 Immunhistochemische Doppelfärbung von FOXP3 und CD3 sowie Färbung von CD8	30
2.2.1 Prinzip der polymerbasierten Peroxidase-Methode	31
2.2.2 Prinzip der APAAP-Methode	33
2.2.3 Verwendete Materialien und Ansatz von Lösungen	34
2.2.4 Entparaffinierung und Vorbereitung der Färbung	35
2.2.5 Applikation der Antikörper gegen FOXP3	36

2.2.6	Entwicklung nach der polymerbasierten Peroxidase-Methode	36
2.2.7	Applikation der Antikörper gegen CD3 bzw. CD8	37
2.2.8	Entwicklung nach der APAAP-Methode	37
2.3	Auszählung der Zellen	38
2.4	Statistische Auswertung	38
2.4.1	Treg-Infiltration und systemische T-Zell-Antwort	38
2.4.2	T-Zell-Infiltration (Treg, CD3 ⁺ und CD8 ⁺) und Überleben	39
2.4.3	Stadienkorrektur	39
2.4.4	Zusammenhänge zwischen T-Zell-Infiltration, Stadium und Geschlecht	39
2.4.5	Korrelationen zwischen Treg-, CD3 ⁺ und CD8 ⁺ Infiltration sowie dem Alter	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Charakteristika der Kontrollgruppe	41
3.2	Charakteristika der KRK-Patienten	43
3.3	Treg-Infiltration im KRK und im gesunden Kolon	44
3.4	Treg-Infiltration und systemische T-Zell-Antwort beim KRK	48
3.5	Treg-Infiltration und Überleben beim KRK	49
3.6	Treg-Infiltration und KRK-Stadium	51
3.7	Treg-Infiltration und CD3 ⁺ sowie CD8 ⁺ T-Zell-Infiltration beim KRK	52
3.8	CD3 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zell-Infiltration im KRK und im gesunden Kolon	54
3.9	CD3 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zell-Infiltration und das Überleben beim KRK	59
3.10	CD3 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zell-Infiltration und KRK-Stadium	59
3.11	Treg/CD3 ⁺ und Treg/CD8 ⁺ Quotienten und das Überleben beim KRK	59

4	Diskussion	62
4.1	Infiltration des KRK durch regulatorische T-Zellen	62
4.1.1	Treg-Infiltration des gesunden Kolon, sowie des limitierten und metastasierten KRK	62
4.1.2	Treg-Infiltration und systemische T-Zell-Antwort beim KRK..	65
4.1.3	Treg-Infiltration und Überleben beim KRK	66
4.1.4	Zusammenhänge zwischen Treg und CD3 ⁺ sowie CD8 ⁺ Infiltration	67
4.2	CD3 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zell-Infiltration des KRK	68
4.2.1	CD3 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zell-Infiltration beim KRK und beim gesunden Kolon	68
4.2.2	CD3 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zell-Infiltration und das KRK-Stadium	70
4.2.3	CD3 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zell-Infiltration und das Überleben beim KRK	70
4.3	Schlussfolgerungen	72
5	Zusammenfassung	74
6	Literaturverzeichnis	76
7	Lebenslauf	100
8	Erklärung der Selbständigkeit	102
9	Danksagung	103

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil	Ep-CAM	Epithelial cell adhesion molecule
APAAP	Alcaline phosphatase anti-alcaline phosphatase	FAS	Apoptosis stimulating
APZ	Antigenpräsentierende Zelle	FOLFIRI	L-Folsäure, 5-Fluorouracil, Irinotecan
BAGE	B-Antigen	FOLFOX	L-Folsäure, 5-Fluorouracil, Oxaliplatin
BCG	Bacillus-Calmette-Guerin	FOLFOXIRI	L-Folsäure, 5-Fluorouracil, Oxaliplatin, Irinotecan
BOND	Bowel Oncology with Cetuximab Antibody	FOXP3	Forkhead box P3
CAMEL	CTL-recognized antigen on melanoma	GAGE	G-Antigen
CBR	Clinical Benefit Rate	GITR	Glucocorticoid-induced TNF-receptor related protein
CD	Cluster of differentiation	gp100	Glykoprotein 100
CDC27	Cell division cycle 27	GvHD	Graft versus host disease
CEA	Karzinoembryonales Antigen	HER-2/neu	Human epidermal receptor 2 / neurological
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	HHV	Humanes Herpesvirus
CMV	Zytomegalievirus	HIER	Heat-induced epitope retrieval
CRA	Chromium-release assay	HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt	HPF	High power field = 0,237mm ²
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte-associated antigen 4	HPV	Humanes Papillomavirus
DAB	Diaminobenzidin	HRP	Horseradish peroxidase
DNA	Desoxyribonukleinsäure	hTERT	Human telomerase reverse transcriptase
DZ	Dendritische Zelle	HTLV	Humanes T-Zell-lymphotropes Virus
EBV	Epstein-Barr-Virus		
EGFR	Epidermal growth factor receptor		
ELISPOT	Enzyme linked immuno spot		

i.d.	intradermal	S-DZ	Zytokin-Sekretionsassay®
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase		in der Durchflusszytometrie
IFN	Interferon	SEREX	Serological analysis of
IL	Interleukin		cDNA expression libraries
i.m.	intramuskulär	TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
IP-10	IFN-inducible protein-10	TAP	Transporter associated
i.v.	intravenös		with antigen presentation
IZ-DZ	intrazelluläre	TBS	Tris buffered saline
	Zytokinfärbung in der	TGFβ	Tumor growth factor β
	Durchflusszytometrie	TIL	Tumor-infiltrierende
KRK	Kolorektales Karzinom		Leukozyten
LAGE	L-Antigen	TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
MAGE	Melanoma Antigen	TPI	Trisosephosphate
M-CSF	Macrophage colony-		Isomerase
	stimulating factor	TRAIL	TNF-related apoptosis-
MHC	Major histocompatibility		inducing ligand
	complex	Treg	klassische regulatorische
MIG	monokine induced by IFN-γ		T-Zelle
mRNA	Messenger-	TZR	T-Zell-Rezeptor
	Ribonukleinsäure	UICC	Union internationale contre
NDV	New-Castle-Disease-Virus		le cancer
NK	Natürliche Killerzelle	VEGF	Vascular endothelial
NY-ESO-1	New York esophageous 1		growth factor
PCR	Polymerase chain reaction	WHO	World Health Organization
PSA	Prostata-spezifisches	z.B.	zum Beispiel
	Antigen		
PBMC	Peripheral blood		
	mononuclear cells		
s.c.	subcutan		

1 Einleitung

1.1 Immunüberwachung von Tumorwachstum

Das Immunsystem hat die Fähigkeit, Fremdartiges aufzuspüren und zu zerstören und dabei gleichzeitig Zellen, die als „Eigene“ erkannt werden, zu verschonen. Auch Tumorzellen können sich aufgrund ihrer Mutationen und daraus resultierenden, veränderten Genexpressionsmustern von normalen Zellen unterscheiden. Seit langem besteht daher die Frage, ob das Immunsystem nicht – neben der Bekämpfung von Infektionen – auch die Fähigkeit hat, Tumorzellen zu bekämpfen, obwohl diese Zellen trotz ihrer Andersartigkeit zu den eigenen Zellen gehören. Paul Ehrlich postulierte 1909, dass das Immunsystem normalerweise die Entwicklung von Tumoren unterdrückt (EHRlich 1909). Trotzdem waren die Versuche, Tumoren durch Immuntherapie zu bekämpfen weniger erfolgreich als es Ehrlichs Hypothese zunächst vermuten ließ. Richmond Prehn und Joan Main zeigten 1957, dass Tumoren in Mäusen – durch chemische Karzinogene induziert – tumorspezifische Immunantworten auslösen konnten, welche zur Abstoßung des betreffenden Tumors führten (PREHN 1957). Sie schlossen daraus, dass die Tumorummunität von einzigartigen Antigenen des chemisch induzierten Tumors stimuliert wurde. Gleichzeitig fanden sie heraus, dass spontan entstandene Tumoren im gleichen Experiment nicht abgestoßen wurden. 1974 berichtete Osias Stutman, dass athymische Mäuse, welche einem Karzinogen ausgesetzt wurden, keine erhöhte Tumorbildung aufwiesen (STUTMAN 1974). Aufgrund dieser und weiterer Studien wuchs die Überzeugung, zusammengefasst durch Harold Hewitt, dass natürlich auftretende Tumoren nicht immunogen sind (HEWITT 1976). Somit wurde das Konzept der Immunüberwachung von Tumoren zunächst weitgehend verworfen.

1982 jedoch machten Aline van Pel und Thierry Boon die Entdeckung, dass mit mutagenen Tumorzellen geimpfte Mäuse eine spezifische Immunität gegen spontan auftretende Tumoren entwickelten. Ihre Studie zeigte, dass spontan auftretende Tumoren durchaus Tumorantigene aufweisen, diese jedoch keine effektive Immunantwort auszulösen scheinen (VAN PEL 1982). Durch Impfung könnte dieses Versagen des Immunsystems überwunden werden, was auch seitdem in vielen klinischen Studien versucht wird.

Später entdeckte van der Bruggen et al. erstmalig ein tumorspezifisches Antigen, welches von zytotoxischen, menschlichen T-Zellen erkannt wird (VAN DER BRUGGEN 1991). Dies unterstützte die Hypothese, dass Tumorantigene eine messbare, tumorspezifische Antwort auslösen können. Ob diese Antwort so beeinflusst werden kann, dass sie zur Abstoßung des Tumors führt, bleibt noch ungeklärt. Robert Schreiber et al. fachten das Interesse an der Immunüberwachung erneut an, als sie 2001 zeigten, dass immundefiziente Mäuse eine erhöhte Empfänglichkeit sowohl für chemisch induzierte, als auch für spontan entstehende Tumoren aufweisen (SHANKARAN 2001). Damit war das Konzept der Immunüberwachung von Tumoren erneut unterstützt worden.

Aufgrund der Erkennung durch das Immunsystem sind die Krebszellen allerdings einem erhöhten Selektionsdruck ausgesetzt. Dies führt zu einer Verminderung der Immunogenität und damit zu einem eventuellen Entrinnen des Tumors aus der immunvermittelten Zerstörung. Thomas Blankenstein und seine Kollegen wiesen darauf hin, dass sporadische Tumoren in Mäusen möglicherweise nicht in erster Linie ihre Immunogenität verlieren, sondern vielmehr Toleranz induzieren, um die Immunüberwachung zu umgehen (WILLIMSKY 2005). Welche der aus Tiermodellen gewonnenen Erkenntnisse auch auf das Tumorstadium im Menschen zutreffen, bedarf weiterer Klärung.

1.2 Tumorassoziierte Antigene

Die Identifizierung des ersten humanen von CD8⁺ T-Zellen erkannten tumorassoziierten Antigens (TAA) MAGE-1 gelang van der Bruggen und stellte einen entscheidenden Fortschritt für das Verständnis der Tumorummunologie dar (VAN DER BRUGGEN 1991). Van der Bruggen benutzte hierbei das sogenannte „T lymphocyte epitope cloning“, auch „autologous typing“ genannt, bei dem T-Zellen unter Stimulation durch autologe Tumorzellen geklont werden. Die meisten Tumorantigene wurden bis heute mit Hilfe dieses Verfahrens charakterisiert. Es konnten hiermit jedoch nur TAA charakterisiert werden, gegen die bereits eine T-Zell-Antwort vorlag.

Inzwischen wurden weitere, alternative Strategien zur Entdeckung von TAA entwickelt, wie z.B. die SEREX-Technik (serological analysis of cDNA expression libraries) (SAHIN 1997) oder die „reverse Immunologie“ (BOON 1996).

Bei der Klassifizierung der TAA gibt es verschiedene Varianten, die sich geringfügig voneinander unterscheiden. Dies erklärt sich zum Teil dadurch, dass einige Antigene die Kriterien verschiedener Klassen erfüllen und somit nicht immer eindeutig zuzuordnen sind. Eine mögliche Klassifizierung soll im Folgenden dargestellt werden, bei der eine Einteilung der TAA in die folgenden 5 Gruppen erfolgt: Cancer/Testis-Antigene, Differenzierungsantigene, Überexpressionsantigene, tumorspezifische Antigene und virale Antigene (NOVELLINO 2005).

Die erste Gruppe der TAA wird Cancer/Testis-Antigene genannt, da diese antigenen Proteine in normalem, adultem Gewebe lediglich im Hoden und in der Plazenta exprimiert werden. Darüber hinaus sind die für diese Proteine kodierenden Gene jedoch auch bei verschiedenen Tumor-Entitäten aktiviert (BOON 1996+1997). Beispiele für diese Gruppe sind MAGE, GAGE, BAGE, sowie NY-ESO-1, LAGE und CAMEL (BOON 1996, VAN DEN EYNDE 1995, BOËL 1995, JÄGER 1998, LETHÉ 1998, AARNOUDSE 1999).

Die Differenzierungsantigene bilden die zweite Gruppe der TAA. Sie sind spezifisch für bestimmte Gewebe, werden aber nach der Entartung weiterhin in den Tumorzellen synthetisiert (ANICHINI 1993, COULIE 1994). Zu ihnen zählen unter anderem Ep-CAM („epithelial cell adhesion molecule“) auf epithelialen Tumoren, sowie CEA (karzinoembryonales Antigen), PSA (prostataspezifisches Antigen) und Tyrosinase (LITVINOV 1994+1997, TSANG 1995, CORMAN 1998, WÖLFEL 1994).

Als dritte Gruppe sind die Überexpressions-Antigene zu nennen. Es handelt sich um Epitope von Proteinen, welche auch in gesundem Gewebe vorhanden sind, deren Gene jedoch im Tumorgewebe massiv überexprimiert werden. Hierzu zählen z.B. hTERT, p53 und HER-2/neu, das bei Adenokarzinomen, wie dem kolorektalen Karzinom (KRK), dem Mammakarzinom, dem Bronchialkarzinom, dem Pankreaskarzinom oder dem Ovarialkarzinom, vermehrt auftritt (VONDERHEIDE 1999, UMANO 2001, FISK 1995).

Die vierte Gruppe sind die tumorspezifischen Antigene, welche auch als Mutationsantigene bezeichnet werden. Diese antigenen Epitope entstehen durch Punktmutationen in den Genen ubiquitär vorkommender Proteine und werden niemals von normalen Geweben exprimiert (NOVELLINO 2005). Innerhalb dieser Gruppe unterscheidet man „unique tumorspecific antigens“, welche für den entsprechenden Tumor spezifisch sind, und „shared tumorspecific antigens“, die bei mehreren Tumorentitäten vorkommen (WANG 1999).

Die viralen Antigene sind die fünfte Gruppe der TAA. Bestimmte Viren können zu einer malignen Transformation der infizierten Zellen führen. Diese Zellen exprimieren anschließend virale Antigene (COULIE 1999). Beispiele für diese Art von TAA sind Infektionen mit HPV16 und 18 beim Zervixkarzinom (RUDOLF 2001), HHV-8 beim Karposi-Sarkom (WILKINSON 2002), HTLV-1 bei Leukämien und Lymphomen (BIEGANOWSKA 1999) oder EBV beim Burkitt-Lymphom (KHANNA 2000). Gegen die TAA dieser Viren konnten bereits CD8⁺ T-Zell-Antworten nachgewiesen werden (RUDOLF 2001, WILKINSON 2002, BIEGANOWSKA 1999, KHANNA 2000).

Tabelle 1.1 Übersicht über die 5 Hauptgruppen humaner TAA

Cancer/Testis-AG	Differenzierungs-AG	Überexpressions-AG	tumorspezifische AG		virale AG
			unique	shared	
BAGE	CEA	Adipophilin	α-Actinin-4	BING-4	HPV
CAMEL	Ep-CAM	AIM-2	β- Catenin	K-RAS	EBV
CT9, CT10	Gp100	AFP	Caspase-8	N-RAS	HHV-8
GAGE	Mammaglobin-A	Annexin II	CDC27	OGT	HTLV-1
HAGE	Melan-A/MART-1	ART-4	CDK4	TGFαRII	
LAGE-1	MC1R	CLCA2	ELF2	TGFβRII	
MAGE	OA1	Cyp-B	FN	TRP-2/INT2	
NA88-A	P Polypeptide	HER-2/neu	HSP70-2 M	TRP-2-6b	
NY-ESO-1	PSA	HST-2 (FGF-6)	KIA A0205		
SAGE	TRP-1, TRP-2	hTERT	Malic enzyme		
SSX-2	Tyrosinase	iCE	MART-2		
TRAG-3		Livin (ML-IAP)	MUM-1		
		M-CSF	MUM-2		
		MUC1, MUC2	MUM-3		
		PRAME	Myosin		
		PSMA	Neo-PAP		
		P15, P53	PTPRK		
		RAGE	OS-9		
		RU1, RU2	TPI		
		SART			
		SOX10			
		Survivin			
		TRG, WT1			

1.3 Tumorreaktive T-Zellen

1.3.1 Aktivierung tumorreaktiver T-Zellen

Ähnlich wie bakterielle oder virale Antigene müssen TAA durch das Immunsystem zunächst erkannt werden, damit eine Immunantwort gegen maligne transformierte Zellen erfolgen kann. Bei diesem Prozess nehmen T-Lymphozyten eine zentrale Rolle ein. Die Aktivierung von T-Lymphozyten resultiert sowohl bei $CD8^+$ als auch bei $CD4^+$ T-Zellen aus einer Interaktion zwischen ihrem T-Zell-Rezeptor (TZR) und einem HLA (Humanes Leukozyten-Antigen)-Peptid-Komplex auf der Zielzelle. $CD8^+$ T-Zellen binden dabei mit ihrem TZR an HLA-Klasse-I-Komplexe, die sich auf jeder kernhaltigen Zelle befinden. $CD4^+$ T-Zellen hingegen binden mit ihrem TZR an HLA-Klasse-II-Komplexe, welche lediglich von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) exprimiert werden. Auch wenn diese beiden Aktivierungswege sich teilweise gleichen, gibt es einige Unterschiede sowohl im Detail der Aktivierungskaskade, als auch in den sich anschließenden Effektorfunktionen. Daher werden beide Wege im Folgenden einzeln beschrieben.

1.3.1.1 Aktivierung von $CD8^+$ T-Zellen

Alle im Zytoplasma einer Zelle vorkommenden Proteine werden zu einem geringen Teil durch Proteasomen in 8 - 12 Aminosäuren lange Peptidfragmente zerlegt. Diese Fragmente werden anschließend durch Transportmoleküle (TAP: „transporter associated with antigen presentation“) in das endoplasmatische Retikulum geschleust und dort von spezifischen HLA-Klasse-I-Komplexen gebunden. Dieser HLA-I-Peptidkomplex wird nun über das Golgi-System an die Zelloberfläche transportiert und das prozessierte Antigen dort präsentiert (OHNMACHT 2000). Auf diese Weise präsentiert jede Körperzelle ihrer Umgebung einen Satz von Peptidfragmenten, durch den sie als „selbst“ erkennbar ist. Viral infizierte oder maligne transformierte Zellen können so durch $CD8^+$ T-Zellen identifiziert werden. Es wurde inzwischen ebenfalls ein exogener Weg entdeckt, durch welchen auch Antigene, die nicht ins Zytoplasma gelangen, durch dendritische Zellen (DZ) auf HLA-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden (ALBERT 1998, TABI 2001). Die antigenspezifische Interaktion zwischen dem

TZR der CD8⁺ T-Zelle und dem HLA-I-Antigen-Komplex ist das erste Signal, welches zur Aktivierung von T-Zellen generiert werden muss. Das zweite Signal wird durch B7-Moleküle wie CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) vermittelt, welche sich auf APZ und zum Teil auch auf Tumorzellen befinden. Der entsprechende Ligand auf der CD8⁺ T-Zelle ist CD28. Um die klonale Expansion und die Effektorfunktionen auszulösen ist als drittes kostimulatorisches Signal die Anwesenheit bestimmter inflammatorischer Zytokine wie IL-2, IL-7 oder IL-12 erforderlich. Ohne die kostimulatorischen Signale verbleibt die T-Zelle meist trotz Antigen-Erkennung im Zustand der Anergie (DUNNION 1999).

Durch die Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen wird die klonale Expansion eingeleitet und die Effektorfunktionen werden ausgelöst. Nach einer Reorganisation des T-zellulären Zytoskeletts mit resultierender Verstärkung der Zellbindung, spielen sich alle Effektorfunktionen an den kontaktierenden Membranen der beiden Zellen ab. Somit konzentriert sich die Zytotoxizität auf die Zielzelle bei gleichzeitiger Schonung benachbarter Zellen. Hinsichtlich der Zytolyse können zwei Mechanismen unterschieden werden, die beide in der Apoptose der Zielzelle enden (GRAUBERT 1996):

Einerseits kann dies durch Freisetzung zytolytischer Granula der CD8⁺ T-Zellen erfolgen. Dabei bewirkt Perforin eine Porenbildung in der Membran der Zielzelle. Anschließend können Granzyme eindringen und durch Aktivierung von Kaspasen die Apoptose einleiten (TRAPANI 1999, SMYTH 1995).

Andererseits kann die Apoptose der Zielzelle auch durch Liganden-Rezeptor-Wege wie die Interaktion von FAS und FAS-Ligand, sowie über TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) (THOMAS 1998, STRASSER 2000) induziert werden.

Neben der Fähigkeit der Zytolyseeinleitung setzen zytotoxische CD8⁺ T-Zellen nach ihrer Aktivierung auch Zytokine wie z.B. IFN γ , IL-2, TNF α frei. Es gibt verschiedene Subpopulationen von zytotoxischen T-Zellen, die jeweils ein spezifisches Zytokinrepertoire besitzen. Insbesondere die Freisetzung von IFN γ durch Tc1-Zellen hat bei der Zerstörung von Tumorzellen und bei der Anlage von Gedächtniszellen eine große Bedeutung. Durch IFN γ wird die Präsentation der viralen oder Tumor-Antigene durch eine gesteigerte Dichte der MHC-Komplexe auf der Zelloberfläche verstärkt

(SELIGER 1997, AROSARENA 1999). Auch die Funktion der Proteasomen wird verbessert (SIJTS 2001). Bei Monozyten fördert $\text{IFN}\gamma$ die Differenzierung zu Makrophagen und stimuliert die Entwicklung zu professionellen APZ. Zudem führt $\text{IFN}\gamma$ bei CD8^+ T-Zellen und natürlichen Killerzellen zu erhöhter Aktivität. Außerdem können durch $\text{IFN}\gamma$ die Zielzellen in die G1-Phase des Zellzyklus überführt oder deren Apoptose eingeleitet werden (TRUBIANI 1994, BROMBERG 1996, KAPLAN 1998, FARRAR 1999). Auch indirekt über nicht-immunologische Wege hemmt $\text{IFN}\gamma$ das Wachstum maligner Zellen durch Induktion der Angiogenese-Inhibitionsfaktoren IP-10 (IFN-inducible protein-10) und MIG (monokine induced by IFN- γ). Sie bewirken eine Mangelversorgung des Tumors durch die verringerte Vaskularisierung und wirken zudem chemotaktisch auf CD8^+ T-Zellen (SUN 2001, DOBRZANSKI 2000). Viele der aktivierten CD8^+ T-Zellen werden nach Auslösung der Effektorfunktionen apoptotisch, was auch als „aktivierungs-induzierter Zelltod“ bezeichnet wird (MAHER 2002). Einige differenzieren wahrscheinlich auch zu Gedächtnis-T-Zellen und ermöglichen bei erneutem Antigenkontakt eine schnellere Immunreaktion (KAECH 2002, DOBRZANSKI 2000).

1.3.1.2 Aktivierung von CD4^+ T-Zellen

Ein etwas anderer Mechanismus liegt der Aktivierung von CD4^+ T-Zellen zugrunde. Durch APZ wie DZ, Makrophagen oder B-Zellen werden Antigene endozytotisch aufgenommen und in sauren Endosomen durch lysosomale Proteasen zu Peptiden (10-30 Aminosäuren) fragmentiert. Einige der Peptidepitope von Tumorantigenen wie z.B. Tyrosinase, gp100, MAGE-3, TPI, LDFP und CDC27 konnten bereits charakterisiert werden (WANG 1999). Die endosomalen Vesikel fusionieren anschließend mit Vesikeln aus dem endoplasmatischen Retikulum, welche membrangebundene HLA-Klasse-II-Moleküle enthalten. Der HLA-Klasse-II-Peptidkomplex wird wiederum an die Zelloberfläche transportiert und dort präsentiert. CD4^+ T-Zellen binden mit ihrem TZR an den Komplex aus HLA-Klasse-II-Molekül und prozessiertem Antigen. Dieses erste Signal, als auch die kostimulatorischen Signale durch B7-Moleküle und die Anwesenheit bestimmter Zytokine hat die CD4^+ T-Zellaktivierung mit der oben beschriebenen CD8^+ T-Zellaktivierung gemeinsam.

Das Spektrum der Effektorfunktionen aktivierter CD4⁺ T-Zellen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine wichtige Funktion liegt wahrscheinlich darin, dass die aktivierten T-Helferzellen nach der Erkennung eines Antigens auf einer DZ ihrerseits wiederum die DZ aktivieren. Dieses Signal wird durch eine Interaktion zwischen CD40L auf der T-Helferzelle und CD40 auf der DZ übermittelt und befähigt die DZ nachfolgend zur direkten Stimulation von cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL). Entsprechend wird dieses Modell als „licensing concept“ bezeichnet (RIDGE 1998, BENNETT 1998, SCHOENBERGER 1998, LANZAVECCHIA 1998). Des Weiteren gibt es Hinweise auf zytolytische Eigenschaften bei CD4⁺ T-Zellen der Th1-Subpopulation (HAHN 1995, LEVITSKY 1994, OVERWIJK 1999, SOMASUNDARAM 2000).

1.3.2 Tumorreaktive T-Zellen beim kolorektalen Karzinom

Tumorreaktive T-Zellen konnten *in vitro* nach Expansion bereits in den 90er Jahren aus tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) und mononukleären Zellen des peripheren Blutes („peripheral blood mononuclear cells“, PBMC) von KRK-Patienten nachgewiesen werden (YOO 1990, HOM 1993, SCHILTZ 1997, TSANG 1997). Da die Zellen zuvor mit IL-2 stimuliert wurden und dies in quantitativen wie auch qualitativen Veränderungen resultiert, blieb jedoch unklar, ob die nachgewiesenen Zellen dem in-vivo-Zustand der Patienten entsprachen und ihr Vorhandensein mit dem Nachweis einer T-Zell-Antwort gleichgesetzt werden konnte. Erstmals gelang es Nagorsen et al. im unstimulierten, peripheren Blut von KRK-Patienten TAA-spezifische CD8⁺ T-Zellen nachzuweisen (NAGORSEN 2000 + 2003). Diese auf natürlichem Weg generierten T-Effektorzellen richteten sich gegen die TAA Ep-CAM, her-2/neu und CEA und waren überwiegend bei Patienten mit Lymphknoten- oder Fernmetastasen nachweisbar.

1.3.3 Nachweis antigenspezifischer T-Zellen

Da tumorreaktive T-Zellklone im peripheren Blut meist in einer Frequenz von weniger als $1/10^5$ vorliegen, werden sehr sensitive Nachweismethoden benötigt. Der Chromium-release-Assay (CRA) erfüllt dieses Kriterium zwar, ermöglicht den Nachweis von antigenspezifischen T-Zellen aber nur unter vorheriger „in vitro“-Stimulation durch Zugabe von IL-2 und wiederholter Restimulation mit dem Antigen. Dieses Vorgehen birgt somit die Gefahr von quantitativen, funktionellen und phänotypischen Veränderungen der T-Zellklone.

Inzwischen sind Methoden entwickelt worden, welche den direkten „ex vivo“-Nachweis antigenspezifischer T-Zellen auf Einzelzellniveau aus dem peripheren Blut ermöglichen. Hierzu zählen der Enzyme-linked-Immunospot-Assay (ELISPOT-Assay), der Zytokinnachweis per Durchflusszytometrie und Tetramerananalysen, welche in Übersichtsarbeiten von Keilholz et al. sowie Nagorsen et al. zum Monitoring von Immuntherapien empfohlen werden (KEILHOLZ 2002, NAGORSEN 2004).

Der ELISPOT-Assay erlaubt den Nachweis antigenspezifischer T-Zellen mit hoher Sensitivität auf Einzelniveau, indem die antigeninduzierte Sekretion von Zytokinen sichtbar gemacht wird (CZERKINSKY 1988). Für den $IFN\gamma$ -ELISPOT-Assay konnte eine hohe Reproduzierbarkeit beim Nachweis antigenspezifischer Zellen gezeigt werden (PASS 1998, SCHEIBENBOGEN 1997 a+b und 2000). Des Weiteren zeigten mehrere Studien, dass eine enge Korrelation zwischen der im ELISPOT-Assay ermittelten Anzahl $IFN\gamma$ -sezernierender T-Zellen und den Ergebnissen des CRA besteht (DI FABIO 1994, MIYAHIRA 1995, SCHEIBENBOGEN 1997a+b und 2000b, SCHMITTEL 2000).

Bei der Durchflusszytometrie werden antigenspezifische Lymphozyten durch Färbung intrazellulärer (IZ-DZ) (ANDERSSON 1988, JUNG 1993, PRUSSIN 1995) oder sezernierter, oberflächengebundener Zytokine (S-DZ) (BROSTERHUS 1999) nachgewiesen. Im Gegensatz zum ELISPOT-Assay können bei der Durchflusszytometrie die antigenspezifischen T-Zellen gleichzeitig hinsichtlich ihres Phänotyps oder funktionellen Subtyps charakterisiert werden (PRUSSIN 1997, KERN 1998).

Die Möglichkeiten der Durchflusszytometrie beim Nachweis antigenspezifischer T-Zellen werden durch den Einsatz von Tetrameren noch erweitert. Tetramere sind fluoreszierende MHC-Peptid-Komplexe, welche die direkte Färbung des TZR ermöglichen (ALTMAN 1996). Bei dieser Methode lassen sich auch funktionell anerge T-Zellen darstellen (LEE 1999) und durch gleichzeitige Färbung extrazellulärer Epitope einem Subtyp zuordnen (OGG 1998, CALLAN 1998).

Außerdem ist es möglich, mit Hilfe der real-time-PCR verschiedene Zytokine und Aktivierungsmarker mit hoher Sensitivität gleichzeitig aus einer Probe zu bestimmen, wobei die Methode allerdings keine Analysemöglichkeit auf Einzelzellniveau bietet.

1.4 Aktuelle Therapiekonzepte des kolorektalen Karzinoms

Das KRK ist in Deutschland sowohl bei den Neuerkrankungen als auch bei der Mortalität die zweithäufigste Tumorform. Die Heilungschancen durch Operation und Chemotherapie hängen dabei entscheidend vom Krankheitsstadium zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ab. Die Standardtherapie des KRK unter kurativer Zielsetzung besteht zurzeit aus der chirurgischen Resektion des Primärtumors im Gesunden, auch mit ausgedehnten multiviszeralen Eingriffen, und der Entfernung der proximalen Lymphknotenstationen der Mesenterialgefäße. Postoperativ erhalten Hochrisikopatienten eine adjuvante Chemo- oder Radiochemotherapie (TUMOR ZENTRUM BERLIN 2006).

Für Patienten mit einem kurativ resezierten Kolonkarzinom im UICC-Stadium I oder II ist eine adjuvante Therapie im Regelfall nicht indiziert (MOERTEL 1995, FIGUEREDO 1997, IMPACT-B2-STUDIE 1999, SCHRAG 2002). Patienten des UICC-Stadiums III mit R0 reseziertem Kolonkarzinom profitieren von einer adjuvanten Therapie (IMPACT-STUDIE 1995, FRANCINI 1994, SARGENT 2001).

Für das R0 resezierte Rektumkarzinom konnte diesbezüglich schon ab dem UICC-Stadium II ein Vorteil für die Patienten durch eine adjuvante Radiochemotherapie belegt werden (GASTROINTESTINAL TUMOR STUDY GROUP 1985 + 1992, KROOK 1991, TVEIT 1997, WOLMARK 2000, DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR VERDAUUNGS- UND STOFFWECHSELKRANKHEITEN 2004).

Die Effizienz der adjuvanten sowie der palliativen Chemotherapie beim fortgeschrittenen KRK konnte durch die Substanzen Irinotecan, einem Topoisomerase-I-Hemmer, und Oxaliplatin, einem neueren Platinderivat, welches Quervernetzungen zwischen DNA-Strängen bewirkt, in den letzten Jahren verbessert werden. Sie wurden 1999 (Oxaliplatin) und 2000 (Irinotecan) in Europa für die First-Line-Therapie des fortgeschrittenen KRK zugelassen. Außerdem wurden die oralen Fluoropyrimidine Capecitabine und Uracil-Tegafur entwickelt, welche möglicherweise in Zukunft die Infusion von 5-FU ersetzen könnten.

Die adjuvante Standardtherapie für das Kolonkarzinom stellt das FOLFOX-Regime, bestehend aus Oxaliplatin, Folinsäure und 5-Fluorouracil (5-FU), dar (DOUILLARD 2000, SALTZ 2000, ANDRÉ 2004). Allerdings ist es hinsichtlich der Neurotoxizität ein nebenwirkungsträchtiges Regime. Für das Rektumkarzinom wird der Stellenwert des FOLFOX-Regimes in der adjuvanten Chemotherapie gegenwärtig geprüft. Der Standard besteht hier derzeit aus der 5-tägigen Gabe von 5-FU mit einem Bolus von 500mg/m²/Tag alle vier Wochen für 4 Therapiezyklen (NIH CONSENSUS CONFERENCE 1990, TUMOR ZENTRUM BERLIN 2006).

In der palliativen Situation beim fortgeschrittenen KRK kann sowohl Oxaliplatin (FOLFOX-Regime) als auch Irinotecan (FOLFIRI-Regime) mit 5-FU und Folinsäure kombiniert werden. Beide Kombinationen haben gegenüber der alleinigen Applikation von 5-FU und Folinsäure signifikant bessere Ergebnisse in der Ansprechrate und dem progressfreien Überleben gezeigt (GIACCHETTI 2000, KÖHNE 2005). Beim direkten Vergleich der beiden Regime konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich des Ansprechens, dem progressfreien oder dem gesamten Überleben nachgewiesen werden, womit beide Kombinationen prinzipiell als gleichwertig anzusehen sind (COLUCCI 2005). Inzwischen gibt es auch Hinweise dafür, dass ein Wechsel von FOLFOX zu FOLFIRI, oder umgekehrt, zu einer weiteren Verlängerung des medianen Gesamtüberlebens auf über 20 Monate führt (TOURNIGAND 2004), wobei die Reihenfolge der Schemata keine Rolle spielt. Vor kurzem wurde in verschiedenen Phase-III-Studien untersucht, ob eine 4-fach-Kombination mit Oxaliplatin *und* Irinotecan (FOLFOXIRI) einen Vorteil gegenüber FOLFIRI zeigt. Die Ergebnisse hierzu sind allerdings nicht eindeutig: Souglakos et al. fanden keinen signifikanten Unterschied in der Ansprechrate, dem progressfreien als auch dem gesamten Überleben beim

Vergleich der beiden Regime, wobei FOLFOXIRI ein ungünstigeres Toxizitätsprofil aufwies (SOUGLAKOS 2006). Im Gegensatz dazu berichteten Falcone et al. über eine signifikante Verbesserung der Ansprechrate und dem progressfreien sowie dem gesamten Überleben im FOLFOXIRI-Arm einer anderen Studie (FALCONE 2007, MASI 2006). Inwieweit die 4-fach-Kombination FOLFOXIRI eine erhöhte Wirksamkeit hat als z.B. FOLFIRI, muss somit noch in größeren Studien gezeigt werden.

Ebenfalls erfolgversprechend sind sogenannte „targeted therapies“, also Therapieansätze, die gezielt mit tumorassoziierten Zielstrukturen interagieren. Zwei diesbezügliche monoklonale Antikörper sind für die Behandlung des KRK inzwischen zugelassen. Der eine ist Cetuximab, welcher an den „epidermal growth factor receptor“ (EGFR) bindet und dessen Aktivierung verhindert (LI 2005). Bei dem anderen handelt es sich um Bevacizumab, einem Antikörper gegen „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), der die Angiogenese hemmt (HICKLIN 2005). Zwar ist Cetuximab anscheinend keine Alternative zu Irinotecan (CUNNINGHAM 2004 / BOND-STUDIE), es ist aber nach Therapieversagen von Irinotecan als Second-Line-Therapie in Kombination mit Irinotecan zugelassen und kann zu einer besseren Ansprechrate beitragen (DÍAZ RUBIO 2005). Für Bevacizumab in Kombination mit einem FOLFIRI-Protokoll konnte eine Überlegenheit gegenüber der alleinigen Anwendung von FOLFIRI belegt werden (HURWITZ 2004, HOCHSTER 2006), was zur Zulassung von Bevacizumab in Kombination mit FOLFIRI als First-Line-Therapie führte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass momentan die optimale First-Line-Therapie des fortgeschrittenen KRK die Gabe von FOLFOX oder FOLFIRI, kombiniert mit einer biologischen Substanz wie Bevacizumab, darstellt. Welches der beiden Regime zum Einsatz kommt, sollte vor allem unter Berücksichtigung des jeweiligen Toxizitätsprofils und der individuellen Situation des Patienten entschieden werden. Als Second-Line-Therapie könnte dann das jeweils andere Regime und ein anderer Antikörper wie Cetuximab verabreicht werden (SAUNDERS 2006).

1.5 Immuntherapie des kolorektalen Karzinoms

Bei den Anti-Tumor-Immuntherapien gibt es zwei grundsätzlich unterschiedliche Ansätze: Die nicht-spezifischen und die antigen-spezifischen Immuntherapien (MOCELLIN 2002). Die nicht-spezifischen Immuntherapien umfassen z.B. exogene Immunstimulanzien, Zytokine, adoptiven Transfer von nichtspezifischen Effektorzellen oder die Hemmung negativ immunregulierender Signalwege. Die antigen-spezifischen Immuntherapien lassen sich in passive Strategien, wie z.B. monoklonale Antikörper (siehe auch Kapitel 1.4) sowie den adoptiven Transfer von spezifischen Effektorzellen, und aktive Strategien unterteilen (MOSOLITS 2005). Die aktive, antigen-spezifische Immuntherapie ist definiert als eine Behandlungsmethode, welche auf die in-vivo-Induktion einer tumorgerichteten Immunantwort abzielt. Hierunter fällt die Applikation von TAA-Peptiden (auch zusammen mit dendritischen Zellen), TAA-kodierenden Viren, TAA-nachahmenden idiotypischen Antikörpern oder autologen Tumorzellen (NAGORSEN & THIEL 2006).

Die Wirksamkeit nicht-spezifischer Immuntherapien konnte bereits bei der erfolgreichen klinischen Anwendung von Immunstimulationen wie Bacillus-Calmette-Guerin (BCG) oder systemischer Zytokintherapie mit IL-2, IFN α oder IFN γ gezeigt werden (AULITZKY 1989, KEILHOLZ 1997 + 2000, LEGHA 1986, WHITTINGTON 1993). Andere Zytokine wie IL-4, IL-12 oder M-CSF zeigten hingegen keine oder nur eine geringe Wirksamkeit als Therapeutika (ATKINS 1996, LOTZE 1994, REDMAN 1992). Bezüglich der Anti-Tumor-Immuntherapie haben Immunstimulantien auch eine Bedeutung bei der Verwendung als Adjuvantien für die aktive, antigenspezifische Immuntherapie, da sie die Effizienz der Vakzine verstärken. Mikroorganismen oder deren Produkte wie Lipopolysaccharide, das New-Castle-Disease-Virus (NDV) oder BCG aktivieren APZ, indem sie ein zelluläres „danger signal“ imitieren (SCHIMANSKI 2006). So gab es in zwei Studien deutliche Hinweise darauf, dass das Ausmaß einer durch NDV verstärkten und in diesen Studien objektivierbaren Immunantwort mit einem signifikant besseren Überleben korrelierte (LIEBRICH 1991, LIANG 2003). Auch BCG (HANNA 2001, HARRIS 2000, VERMORKEN 1999) sowie bakterielle DNA-Fragmente (KLINMAN 2003) werden weiterhin als Adjuvantien verwendet.

Was die passiven antigen-spezifischen Therapien betrifft, ist zunächst einmal der monoklonale Antikörper Edrecolomab (auch als 17-1A bekannt) zu erwähnen, welcher an das TAA Ep-CAM bindet. Der chimäre Antikörper wurde in der Klinik an Patienten mit KRK getestet und erhielt nach anfänglichen Erfolgen eine Zulassung für die adjuvante Behandlung des KRK (SALEH 1990, RIETHMÜLLER 1998). Weitere Studien zeigten jedoch, dass die Behandlung mit Edrecolomab sowohl das krankheitsfreie Überleben als auch das Gesamtüberleben nicht verbesserte, woraufhin die Zulassung wieder zurückgezogen wurde (PUNT 2002, COLACCHIO 2004, HARTUNG 2005).

Die schon beschriebenen monoklonalen Antikörper Cetuximab und Bevacizumab richten sich nicht gegen TAA, sondern gegen EGFR und VEGF, also das Wachstum des Tumors bzw. der Blutgefäße beeinflussende Strukturen. Die beiden Antikörper sind für die Therapie des KRK zugelassen und werden bereits in der Klinik eingesetzt (DÍAZ RUBIO 2005, HURWITZ 2004). Inzwischen gibt es neben Cetuximab einen weiteren monoklonalen Antikörper gegen EGFR mit dem Namen Panitumumab. Panitumumab ist im Gegensatz zu Cetuximab ein vollständig humaner Antikörper und erste klinische Versuche deuten auf eine vergleichbare Effektivität bei weniger allergisch bedingten Nebenwirkungen hin (SAADEH 2007).

Zu den aktiven antigen-spezifischen Therapien des KRK ist eine umfangreiche Metaanalyse erschienen (NAGORSEN & THIEL 2006), welche eine Gesamtansprechrate (komplettes und partielles Ansprechen) von 0,9% aller Patienten zum Ergebnis hat, wohingegen eine zelluläre Immunantwort in 44% und eine humorale Immunantwort in 59% der getesteten Patienten zu beobachten war. Um kleinere Vorteile für die Patienten nicht zu vernachlässigen, wurde auch die „Clinical Benefit Rate“ (CBR) erhoben, welche neben den objektiven WHO-Kriterien des kompletten oder partiellen Ansprechens auch die weicheren Kriterien eines Ansprechens wie „minor response“ oder „stable disease“ mit einbezieht. In der Metaanalyse gab es keine Hinweise darauf, dass die Art der Applikation (s.c., i.v., i.m. oder i.d.) einen wesentlichen Unterschied im Ansprechen bewirkt, eventuell aber die Art der Vakzine. So scheinen autologe Tumorzellen (CBR = 46%) bessere Ergebnisse zu erzielen als Vakzine mit DZ (17%), Peptiden (13%), idiotypischen Antikörpern (3%) oder Viren (3%).

1.6 Regulatorische T-Zellen

Das Immunsystem ist fähig, eine Immunantwort sowohl gegen eigene Antigene als auch gegen TAA zu generieren. Regulatorische T-Zellen beeinflussen dabei die Balance zwischen der Toleranz und der Aggression, die solchen Antigenen von Seiten des Immunsystems entgegengebracht wird. Ethan M. Shevach definiert regulatorische T-Zellen in funktioneller Hinsicht als einen Bestand von T-Zellen, welche eine Immunantwort verhindern, indem sie die Aktivität anderer Zelltypen beeinflussen (SHEVACH 2004). Schon vor über dreißig Jahren wurden regulatorische T-Zellen erstmalig beschrieben und in dieser Zeit zunächst als suppressive T-Zellen bezeichnet (GERSHON 1970 + 1971). Inzwischen hat man einige phänotypisch verschiedene Subpopulationen von regulatorischen T-Zellen ausmachen können. Eine dieser Subpopulation sind $CD4^+$ $CD25^+$ $FOXP3^+$ Lymphozyten, welche auch als die klassischen regulatorischen T-Zellen (Treg) angesehen werden und aus dem Thymus stammen. Unter den $CD4^+$ T-Zellen im peripheren Blut machen diese Treg wahrscheinlich einen Anteil von 5-10% aus (SHIMIZU 1999). Treg induzieren und erhalten die periphere Toleranz und scheinen z.B. im Darm eine Rolle bei der Reduktion von autoimmun-vermittelten Krankheiten wie Colitis Ulcerosa oder Graft-versus-Host-Disease (GvHD) zu spielen (MAUL 2005, RIEGER 2006). Allerdings gibt es immer mehr Belege dafür, dass die durch Treg vermittelte Immunsuppression auch einen wichtigen Mechanismus darstellt, durch den Tumoren die Immunüberwachung umgehen könnten (NOMURA 2005, DUNN 2004, SHEVACH 2002).

1.6.1 Phänotypische Eigenschaften und Marker regulatorischer T-Zellen

1995 wurde von Sakaguchi et al. CD25 als Oberflächenmarker für Treg vorgeschlagen. Es handelt sich um die α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors und wird von Treg aber auch von aktivierten Effektor-T-Zellen exprimiert (SAKAGUCHI 1995).

Neuere Studien haben gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor „forkhead box P3“ (FOXP3) einen äußerst spezifischen intrazellulären Marker darstellt. Er wird sowohl in Treg von Mäusen als auch in humanen $CD4^+$ $CD25^+$ Treg exprimiert. Geringe Mengen von FOXP3 können aber auch in $CD4^+$ $CD25^-$ T-Zellen mit regulatorischer Aktivität nachgewiesen werden (YI 2006). Es gibt Hinweise dafür, dass diese $FOXP3^+$ $CD25^-$

T-Zellen ein Reservoir regulatorischer T-Zellen darstellen, das bei Bedarf zum FOXP3⁺ CD25⁺ Pool rekrutiert werden kann (ZELENAY 2005). Darüber hinaus ist FOXP3 aber auch entscheidend an der Entwicklung (HORI 2003) und den Funktionen (FONTENOT 2003, KHATTRI 2003) von Treg beteiligt.

Ein weiteres Protein, welches auf der Oberfläche von Treg exprimiert wird, ist das „Glucocorticoid-induced TNF-receptor related protein“ (GITR; auch als DTA1 bekannt). GITR gehört zur TNF-Rezeptor-Superfamilie und wird hauptsächlich auf Treg exprimiert, ist allerdings auch in verschiedenem Ausmaß auf CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen und APZ zu finden (SHIMIZU 2002). Auch OX40 (CD134) und 4-1BB (CD137) sind Oberflächenmoleküle, welche auf Treg zu finden sind und zur TNFR-Superfamilie gehören (VALZASINA 2005, CHOI 2004).

Des Weiteren exprimieren Treg konstitutiv das „cytotoxic T-Lymphocyte-associated antigen 4“ (CTLA4) (READ 2000). CTLA4 hat eine ähnliche Struktur wie CD28, bindet die kostimulatorischen Moleküle der B7-Familie allerdings in wesentlich höherer Affinität. Im Rahmen der klassischen T-Zell-Aktivierung liefert CTLA4 bei CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen - im Gegensatz zu CD28 – ein negatives Signal, welches der Aktivierung der T-Zelle entgegenwirkt. Für CD4⁺ CD25⁺ Treg konnte im Gegensatz dazu allerdings gezeigt werden, dass die Interaktion von B7-Molekülen mit CTLA4 hier ein positives Signal liefert und zur Aktivierung der Treg beiträgt (NAKAMURA 2001).

1.6.2 Immunsuppressive Mechanismen regulatorischer T-Zellen

Viele suppressive Mechanismen, darunter auch Zell-Zell-Kontakt (NAKAMURA 2001) und lösliche Faktoren, wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in Mausmodellen untersucht und werden derzeit diskutiert (SHEVACH 2002, VON HERRATH 2003, WANG 2004). Es gibt Hinweise darauf, dass Treg durch IL-10 die APZ- und T-Zellfunktion unterdrücken können (HSIEH 2004, ZHOU 2004). Außerdem sind sie in der Lage, die Funktion von natürlichen Killerzellen (NK) in einer TGFβ-abhängigen Weise zu hemmen (GHIRINGHELLI 2005). Somit kann sowohl die adaptive als auch angeborene Immunität durch Treg beeinflusst werden. Unklar ist bezüglich IL-10 und

TGF β allerdings, ob Treg diese Substanzen nur selbst produzieren oder auch andere Zellen dazu befähigen, dies zu tun (KRYCZEK 2006 a + b).

Eine weitere immunsuppressive Wirkung von Treg könnte dadurch hervorgerufen werden, dass sie IL-2 kompetitiv binden (VON BOEHMER 2005, DE LA ROSA 2004). Die von Treg exprimierte Heterotrimer-Form des IL-2-Rezeptors, bestehend aus CD25 (α -Kette), CD122 (β -Kette) und CD132 (γ -Kette) hat eine hundertfach höhere Affinität für IL-2 als die Dimer-Form auf konventionellen T-Zellen (bestehend aus CD122 und CD132). Allerdings wird IL-2 hauptsächlich von konventionellen T-Zellen produziert, welche in etablierten Tumoren nur zu einem kleineren Anteil vorhanden sind (YU 2005, KO 2005, CURIEL 2004). Die Ausschüttung von IL-2 ist also limitiert, so dass der immunsuppressive Effekt durch die kompetitive Bindung von IL-2 in etablierten Tumoren eher niedrigeren Ausmaßes sein dürfte (ZOU 2006).

Auch durch Granzyme und Perforin könnten Treg ihre immunsuppressive Wirkung entfalten. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass aktivierte menschliche Treg Granzym A exprimieren und andere T-Zellen, sowie auch APZ durch Perforin eliminieren (GROSSMAN 2004). Eine andere Studie ergab Hinweise darauf, dass Treg ihre immunsuppressive Wirkung durch einen Granzym B-abhängigen und dabei Perforin-unabhängigen Mechanismus vermitteln (GONDEK 2005).

Möglicherweise vermitteln Treg ihre immunsuppressive Wirkung auch durch CTLA4. In einem Maus-Modell wurde festgestellt, dass Treg in einer CTLA4-abhängigen Weise in den Tryptophan-Katabolismus von dendritischen Zellen eingreifen (FALLARINO 2003). Man geht davon aus, dass hierbei über CTLA4 in spezifischen APZ das Enzym Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) induziert wird, welches die essentielle Aminosäure Tryptophan reduziert und auf diesem Weg die T-Zell-Aktivierung hemmt (MELLOR 2004). Inwiefern dieser Mechanismus genauso beim Menschen auftritt, ist bislang nicht vollständig geklärt.

Ebenfalls über die Beeinflussung von APZ funktioniert wahrscheinlich ein weiterer Mechanismus zur Hemmung einer Immunantwort. Treg induzieren die Expression von B7-H4 auf APZ (KRYCZEK 2006 b). B7-H4 (auch bekannt als B7x oder B7S1) gehört zur B7-Familie kostimulatorischer Moleküle und behindert das Entstehen einer T-Zell-

Antwort (SICA 2003, ZANG 2003, PRASAD 2003). Da tumorassoziierte Makrophagen - im Gegensatz zu normalen Makrophagen - B7-H4 exprimieren (KRYCZEK 2006 a), könnte dieser Mechanismus im Tumor von Bedeutung sein.

1.6.3 Regulatorische T-Zellen bei nicht-malignen Erkrankungen des Kolon

Der Dickdarm ist für die Untersuchung immunregulatorischer Funktionen von Treg von besonderem Interesse, da hier eine ständige Auseinandersetzung mit exogenen Antigenen erfolgt, ohne dass eine Überreaktion des Immunsystems erfolgen darf. Somit verbleiben Immunantworten dort normalerweise in einem Zustand der kontrollierten Entzündung. Dass Treg an der Erhaltung dieser Tolerogenität beteiligt sind, konnte bereits gezeigt werden (ZHANG 2001). Für ihre Beteiligung spricht des Weiteren, dass Treg der Lamina propria des Mäusekolons in vitro die Aktivierung von Th1-Zellen unterdrücken, welche enterobakteriellen Antigenen ausgesetzt wurden (GAD 2003).

Im Zusammenhang mit der weiteren Erforschung der Treg wird vor allem den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, bei denen man von einer autoimmunvermittelten Genese ausgeht, besondere Aufmerksamkeit gewidmet. In Tiermodellen für CED konnte an Mäusen demonstriert werden, dass die Gabe von CD4⁺ CD25⁺ Treg sowohl einer induzierten Kolitis vorbeugt (READ 2000), als auch zur ihrer Ausheilung führt (MOTTET 2003, MALOY 2005). Maul et al. konnten erstmalig zeigen, dass die Anzahl der Treg im peripheren Blut von CED-Patienten in den aktiven Phasen der Erkrankung vermindert ist – in den Remissionsphasen dagegen erhöht. Im Gegensatz dazu stellten sie eine starke Erhöhung der Treg im peripheren Blut von Patienten mit akuter Divertikulitis fest (MAUL 2005). Diese Verkleinerung des Pools an Treg im peripheren Blut bei aktiver CED wurde auch in einer anderen Studie bestätigt (TAKAHASHI 2006). Entzündete CED-Mukosa weist zwar eine moderate Erhöhung der Treg-Zahlen auf, welche aber signifikant geringer als bei akuter Divertikulitis ausfällt (MAUL 2005).

Interessanterweise konnte auch für GvHD-bedingte Läsionen des Darms gezeigt werden, dass sie mit einer insuffizienten Anzahl mukosaler Treg pro CD8⁺ T-Zelle einhergehen, wohingegen die Proben histologisch unauffälliger Mukosa

allotransplantierten Patienten einen erhöhten FOXP3⁺/CD8⁺Quotienten aufwiesen. Auch für die Mukosa von Patienten mit CMV-Kolitis wurde ein deutlich erhöhter FOXP3⁺/CD8⁺Quotient ermittelt (RIEGER 2006).

1.6.4 Regulatorische T-Zellen bei malignen Erkrankungen

Im peripheren Blut von Patienten mit verschiedensten malignen Erkrankungen wurde bereits ein erhöhter Anteil von Treg nachgewiesen. Wolf et al. berichteten über eine erhöhte Anzahl von Treg im peripheren Blut von Patienten mit epithelialen Tumoren (WOLF 2003). Bei Patienten mit gastrointestinalen Tumoren konnte ein erhöhter Anteil von Treg unter den Lymphozyten im peripheren Blut festgestellt werden (SASADA 2003). Auch für das hepatozelluläre Karzinom und das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom wurde eine erhöhte Anzahl von Treg im peripheren Blut gefunden (ORMANDY 2005, OKITA 2005). Kono et al. stellten einen erhöhten Prozentsatz von Treg unter den PBMC bei Patienten mit Magen- und Ösophaguskrebs fest. Außerdem verglichen sie im Rahmen der Studie Patienten bei limitierter Erkrankung mit Patienten bei fortgeschrittener Erkrankung und fanden bei letzteren einen höheren Anteil von Treg (KONO 2006) unter den PBMC.

Neben dem Kompartiment der PBMC ist inzwischen auch für einige Tumorentitäten das Kompartiment der TIL hinsichtlich der Treg untersucht worden. Ormandy et al. konnten neben der erhöhten Anzahl von Treg im peripheren Blut von Patienten mit hepatozellulärem Karzinom auch bei den TIL eine erhöhte Anzahl von Treg ausmachen (ORMANDY 2005). In einer anderen Studie wurden die TIL aus Magen- und Ösophagustumoren auf Treg untersucht, woraufhin sich eine erhöhte Treg-Zahl im Vergleich mit gesunder Mucosa zeigte. Außerdem konnte im Rahmen der Studie beim Vergleich der Patienten in frühen Stadien mit denen in fortgeschrittenen Stadien festgestellt werden, dass auch im Tumor selbst die Zahl der Treg bei fortgeschrittener Erkrankung höher ist (ICHIHARA 2003).

Viele Studien – basierend auf Tierversuchen mit Mäusen – haben gezeigt, dass eine Treg-Depletion die Anti-Tumor-Immunität verbessert (ONIZUKA 1999, SHIMIZU 1999, ZOU 2006). Ko et al. konnten zeigen, dass die Gabe eines agonistischen Antikörpers

gegen GITR eine effektive Tumor-spezifische Immunität vermittelt. Dabei stellten sie fest, dass die Tumoren der unbehandelten Kontrolltiere viel stärker durch FOXP3⁺ CD25⁺ CD4⁺ Treg infiltriert waren, was einen weiteren Hinweis auf die Behinderung einer effektiven Tumorimmunität durch Treg darstellt (KO 2005). Aus einer anderen Arbeit wird ersichtlich, dass Melanome nach einer Hemmung der Treg immunologisch abgestoßen werden können. Durch Depletion der Treg und Gabe von aktivierten CD8⁺ Effektorzellen konnte sogar noch eine stärkere Abstoßung hervorgerufen werden (TURK 2004). Ghiringhelli et al. zeigten an einem murinen Kolon-Karzinom-Modell, dass Treg die Anti-Tumor-Immunität unterdrücken und dieser Effekt durch eine Treg-Depletion mittels Cyclophosphamid vermieden werden kann (GHIRINGHELLI 2004). In einem Modell mit Melanom-tragenden Mäusen wurde ein reduzierter Effekt bei der adoptiven Gabe von TAA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen, wenn diese Zellen den Mäusen zusammen mit Treg gegeben wurden (ANTONY 2005). Interessanterweise erfordert auch die „in vitro“-Induktion von Tumor-Antigen-spezifischen (anti-NY-ESO-1) Th1-Zellen sowohl bei Spendermaterial von seronegativen Krebspatienten als auch gesunden Probanden eine Treg-Depletion (NISHIKAWA 2005). Dies passt zu den Ergebnissen von Rosenberg und Dudley und ihrer Folgerung, dass eine Treg-Depletion Voraussetzung für einen klinisch erfolgreichen, adoptiven T-Zell-Transfer sei (ROSENBERG 2004).

Es gibt somit viele Hinweise dafür, dass Treg die T-Zellaktivität hemmen. Ihre Rolle bei der Ausbildung einer Tumor-Antigen-spezifischen T-Zell-Antwort ist allerdings noch nicht im Detail untersucht worden. Für das KRK bleibt bislang auch ungeklärt, ob es einen Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Treg im Tumor und einer antigenspezifischen T-Zell-Antwort, dem klinischen Verlauf oder dem Überleben der Patienten gibt. Einige genauere Analysen zur Anwesenheit von Treg im Tumor gibt es für andere Tumoren als das KRK. Albers et al. verglichen bei Patienten mit Kopf- und Halstumoren den Anteil der Treg im Tumor an den TIL insgesamt mit dem Anteil, den sie an den autologen PBMC ausmachen. Sie stellten dabei fest, dass der Anteil im Tumor höher ist und sich somit die Treg bevorzugt im Tumor ansammeln (ALBERS 2005). An einem murinen Tiermodell konnte bezüglich des Fibrosarkoms gezeigt werden, dass sich Treg im Tumor ansammeln und dass ihre Depletion zu einem veränderten Zytokin-Milieu und zur Vernichtung der Tumoren führte (YU 2005). Viguer et al. untersuchten die Lymphknoten von Patienten mit metastasiertem Melanom auf

FOXP3⁺ Treg und berichteten diesbezüglich über einen erhöhten Anteil von Treg verglichen mit tumorfreien Lymphknoten und PBMC. Diese Treg hemmten *in vitro* die Proliferation und Zytokin-Produktion von CD8⁺ T-Zellen (VIGUIER 2004). Für das Ovarialkarzinom konnte gezeigt werden, dass Treg im Tumor die tumorspezifische Immunität unterdrücken und zu einem reduzierten Überleben führen. Des Weiteren wurden Hinweise darauf gefunden, dass die Tumorzellen über die Ausschüttung des Chemokins CCL22 zur gezielten Akkumulation der Treg im Tumor beitragen können (CURIEL 2004). In einer weiteren Studie zum Ovarialkarzinom zeigten Sato et al., dass nicht nur eine hohe Anzahl von intraepithelialen CD8⁺ TIL ein besseres Überleben vorhersagt, sondern dass auch ein hoher CD8⁺ / CD25⁺FOXP3⁺-Quotient mit einer günstigeren Prognose einhergeht (SATO 2005). Darüberhinaus wurde für Patienten mit Ovarialkarzinom festgestellt, dass eine starke Expression von FOXP3-mRNA eine schlechtere Prognose anzeigt (WOLF 2005). Zusammenfassend lässt sich für das Ovarialkarzinom sagen, dass die genannten Studien eine hohe Treg-Infiltration des Tumors mit einer schlechteren Prognose in Verbindung bringen.

Obgleich es bislang keine Untersuchungen zu intratumoralen Treg beim KRK gibt, so konnte jedoch eine erhöhte Anzahl von Treg in mesenterialen Lymphknoten von KRK-Patienten ausgemacht werden. Allerdings wurden als Kontrollen die mesenterialen Lymphknoten von CED-Patienten verwendet, so dass die Aussagekraft zurückhaltend zu beurteilen ist. In der gleichen Studie wurde beobachtet, dass nach einer *ex vivo* Treg-Depletion T-Zell-Antworten gegen das TAA 5T4 bei einigen KRK-Patienten festgestellt werden konnten, die zuvor nicht nachweisbar waren. Dies wurde als eine Maskierung der T-Zell-Antwort durch Treg interpretiert (CLARKE 2006).

1.7 Zielsetzung und Durchführung der Arbeit

Das Hauptziel dieser Arbeit war, die Infiltration regulatorischer T-Zellen im KRK zu analysieren und dahingehend zu untersuchen, ob Zusammenhänge mit der Ausbildung einer systemischen TAA-spezifischen T-Zell-Antwort, dem Krankheitsstadium und dem Überleben bestehen. Für das KRK gab es diesbezüglich bis zu diesem Zeitpunkt keine Erkenntnisse.

Als Untersuchungsmethode wurde die immunhistochemische Färbung des Transkriptionsfaktors FOXP3 in Gewebeschnitten mit anschließender mikroskopischer in-situ-Analyse gewählt. Der entscheidende Vorteil von FOXP3 liegt darin, dass er – im Vergleich zu anderen Markern – die höchste Spezifität für Treg aufweist. Andere Marker, die ebenfalls benutzt werden, um Treg zu untersuchen, wie z.B. CD25, CD62L, CD44, CD45, Moleküle der TNFR-Familie oder CTLA4, befinden sich auch in größerem Ausmaß auf Effektor- und Gedächtnis-Zellen oder werden auch von anderen Subpopulationen regulatorischer T-Zellen exprimiert. Sie sind somit nicht Treg-spezifisch. Der in dieser Arbeit verwendete in-situ-Ansatz eignete sich besonders gut, um die Zellzahlen in den Stromalen und epithelialen Anteilen des KRK separat mikroskopisch auswerten zu können.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, auch die Infiltration von CD3⁺ und CD8⁺ T-Zellen im KRK zu ermitteln und auf Korrelationen mit der Treg-Infiltration, dem Stadium und dem Überleben zu prüfen, sowie die Ergebnisse im Hinblick auf die bestehenden Daten zu diskutieren. Insbesondere die CD8⁺ T-Zell-Infiltration wurde in anderen Studien als prognostisch positiver Faktor beschrieben (ROPPONEN 1997, NAITO 1998, OBERG 2002, DIEDERICHSEN 2003, FUNADA 2003, CHIBA 2004).

2 Material und Methoden

2.1 Patienten und Untersuchungsmaterialien

Das Untersuchungsmaterial stammt von 40 Patienten, die in der Charité Campus Benjamin Franklin aufgrund eines KRK operiert wurden. Folgende Einschlusskriterien wurden bei der Auswahl der Patienten für die immunhistochemischen Untersuchungen berücksichtigt:

- Klinische Daten: Es wurden nur HLA-A2-positive Patienten eingeschlossen, deren Status hinsichtlich einer systemischen T-Zell-Antwort gegen die HLA-A*0201 präsentierten T-Zell-Epitope Ep-CAM, her-2/neu und CEA aus früheren Untersuchungen (NAGORSEN 2000, 2003, 2005) bekannt war. Wichtige weitere Daten wie UICC-Stadium, Lebensalter, Alter bei Erstdiagnose, Zeitpunkt der Blutabnahme mussten erhebbar sein.
- Probenzustand: Gut fixiertes Tumorgewebe musste in ausreichender Menge vorliegen.
- Normalgewebe: Nach Möglichkeit wurden Blöcke, in denen Normalgewebe und Tumorgewebe zum direkten Vergleich vorlagen, bevorzugt.

Zusätzlich wurden 12 Biopsien von gesunden Spendern untersucht, welche sich im Rahmen der KRK-Früherkennung koloskopieren ließen.

2.2 Immunhistochemische Doppelfärbung von FOXP3 und CD3 sowie Färbung von CD8

Die immunhistochemische Membranfärbung von CD8 wurde nach der APAAP-Methode („alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase method“) durchgeführt (CORDELL 1984). Für die immunhistochemische Doppelfärbung von CD3 und FOXP3 wurde zunächst die Färbung des FOXP3-Proteins nach der Peroxidase-Methode und anschließend die Membranfärbung von CD3 nach der APAAP-Methode durchgeführt. Da es sich um formalinfixiertes Blockmaterial handelte, musste vor der immunhistochemischen Färbung ein „heat-induced epitope retrieval“ (HIER) zur

Durchbrechung der Formalinfixierung und Freilegung der Epitope erfolgen (NORTON 1994). Traditionell wurden zuvor meist enzymatische Methoden zur Demaskierung von Antigenen in formalinfixierten, paraffineingebetteten Schnitten genutzt. Shi et al. konnten jedoch zeigen, dass die kurzzeitige Erhitzung der Schnitte in einem Mikrowellenofen bei einer Vielzahl von Antigenen zu einer effektiveren immunhistochemischen Färbung beiträgt (SHI 1991). Wahrscheinlich ist der dieser Methode zugrunde liegende Mechanismus die Spaltung von Proteinen (CATTORETTI 1993). Die Erhitzung in einem Schnellkochtopf basiert auf dem gleichen Prinzip und stellt eine Fortentwicklung dieser Methode dar, wodurch unter anderem eine höhere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei größeren Mengen von Objektträgern gewährleistet wird (NORTON 1994).

2.2.1 Prinzip der polymerbasierten Peroxidase-Methode

Bei dem hier verwendeten System „Envision Peroxidase Kit /DAB+“ von der Firma Dako handelt es sich um eine polymerbasierte immunhistochemische Färbemethode, welche zu den Zwei-Schritt-Methoden zählt, da hierbei zwei antikörperhaltige Lösungen nacheinander zum Einsatz kommen. In einem ersten Schritt wird der sich gegen das nachzuweisende Epitop gerichtete Primärantikörper appliziert. Im Rahmen dieser Arbeit handelte es sich um einen Antikörper gegen das Protein FOXP3. Anschließend wird eine zweite antikörperhaltige Lösung hinzugesetzt, deren Antikörper sich gegen den Primärantikörper richten. Bis zu 20 dieser sekundären Antikörper sind bei der polymerbasierten Peroxidase-Methode an einen „Dextran-Backbone“ gebunden, welcher gleichzeitig etwa 100 Moleküle der Meerrettichperoxidase (Englisch: horseradish peroxidase, HRP) gebunden hat. Unter Zugabe von Wasserstoffperoxid – dem Substrat der HRP – wird das ebenfalls zugesetzte Chromogen Diaminobenzidin (DAB) oxidiert und es entsteht ein brauner Niederschlag. Eine schematische Darstellung des grundsätzlichen Prinzips ist in Abbildung 2.1 A zu sehen.

Da der in der vorliegenden Arbeit verwendete Antikörper gegen FOXP3 von der Ratte stammt, es sich jedoch bei dem an das Polymer gebundenen Antikörper um einen Ziegen-anti-Kaninchen/Maus-Antikörper handelt, wurde als Bindeglied zusätzlich ein

Kaninchen-anti-Ratte-Antikörper verwendet. Die tatsächlichen Bindungsverhältnisse sind daher noch einmal in der Abbildung 2.1 B schematisch wiedergegeben.

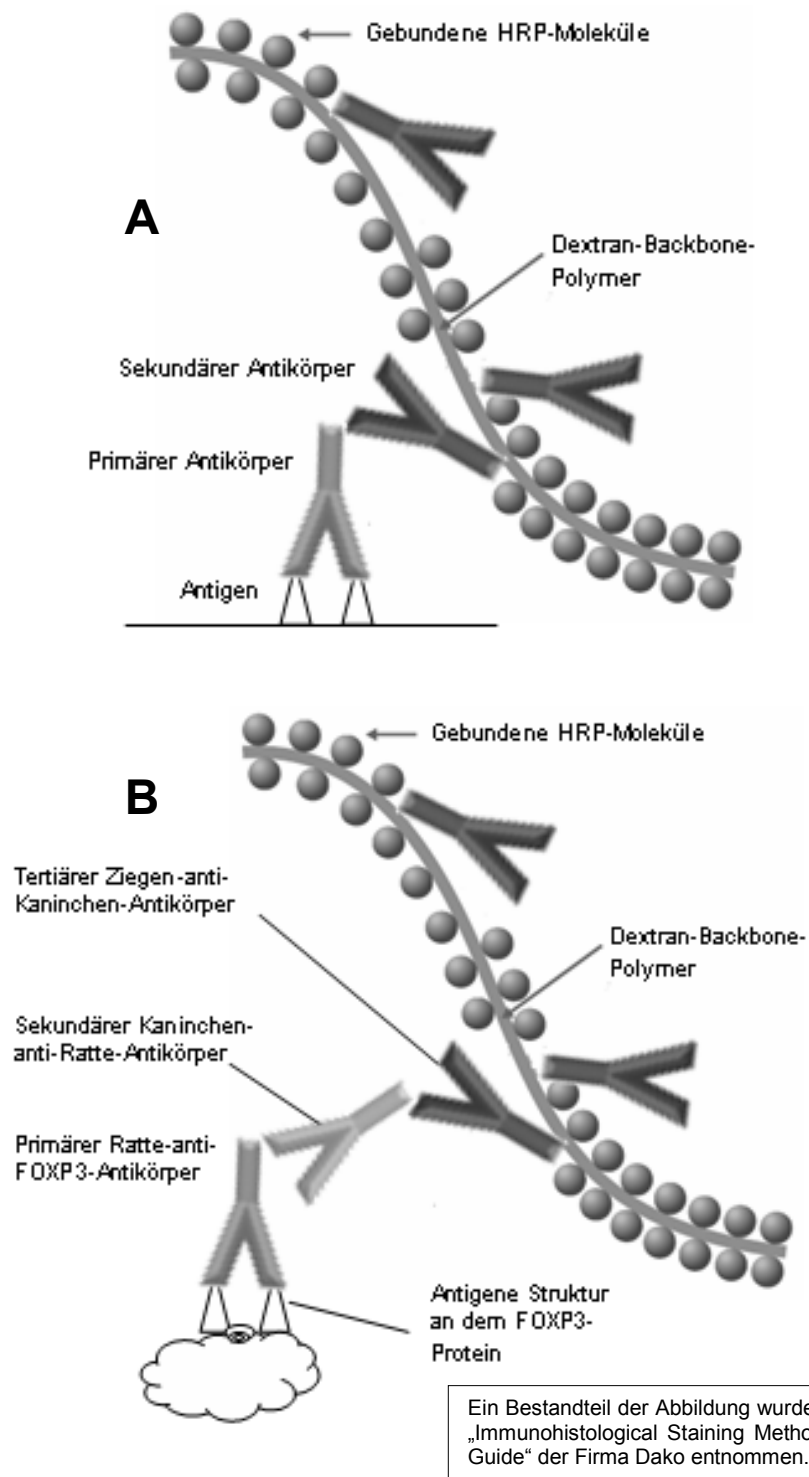


Abb. 2.1 Schematische Darstellung der polymerbasierten Peroxidase-Methode

A Prinzipielles Schema der Methode

B Bindungsschema entsprechend der vorliegenden Arbeit

2.2.2 Prinzip der APAAP-Methode

Durch die APAAP-Methode lässt sich die Bindung eines Primärantikörpers indirekt nachweisen. Benötigt werden für diese immunhistochemische Färbereaktion drei Antikörperlösungen:

1. Ein primärer Antikörper, welcher sich gegen das nachzuweisende Epitop richtet – im Rahmen dieser Arbeit also entweder ein Maus-anti-CD3- oder ein Maus-anti-CD8-Antikörper.
2. Ein sekundärer Antikörper, auch Brückenantikörper genannt, der sowohl den primären Antikörper als auch den noch folgenden tertiären Antikörper bindet. Er muss folglich gegen Immunglobuline der Spezies gerichtet sein, aus der der Primärantikörper und die im APAAP-Komplex befindlichen Antikörper stammen – bei dem hier verwendeten System ein Kaninchen-anti-Maus-Antikörper.
3. Ein tertiärer Antikörper, welcher die alkalische Phosphatase bindet – beide Bestandteile sind als APAAP-Komplex in einem Reagenz kombiniert.

Wird nach der Bindung des tertiären Antikörpers Naphtol-As-Mx-Phosphat hinzugesetzt, das Substrat der alkalischen Phosphatase, so ergibt sich ein Spaltprodukt, welches mit „Fast Red“ einen roten Farbniederschlag ausbildet. Das Prinzip der APAAP-Methode ist in der Abbildung 2.2 schematisch dargestellt.

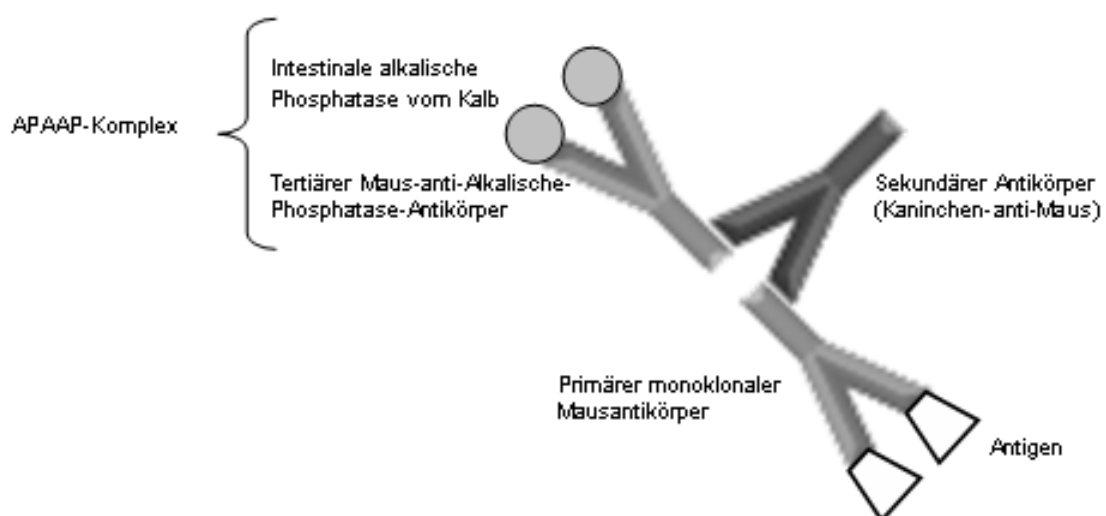


Abb. 2.2 Schema der immunhistochemischen Färbung mit monoklonalen Antikörpern nach der APAAP-Methode

2.2.3 Verwendete Materialien und Ansatz von Lösungen

Primärantikörper

Antikörper Anti-	Herkunft, Klonalität	Klon- Bezeichnung	Spezies- Reaktivität	Verdünnung	Hersteller, Sitz
CD8	Maus, mk	C8/144B	Mensch	1:100	Dako, Glostrup, Dänemark
FOXP3	Ratte, mk	PCH101	Mensch	1:500	eBioscience, San Diego, USA
CD3	Maus, mk	UCHT1	Mensch	1:25	Dako, Glostrup, Dänemark

mk monoklonal

Sekundärantikörper

Antikörper	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen-anti-Ratte	Biotin-Spacer	1:200	Dako, Glostrup, Dänemark
Kaninchen-anti-Maus	--	1:25	Dako, Glostrup, Dänemark

TBS (Tris Buffered Saline) 5l

34,25g Tris-HCl (GibcoBRL, 15506-017); 4,5g Tris-Base (Sigma, T1503); 43,9g NaCl (Merck 1.06404.1000); in 500ml Aqua dest. gelöst und auf 5 Liter aufgefüllt. Für die effektive Färbung von Paraffinmaterial wurde zur Senkung der Oberflächenspannung 5ml Tween hinzugefügt.

(pH 7,4-7,6)

Verdünnung für Antikörper

RPMI (Seromed 1640; 10-fach konz.) 50ml; 450ml Aqua dest; 50ml inaktiviertes Rinderserum; 0,5g Azid (Natriumsalz Merck 6688)
(pH 7,4-7,6)

Zitratpuffer

10,5g Zitronensäure-Monohydrat (Merck 100244) in 5l Aqua dest.; 60ml 2N NaOH 2mol/l vorlegen (Merck 109136)
(pH 6,0)

Xylol

J.T. Baker 8118

DAB-Substratlösung

10ml Dako REAL™ Substrate Buffer; 200µl Dako REAL™ DAB+ Chromogen gründlich mischen

Chromogen-Red-Substratlösung

15ml AP Substratpuffer; 600µl Chromogen Red 1; gründlich mischen; 600µl Chromogen Red 2; gründlich mischen; 600µl Chromogen Red 3; gründlich mischen

Hämalaun

1g Hämatoxylin (Merck 4305); 0,2g NaJO₃ (Merck 6525); 50g Kalilaun (Merck 507 A 95744) in 1l Aqua dest. lösen und über Nacht rühren, danach 50g Chloralhydrat (Merck 2425) und 1g Zitronensäure (Merck 244) hinzugeben.

2.2.4 Entparaffinierung und Vorbereitung der Färbung

Es wurden zunächst 4µm dicke Schnitte des in 10%-iger Formalinlösung fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebes mit einem Mikrotom (Mircrom GmbH, Heidelberg, Typ 4008) angefertigt und diese auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Schnitte trockneten ca. 12 Stunden bei 68°C. Zum gründlichen Entparaffinieren wurden die Schnitte über jeweils 5 Minuten in 3 aufeinanderfolgenden Xylolbädern getränkt. Es

folgte eine absteigende Alkoholreihe über 100%, 96%, 80% und 70% zur Rehydratation des Gewebes, kurzzeitige Immersion in Aqua dest. und anschließendes Verbleiben der Objektträger in TBS. Im Rahmen des HIER erhitzen wir die Schnitte für 2 Minuten in Zitratpuffer (pH 6) mittels eines Schnellkochtopfes. Daraufhin wurden die Objektträger unter fließendem Wasser abgekühlt und nochmals in TBS gewaschen.

2.2.5 Applikation der Antikörper gegen FOXP3

Vor der Applikation der Antikörper behandelten wir die Schnitte mit einem Peroxidase-blockenden Reagenz (Dako, Glostrup, Dänemark) für 5 Minuten, um endogene Peroxidase-Aktivität und somit eventuelle falschpositive Anfärbungen zu verhindern. Die Schnitte wurden anschließend ein weiteres Mal in einem TBS-Bad gewaschen. Dann erfolgte die 30-minütige Inkubation der Schnitte mit dem primären, monoklonalen Ratten-Antikörper gegen den Amino-Terminus des FOXP3-Proteins bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurden die Schnitte gründlich mit TBS abgespült und verblieben für 5 Minuten in einem TBS-Bad. Als nächstes wurden die Schnitte mit dem sekundären, biotinylierten Kaninchen-Anti-Ratte Antikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend noch einmal gründlich mit TBS gewaschen.

2.2.6 Entwicklung nach der polymerbasierten Peroxidase-Methode

Die Entwicklung erfolgte mit dem „Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse“ (Dako). Hierzu erfolgte zunächst eine 30-minütige Inkubation mit dem „Dako REAL™ Envision™/HRP, Rabbit/Mouse“. Diese Substanz besteht aus einem Dextran-Polymer, an welches bis zu 20 Ziegen-Antikörper sowie bis zu 100 Moleküle Meerrettich-Peroxidase (Englisch: horseradish peroxidase, HRP) gebunden sind. Der verwendete Ziegen-Antikörper reagiert gut mit Immunglobulinen des Kaninchens oder der Maus. Danach wurden die Objektträger wieder intensiv mit TBS gespült und dann für 10 Minuten mit der DAB (Diaminobenzidin)-Substratlösung inkubiert. Durch die gebundene Meerrettich-Peroxidase wird mit Hilfe des Chromogens

DAB ein lösliches Substrat umgesetzt, das als brauner Niederschlag die Bindung des spezifischen Antikörpers nachweist. Es folgte eine weitere Spülung mit TBS.

2.2.7 Applikation der Antikörper gegen CD3 bzw. CD8

Vor der Applikation des Antikörpers erfolgte ein weiteres Mal das Kochen der Schnitte in Zitrat-Puffer mit anschließendem Abkühlen unter fließendem Aqua dest. und Spülen mit TBS. Nun wurden die Objektträger für 30 Minuten mit dem primären Antikörper gegen CD3 (clone UCHT, 1:25, Dako) inkubiert. Es folgte die Spülung der Schnitte mit TBS mit anschließendem Verbleib im TBS-Bad.

2.2.8 Entwicklung nach der APAAP-Methode

Zur Entwicklung wurde das „ChemMate Detection Kit, APAAP, Mouse“ (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) verwendet. Zunächst wurde der sekundäre Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper (ChemMate™ Link, Secondary Antibody, Dako) aufgetragen und 30 Minuten auf den Objektträgern belassen. Es folgte eine erneute gründliche Spülung mit TBS und danach die Inkubation mit dem APAAP-Komplex für 30 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte wiederum mit TBS gespült. Zur Intensivierung der Färbung wurde die Inkubation ein zweites Mal mit dem Sekundär-Antikörper und mit dem APAAP-Komplex für jeweils 10 Minuten mit nachfolgender TBS-Spülung durchgeführt. Abschließend wurden die Schnitte noch mit der Chromogen-Red-Substratlösung für 30 Minuten inkubiert und mit TBS gewaschen.

Die Gegenfärbung mit Hämalaun erfolgte nach Abschluss der anderen Färbungen. Hierfür wurden die Objektträger für eine Minute in ein Hämalaun-Bad gegeben und anschließend mit Aqua dest. gespült.

2.3 Auszählung der Zellen

Da aus verschiedenen Studien bereits bekannt war, dass die Anzahl der CD3⁺, CD8⁺ sowie FOXP3⁺ T-Zellen im Stroma- und Epithel-Anteil von Karzinomen (bzw. in der Lamina propria und dem Epithel bei gesunden, epithelausgekleideten Organen) zum Teil erheblich differieren, wurden diese beiden Bereiche getrennt analysiert. Hierfür wurden die Zellen in jeweils 10 zufällig ausgewählten High Power Fields (1 HPF = 0,237mm²) im Epithel als auch im Stroma manuell ausgezählt und gemittelt. Da sich in einem HPF meistens sowohl epitheliale als auch stromale Anteile befinden, wurden für die Analyse der Gesamtinfiltration die im Epithel und im Stroma gefundenen Zellzahlen addiert.

2.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung und die Erstellung der entsprechenden Grafiken wurde das Programm SPSS („Statistical Package for the Social Science“) in der Version 11.5 für Windows XP verwendet. Das Signifikanzniveau wurde für alle Tests auf $p = 0,05$ gesetzt. P-Werte kleiner als 0,1 wurden als statistischer Trend erachtet. Es sollte darauf hingewiesen werden, dass alle Analysen, die nicht die Treg-Infiltration betreffen, rein deskriptiver Natur sind, da es sich um post-hoc-Analysen handelt.

2.4.1 Treg-Infiltration und systemische T-Zell-Antwort

Die Anzahl der Treg wurde sowohl einzeln für die epithelialen und stromalen Anteile des Tumors analysiert, als auch die gesamte Treg-Infiltration als Summe aus beiden. Die lokale Treg-Infiltration von Patienten mit und ohne KRK wurde mittels des Student t-Tests miteinander verglichen. Mit Hilfe dieses Tests wurden auch die epitheliale und die stromale Infiltration verglichen. Für weitere Analysen wurden die Patienten hinsichtlich dem Vorhandensein oder Fehlen einer systemischen T-Zell-Antwort gruppiert.

2.4.2 T-Zell-Infiltration (Treg, CD3⁺ und CD8⁺) und Überleben

Die Patienten wurden anhand ihrer T-Zell-Infiltration gruppiert. Der Median wurde verwendet, um Patienten mit starker Infiltration von solchen mit schwacher Infiltration zu unterscheiden. Zum Vergleich dieser beiden Gruppen wurde die Kaplan-Meier-Methode angewendet und die statistische Signifikanz anhand des Log-Rang-Tests geprüft.

Alle Berechnungen bezüglich der CD8⁺ und CD3⁺-Infiltration waren lediglich post-hoc-Analysen, da der primäre Endpunkt dieser Arbeit die Untersuchung der Treg-Infiltration war. In diesem Sinne wurden auch Zusammenhänge zwischen dem Treg/CD8⁺-Quotienten und dem Überleben untersucht.

2.4.3 Stadienkorrektur

Da das Stadium der Erkrankung einen eigenen prognostischen Faktor darstellt, sind die Patienten hinsichtlich ihres UICC-Stadiums gruppiert worden. Dabei wurden UICC I und UICC II zusammengefasst, da nur ein Patient ein KRK im Stadium UICC I hatte. Die Stadienkorrektur wurde durchgeführt, indem innerhalb der Gruppen wiederum der Median der T-Zell-Infiltration zur Separation in Patienten mit starker und Patienten mit schwacher Infiltration benutzt wurde. Alle Patienten mit schwacher Infiltration aus den Gruppen I+II, III und IV wurden dann zu einer neuen „stadien-korrigierten Gruppe mit schwacher Infiltration“ zusammengefasst. Auf dem gleichen Weg wurde eine neue „stadien-korrigierte Gruppe mit starker Infiltration“ gebildet. Diese beiden Gruppen wurden dann wiederum mittels der Kaplan-Meier-Methode verglichen und der Log-Rang-Test zur Bestimmung der statistischen Signifikanz verwendet.

2.4.4 Zusammenhänge zwischen T-Zell-Infiltration, Stadium und Geschlecht

Um Unterschiede in der T-Zell-Infiltration zwischen Patienten in niedrigen und Patienten in hohen Stadien zu analysieren, wurde eine Gruppe mit limitierter Erkrankung (UICC I und II) und eine Gruppe mit metastasierter Erkrankung (UICC III und IV) gebildet. Die beiden Gruppen wurden dann bezüglich der stromalen und epithelialen Infiltration durch

Treg, CD3⁺ und CD8⁺ T-Zellen unter Verwendung des Student t-Tests miteinander verglichen. Außerdem wurden mit diesem Test auch die Zusammenhänge zwischen T-Zell-Infiltration und Geschlecht untersucht.

2.4.5 Korrelationen zwischen Treg-, CD3⁺ und CD8⁺ Infiltration sowie dem Alter

Die Korrelation von Treg, CD3⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurde analysiert (Pearson). Dies wurde getrennt für das Stroma und das Epithel durchgeführt. Des Weiteren wurde auch untersucht, ob es Korrelationen zwischen der T-Zell-Infiltration und dem Alter der Patienten gab.

3 Ergebnisse

3.1 Charakteristika der Kontrollgruppe

Die gesunde Kontrollgruppe bestand aus 12 Personen, die sich im Rahmen der Krebsfrüherkennung einer Koloskopie unterziehen ließen und sich freiwillig zu einer Spende bereit erklärten. Bei diesen Personen gab es sowohl klinisch als auch histologisch keine Befunde, welche auf ein KRK hinwiesen. Es handelte sich um 7 Männer und 5 Frauen im Alter von 55 bis 74 Jahren. Das durchschnittliche Alter der Kontrollpersonen lag bei 64,6 Jahren. Eine Übersicht über die Kontrollgruppe ist in Tabelle 3.1 zu sehen und detaillierte Charakteristika sowie Zellzahlen können der Tabelle 3.2 entnommen werden.

Tabelle 3.1 Kontrollgruppe – Übersicht

Charakteristika	Wert
Anzahl der untersuchten Personen	12
Alter in Jahren	
Durchschnitt	64,6
Spannweite	55 - 74
Geschlecht	
Weiblich	5 (42,7)
Männlich	7 (58,3)

Daten in Klammern sind Prozente.

Tabelle 3.2 Detaillierte Charakteristika der Kontrollpersonen

Kontroll- personen-Nr.	Alter/ Geschlecht	FOXP3 ⁺ TIL / HPF ^a			CD3 ⁺ TIL / HPF ^a			CD8 ⁺ TIL / HPF ^a		
		Total ^b	Lamina propria	Epithel	Total ^b	Lamina propria	Epithel	Total ^b	Lamina propria	Epithel
C1	56/M	0,3	0,3	0	18	5,5	12,5	13,8	1,8	12
C2	57/W	0,2	0,2	0	12,7	4,2	8,5	9	1,5	7,5
C3	55/M	0,5	0,4	0,1	22,5	11,5	11	14,4	3,9	10,5
C4	68/M	0,3	0,3	0	15,7	6,2	9,5	10,6	2,1	8,5
C5	74/W	0,3	0,3	0	17,8	11,5	6,3	8,8	3,2	5,6
C6	73/W	0,9	0,7	0,2	15,4	8,2	7,2	10,4	4,1	6,3
C7	68/W	0,6	0,6	0	18	7,5	10,5	12,6	3,1	9,5
C8	68/W	0,8	0,8	0	20	12	8	11,8	4,6	7,2
C9	63/M	1	0,9	0,1	22	13,5	8,5	13	5,5	7,5
C10	63/M	0,4	0,4	0	15,3	8,5	6,8	8,5	2,9	5,6
C11	65/M	1	0,8	0,2	20	12,5	7,5	11	4,2	6,8
C12	65/M	1,1	1,1	0	22,5	13	9,5	12	3,8	8,2

a 10 high power fields (HPF) wurden jeweils gemittelt.

b Gesamte Infiltration als Summe von stromaler und epithelialer Infiltration.

3.2 Charakteristika der KRK-Patienten

Auf 40 Patienten mit KRK trafen alle Einschlusskriterien zu. Eine Übersicht über die Studienpopulation wird in Tabelle 3.3 gezeigt. Von den 40 untersuchten Patienten verstarben 12 (30%). Die mittlere Beobachtungsdauer nach Erstdiagnose lag für die gesamte Gruppe bei 42,1 Monaten (Spannweite: 5-100 Monate). Das mittlere Alter aller Patienten bei Erstdiagnose lag bei 62,1 Jahren (Spannweite: 37-83 Jahre, Patienten mit T-Zell-Antwort: 61,7 Jahre, Patienten ohne T-Zell-Antwort: 62,2 Jahre). Einundzwanzig Patienten waren weiblich und neunzehn männlich. Ein Patient hatte KRK im Stadium UICC I, 20 Patienten UICC II, 6 Patienten UICC III und 13 Patienten UICC IV. Die 5-Jahres-Überlebensrate für die gesamte Studienpopulation lag bei 69,1%. Bei 11 Patienten wurde eine systemische, TAA-spezifische T-Zell-Antwort gegen mindestens eines der HLA-A2-bindenden Peptide CEA, Ep-CAM und/oder her-2/neu festgestellt.

Tabelle 3.3 Patienten-Charakteristika – Übersicht

Charakteristika	Wert
Anzahl der untersuchten Patienten	40
Alter in Jahren	
Durchschnitt	62,1
mit T-Zell-Antwort	61,7
ohne T-Zell-Antwort	62,2
Spannweite	37 - 83
Geschlecht	
Weiblich	21 (52,5)
Männlich	19 (47,5)
5-Jahres-Überlebensrate in %	69,1
UICC-Stadium	
limitierte Erkrankung	21 (52,5)
I	1 (2,5)
II	20 (50)
metastasierte Erkrankung	19 (47,5)
III	6 (15)
IV	13 (32,5)
Systemische T-Zell-Antwort	
gegen mind. eines der folgenden TAA	11 (27,5)
CEA	6 (15)
Ep-CAM	7 (17,5)
her-2/neu	6 (15)
gegen keines der TAA	29 (72,5)
Dauer der Nachbeobachtung in Monaten	
Durchschnitt	42,1
Spannweite	5 - 100
Status	
Lebend	28 (70)
Verstorben	12 (30)

Daten in Klammern sind Prozente.

3.3 Treg-Infiltration im KRK und im gesunden Kolon

In allen 40 KRK-Proben wurde eine Infiltration durch Treg gefunden. Die gesamte Treg-Infiltration als Summe aus epithelialer und stromaler Infiltration lag beim KRK im Durchschnitt bei 12,9/HPF. Im Vergleich dazu fand sich bei den gesunden Kolonproben eine niedrigere Gesamt-Treg-Infiltration von 0,6/HPF. Dieser Unterschied war hochsignifikant ($p < 0,01$).

Die mittlere stromale Treg-Infiltration in allen KRK-Proben war mit 10,8/HPF signifikant höher als die epitheliale Infiltration, welche mit durchschnittlich 2,0/HPF imponierte ($p < 0,01$). Ähnliche Verhältnisse zeigten sich bei den gesunden Kolonproben mit einer signifikant höheren durchschnittlichen Treg-Infiltration in der Lamina propria (0,6/HPF) als im Epithel (0,1/HPF; $p < 0,01$).

Sowohl im Epithel als auch beim Vergleich von Tumorstroma und Lamina propria des gesunden Kolon war die Treg-Infiltration im Tumor signifikant höher ($p < 0,01$) als im gesunden Kolongewebe. In Abbildung 3.1 sind diese Unterschiede grafisch dargestellt. Die ermittelten Treg-Zahlen der einzelnen Patienten können den Tabellen 3.2 (S. 42) und 3.4 (S. 46) entnommen werden. Einige Bilder repräsentativer Proben sind in der Abbildung 3.2 (S. 47) zu sehen. Tabelle 3.5 (S. 52) zeigt die Ergebnisse der Treg-Infiltration im Überblick.

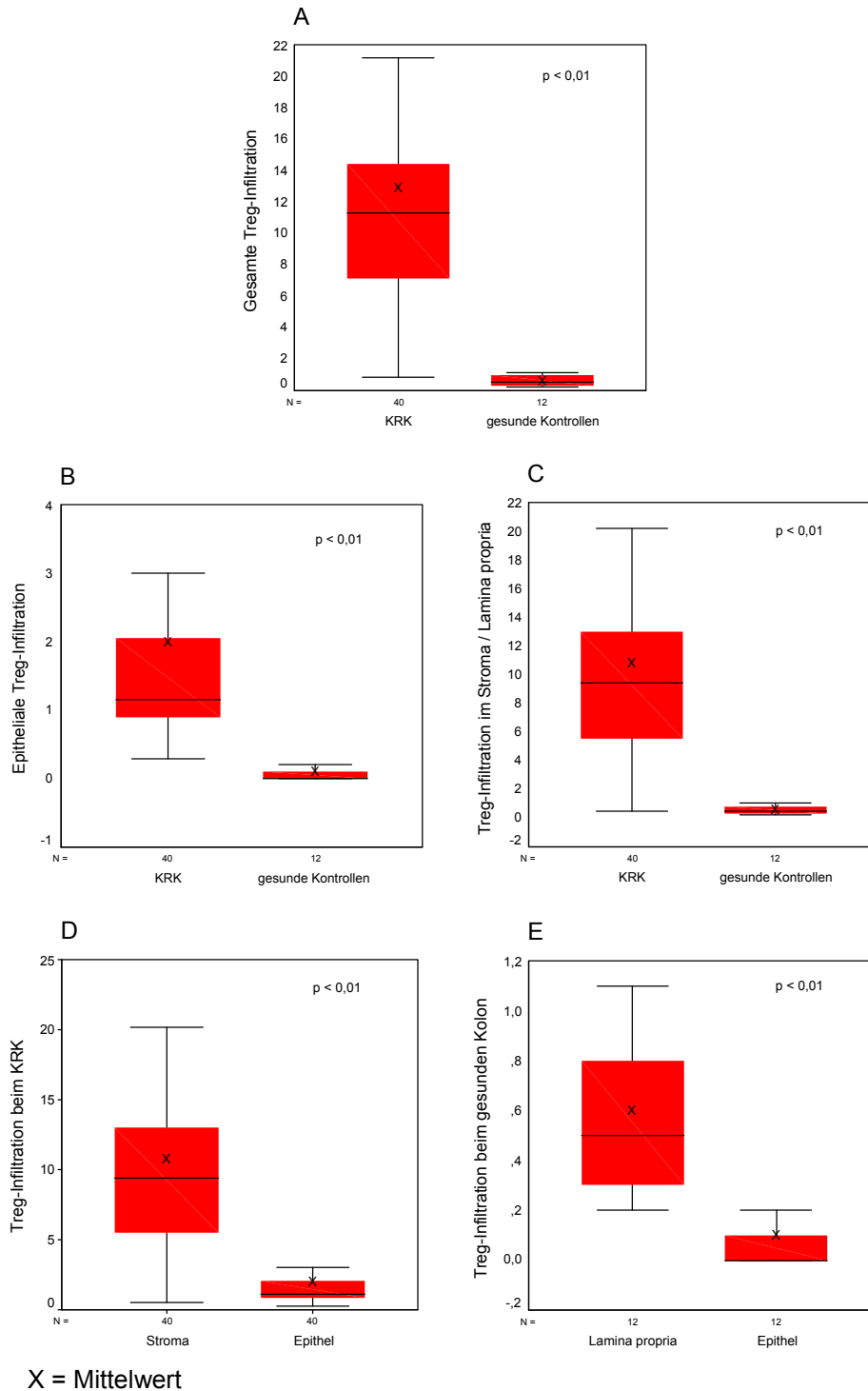


Abb. 3.1 Treg-Infiltration im KRK und im gesundem Kolon

- (A) Gesamte Treg-Infiltration im KRK und im gesunden Kolon
- (B) Epitheliale Treg-Infiltration im KRK und im gesunden Kolon
- (C) Stromale Treg-Infiltration im KRK und Infiltration der Lamina propria des gesunden Kolon
- (D) Stromale und epitheliale Treg-Infiltration im KRK
- (E) Treg-Infiltration in Lamina propria und Epithel des gesunden Kolon

Tabelle 3.4 Detaillierte Patienten-Charakteristika und Treg-Zahlen

Patienten-Nr.	Alter ^a / Geschlecht	Stadium (UICC)	T-Zell-Antwort ^b	Überleben/Nachbeobachtung (mo) ^c	Status (tot/lebend)	FOXP3 ⁺ TIL /HPF ^d		
						Total ^e	Stroma	Epithel
P1	55/M	II	-	74+	lebend	12,9	12	0,9
P2	51/W	IV	+	59+	lebend	4,9	4	0,9
P3	66/W	II	-	49+	lebend	11,3	7,3	4
P4	64/M	II	-	52+	lebend	7	6	1
P5	60/W	II	-	53+	lebend	11,2	9,7	1,5
P6	78/W	III	-	100+	lebend	11,3	9,5	1,8
P7	58/M	IV	-	29	tot	18,1	12,2	5,9
P8	74/W	II	-	53+	lebend	25,9	25	0,9
P9	44/W	II	+	48+	lebend	11	8	3
P10	71/M	II	+	53+	lebend	10,3	9,3	1
P11	53/M	II	-	44+	lebend	14	13	1
P12	56/M	III	-	5	tot	4,8	3,5	1,3
P13	40/W	II	-	54+	lebend	52	50	2
P14	61/M	II	-	54+	lebend	15	14	1
P15	73/W	II	-	25+	lebend	12	10	2
P16	60/W	IV	-	19	tot	7,8	7	0,8
P17	70/M	III	+	13	tot	3,5	3	0,5
P18	73/W	II	-	10	tot	4,4	4	0,4
P19	72/W	II	-	5+	lebend	32	26	6
P20	77/M	II	-	60+	lebend	14	11	3
P21	64/W	II	-	50+	lebend	17,9	15,5	2,4
P22	52/M	IV	+	12	tot	0,8	0,5	0,3
P23	68/M	IV	+	8	tot	11	9	2
P24	68/W	III	-	43+	lebend	11,1	9	2,1
P25	76/W	IV	+	65+	lebend	10	9	1
P26	72/W	II	-	45+	lebend	7,3	6,5	0,8
P27	37/W	IV	+	11	tot	16,5	14,5	2
P28	51/M	I	-	73+	lebend	5	3	2
P29	83/M	IV	+	8	tot	3,9	3,4	0,5
P30	70/W	II	-	74+	lebend	14,8	8	6,8
P31	57/M	IV	-	30+	lebend	7	5	2
P32	61/M	IV	-	53+	lebend	12,1	11,5	0,6
P33	66/M	II	-	25	tot	14	13	1
P34	63/M	IV	-	6	tot	11,5	11	0,5
P35	55/W	III	+	69+	lebend	6,6	4,9	1,7
P36	49/W	IV	-	53+	lebend	7,5	5	2,5
P37	48/W	II	-	37+	lebend	14	13	1
P38	57/M	IV	-	10	tot	12	11,5	0,5
P39	58/W	II	-	77+	lebend	21,2	20,2	1
P40	72/M	III	+	76+	lebend	27	15	12

a Alter bei Erstdiagnose in Jahren,

b +, positive T-Zell-Antwort gegen Ep-CAM, Her2/neu und/oder CEA,

c Überlebenszeit bzw. Nachbeobachtungszeit nach Erstdiagnose in Monaten,

d 10 HPF (high power fields) wurden jeweils gemittelt,

e Gesamte Infiltration als Summe aus stromaler und epithelialer Infiltration.

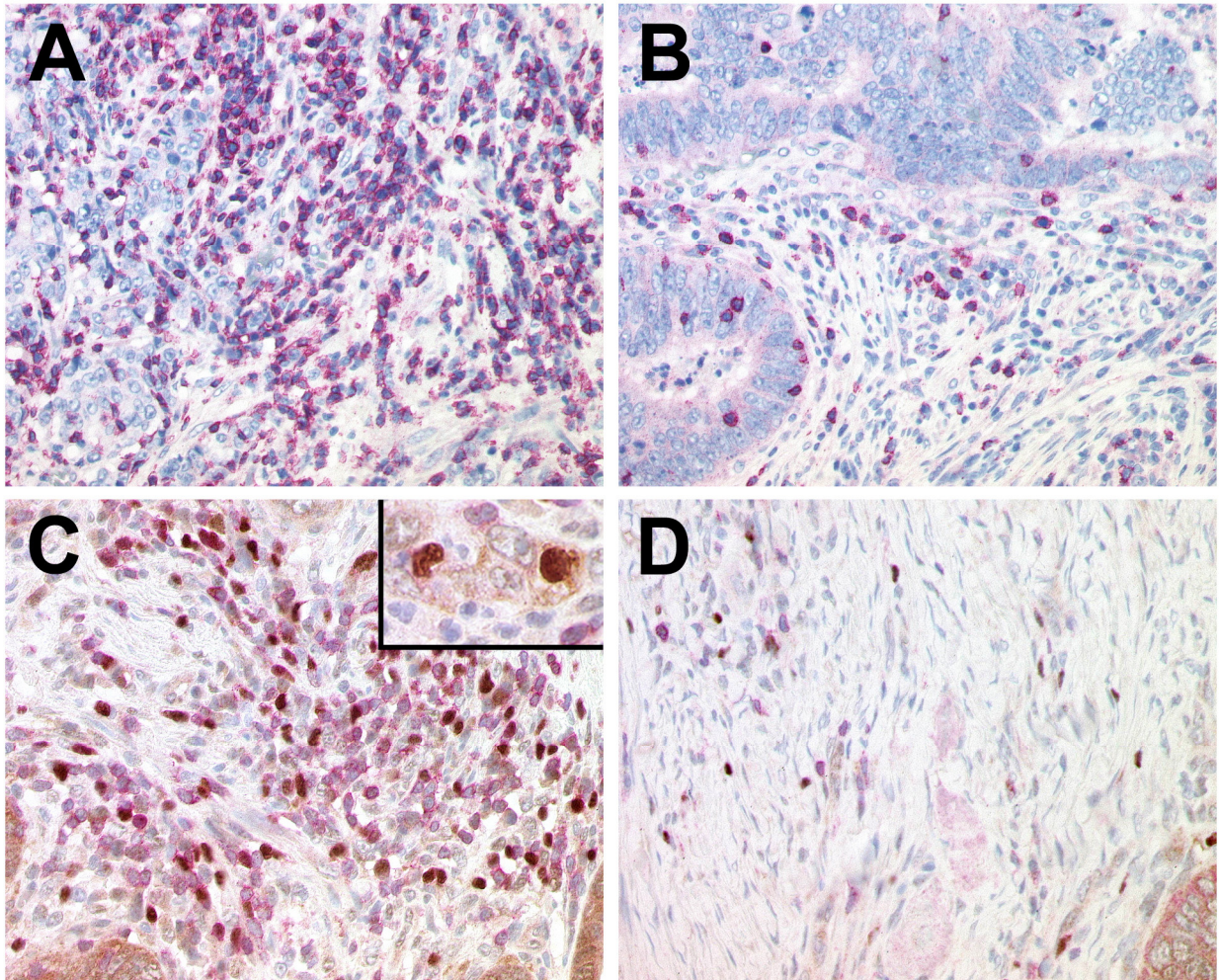


Abb. 3.2 Repräsentative Beispiele der immunhistochemischen Färbungen

- (A) Immunhistochemische Färbung von CD8⁺ T-Zellen einer KRK Probe bei einem Fall, der eine hohe Zahl von CD8⁺ T-Zellen aufweist.
- (B) Immunhistochemische Färbung von CD8⁺ T-Zellen bei einem anderen Fall mit einer niedrigen Zahl von CD8⁺ T-Zellen.
- (C) Immunhistochemische Färbung von CD3⁺ T-Zellen (rot, membranös) der gleichen Probe wie bei (A) mit einem hohen Anteil regulatorischer T-Zellen (braun, nukleär), welche zusätzlich FOXP3 exprimieren.
- (D) Immunhistochemische Färbung von CD3⁺ T-Zellen (rot, membranös) der gleichen Probe wie bei (B) mit einer geringeren Zahl CD3⁺ und FOXP3⁺ regulatorischer T-Zellen (braun, nukleär).

3.4 Treg-Infiltration und systemische T-Zell-Antwort beim KRK

Die durchschnittliche Gesamt-Infiltration des KRK durch Treg bei Patienten *ohne* systemische TAA-spezifische T-Zell-Antwort lag bei 14,1/HPF und bei Patienten *mit* T-Zell-Antwort bei 9,6/HPF. Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant ($p = 0,16$). Auch bei der separaten Betrachtung der epithelialen und stromalen Bereiche war die durchschnittliche Treg-Infiltration jeweils etwas höher bei den Patienten *ohne* systemische TAA-spezifische T-Zell-Antwort – ohne dabei das Signifikanzniveau zu erreichen. Bezüglich des stromalen Tumoranteils hatten Patienten *mit* T-Zell-Antwort eine durchschnittliche Infiltration durch Treg von 7,3/HPF, wohingegen Patienten *ohne* T-Zell-Antwort eine Infiltration von durchschnittlich 12,2/HPF ($p = 0,11$) aufwiesen. Die Abbildung 3.3 zeigt diese Vergleiche als Boxplots.

Die beiden Patienten *mit* positiver T-Zell-Antwort bei limitierter Erkrankung hatten eine durchschnittliche Treg-Infiltration im epithelialen Bereich von 2/HPF und im Stroma von 8,7/HPF. Die epitheliale Infiltration von Patienten *ohne* T-Zell-Antwort bei limitierter Erkrankung ist ähnlich ausgeprägt wie die bei den eben beschriebenen Patienten *mit* T-Zell-Antwort. Es zeigt sich aber bei der stromalen Infiltration ein Unterschied: Patienten *ohne* T-Zell Antwort bei limitierterter Erkrankung hatten im Stroma eine ausgeprägtere Infiltration (14,1/HPF, Signifikanz aufgrund der niedrigen Patientenzahl nicht geprüft) als Patienten *mit* T-Zell-Antwort bei limitierter Erkrankung. Einen Gesamtüberblick über die Ergebnisse bezüglich der Treg-Infiltration gibt Tabelle 3.5 (S. 52) und die Zellzahlen im einzelnen sind in den Tabellen 3.2 (S. 42) und 3.4 (S. 46) gegeben.

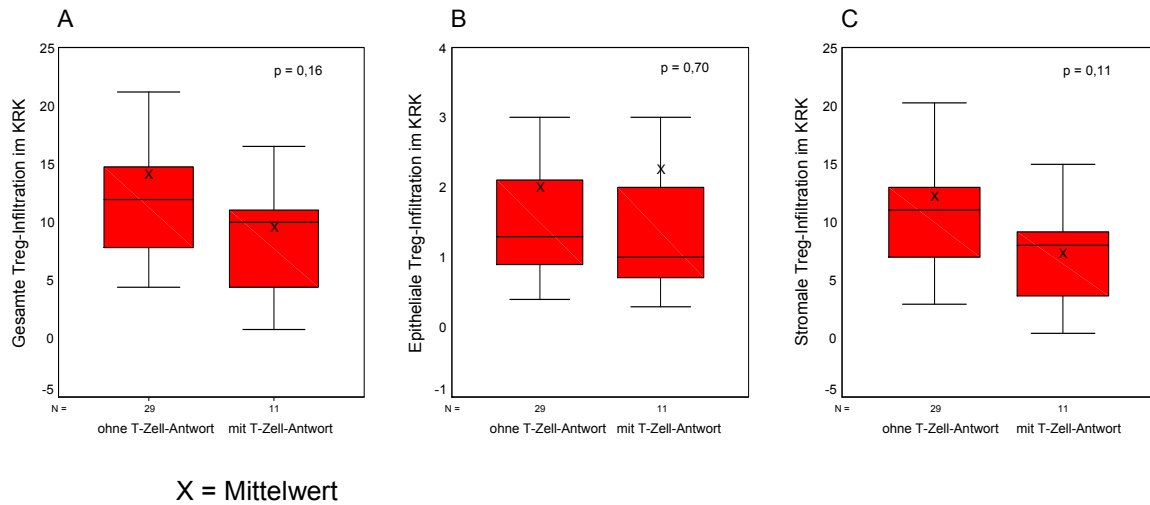


Abb. 3.3 Treg-Infiltration des KRK mit und ohne T-Zell-Antwort

- (A) Gesamte Treg-Infiltration im KRK von Patienten mit und ohne T-Zell-Antwort
- (B) Epitheliale Treg-Infiltration im KRK von Patienten mit und ohne T-Zell-Antwort
- (C) Stromale Treg-Infiltration im KRK von Patienten mit und ohne T-Zell-Antwort

3.5 Treg-Infiltration und Überleben beim KRK

Betrachtet man alle Patienten ohne dem Stadium Beachtung zu schenken, so ergibt sich für das Überleben kein Unterschied zwischen Patienten mit hoher und Patienten mit niedriger Gesamt-Treg-Infiltration. Auch bei einzelner Begutachtung der Zellzahlen in den epithelialen Bereichen und dem Tumorstroma war kein Unterschied zu finden. Allerdings fand sich nach Durchführung einer Stadienkorrektur ein signifikant besseres Überleben ($p=0,04$) bei Patienten mit einer hohen Infiltration von Treg im Epithel des Tumors. Dieser Unterschied im Überleben wurde nicht bei der Treg-Infiltration des Stromas gefunden. In Abbildung 3.4 sind diese Ergebnisse grafisch dargestellt.

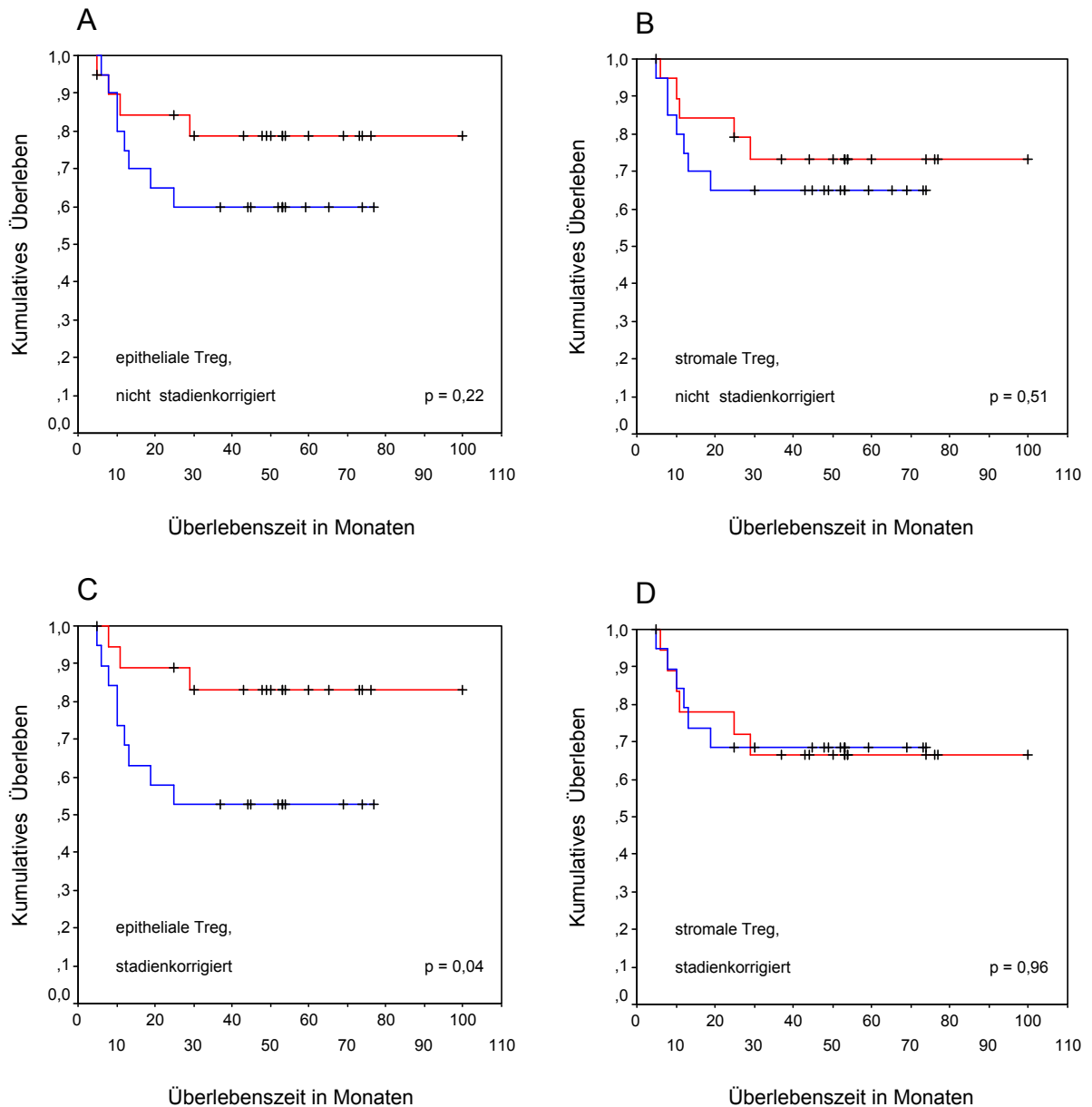


Abb. 3.4 **Überlebensanalyse zur Treg-Infiltration**

Kaplan-Meier-Überlebens-Analyse von Patienten mit hoher (rot) und niedriger (blau) Treg-Infiltration. (A) und (B) zeigen die Analyse ohne Berücksichtigung der verschiedenen UICC-Stadien. Bei (C) und (D) erfolgte eine stadienkoriigierte Analyse, indem die Zuordnung zur hohen oder niedrigen Infiltrationsgruppe für jedes UICC-Stadium einzeln erfolgte.

- (A) Epitheliale Treg-Infiltration ohne Berücksichtigung der Stadien
- (B) Stromale Treg-Infiltration ohne Berücksichtigung der Stadien
- (C) Epitheliale Treg-Infiltration, stadienkoriigiert
- (D) Stromale Treg-Infiltration, stadienkoriigiert

3.6 Treg-Infiltration und KRK-Stadium

Die Gesamt-Treg-Infiltration war signifikant höher beim limitierten als beim metastasierten KRK (15,6/HPF gegenüber 9,9/HPF, $p = 0,04$). Dieser Unterschied wurde hauptsächlich durch eine verschieden ausgeprägte Infiltration des Tumorstromas hervorgerufen (13,5/HPF gegenüber 7,8/HPF; $p = 0,03$). Bei der separaten Betrachtung der Treg-Infiltration in den epithelialen Bereichen ergaben sich keine Unterschiede zwischen limitierten und metastasierten Stadien der Erkrankung. In Abbildung 3.5 sind die entsprechenden Boxplots zu sehen.

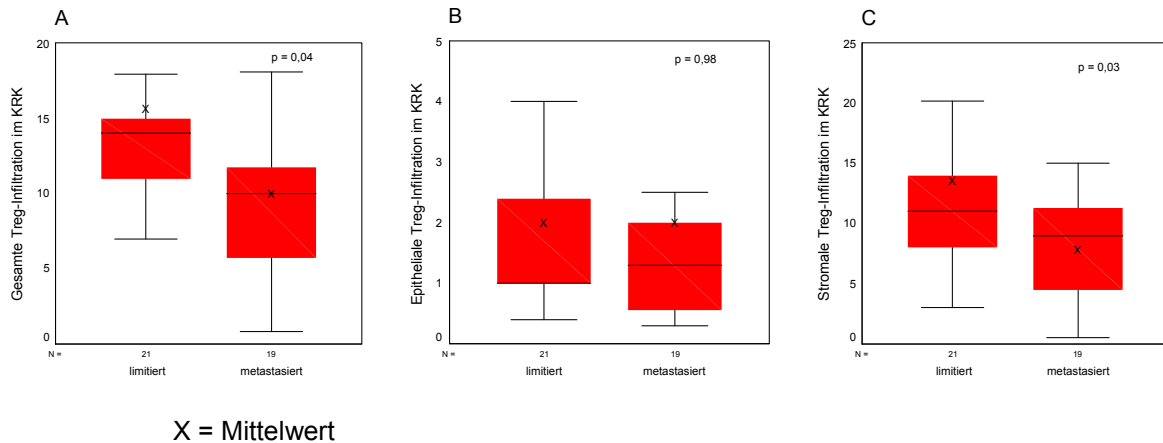


Abb. 3.5 Treg-Infiltration bei limitiertem und metastasiertem KRK

- (A) Gesamte Treg-Infiltration bei limitierten und metastasierten KRK-Stadien
- (B) Epitheliale Treg-Infiltration bei limitierten und metastasierten KRK-Stadien
- (C) Stromale Treg-Infiltration bei limitierten und metastasierten KRK-Stadien

Tabelle 3.5 Ergebnisübersicht bezüglich der Treg-Infiltration

	n ^a	FOXP3 ⁺ TIL / HPF ^b	p-Wert
Gesunde Kontrollen	12	0,6	< 0,01
KRK	40	12,9	
Stroma	40	10,8	< 0,01
Epithel	40	2,0	
limitierte Erkrankung	21	15,6	0,04
metastasierte	19	9,9	
Erkrankung			
mit T-Zell-Antwort	11	9,6	
ohne T-Zell-Antwort	29	14,1	0,16

a n, Fallzahl der Gruppe

b Mittelwerte aller Einzelwerte der entsprechenden Gruppe

3.7 Treg-Infiltration und CD3⁺ sowie CD8⁺ T-Zell-Infiltration beim KRK

Es traten in den epithelialen Anteilen des Tumors zwar signifikante, aber schwache Korrelationen zwischen der Treg- und CD3⁺ Infiltration (Pearson 0,684; $p < 0,01$) sowie zwischen der Treg- und CD8⁺ Infiltration (Pearson 0,625, $p < 0,01$) auf. Außerdem zeigte sich in den stromalen Bereichen eine schwache Korrelation zwischen Treg- und CD3⁺ Infiltration (Pearson 0,664; $p < 0,01$). Im Gegensatz dazu wurde im Stroma keine Korrelation zwischen der Treg- und CD8⁺ Infiltration gefunden (Pearson 0,273; $p = 0,09$). Die Zusammenhänge sind in Abbildung 3.6 dargestellt.

Bei allen Analysen bezüglich der Infiltration des KRK durch Treg, CD8⁺ oder CD3⁺ Zellen zeigten sich keine Korrelationen mit dem Alter oder dem Geschlecht.

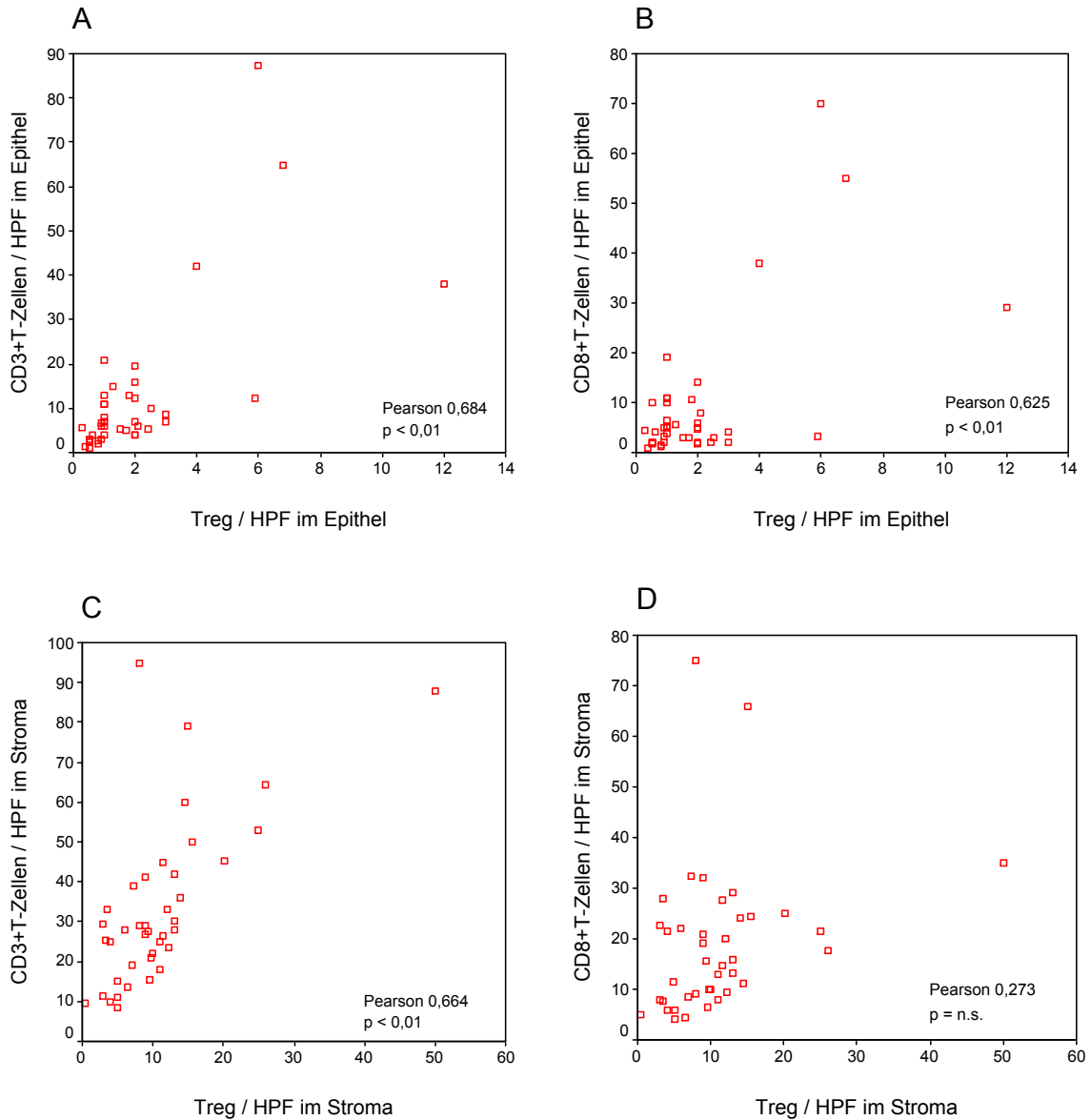


Abbildung 3.6 Korrelation zwischen Treg, CD3⁺ und CD8⁺ T-Zell-Infiltrationen

- (A) Korrelation von Treg- und CD3⁺ T-Zell-Infiltration im epithelialen Anteil des KRK
- (B) Korrelation von Treg- und CD8⁺ T-Zell-Infiltration im epithelialen Anteil des KRK
- (C) Korrelation von Treg- und CD3⁺ T-Zell-Infiltration im stromalen Anteil des KRK
- (D) Korrelation von Treg- und CD8⁺ T-Zell-Infiltration im stromalen Anteil des KRK

3.8 CD3⁺ und CD8⁺ T-Zell-Infiltration im KRK und im gesunden Kolon

Eine Infiltration durch CD3⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurde bei allen 40 KRK-Proben gefunden. Die gesamte CD8⁺ T-Zell-Infiltration war signifikant höher im KRK (28,5/HPF) als im gesunden Kolongewebe (11,3/HPF, $p = 0,03$). Während es bei der durchschnittlichen epithelialen CD8⁺ Infiltration keinen signifikanten Unterschied zwischen KRK (9,5/HPF) und gesundem Kolon (7,9/HPF) gab, so war die stromale CD8⁺ Infiltration signifikant höher im KRK (19,0/HPF) als in der Lamina propria des gesunden Kolon (3,4/HPF, $p < 0,01$). Auch wenn bezüglich der epithelialen Infiltration kein signifikanter Unterschied bei den Mittelwerten nachweisbar war, fällt doch die viel größere Bandbreite der CD8⁺ T-Zell-Zahlen bei den KRK-Proben auf. In Abbildung 3.7 sind diese Unterschiede grafisch dargestellt. Die ermittelten CD8⁺ Zellzahlen der einzelnen Patienten sind aus Tabelle 3.2 (S. 42) und Tabelle 3.6 (S. 58) ersichtlich.

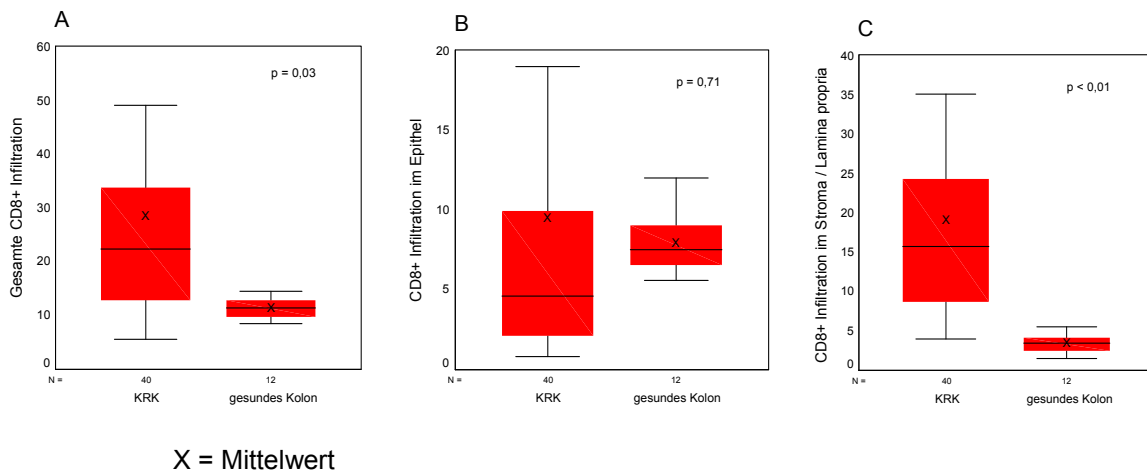


Abb. 3.7 CD8⁺ Infiltration im KRK und im gesundem Kolon

- (A) Gesamte CD8⁺ Infiltration im KRK und im gesundem Kolon
- (B) CD8⁺ Infiltration im Epithel des KRK und des gesunden Kolon
- (C) CD8⁺ Infiltration im Stroma des KRK und in der Lamina propria des gesunden Kolon

Des Weiteren zeigte sich beim gesunden Kolon, dass die epitheliale CD8⁺ Infiltration (7,9/HPF) signifikant höher war als die Infiltration der Lamina propria (3,4/HPF; $p < 0,01$). Beim KRK wurden umgekehrte Verhältnisse festgestellt: Hier war die CD8⁺ Infiltration im Stroma (19,0/HPF) signifikant höher als im Epithel (9,5/HPF; $p < 0,01$). Grafische Darstellungen dieser Unterschiede sind in Abbildung 3.8 zu sehen.

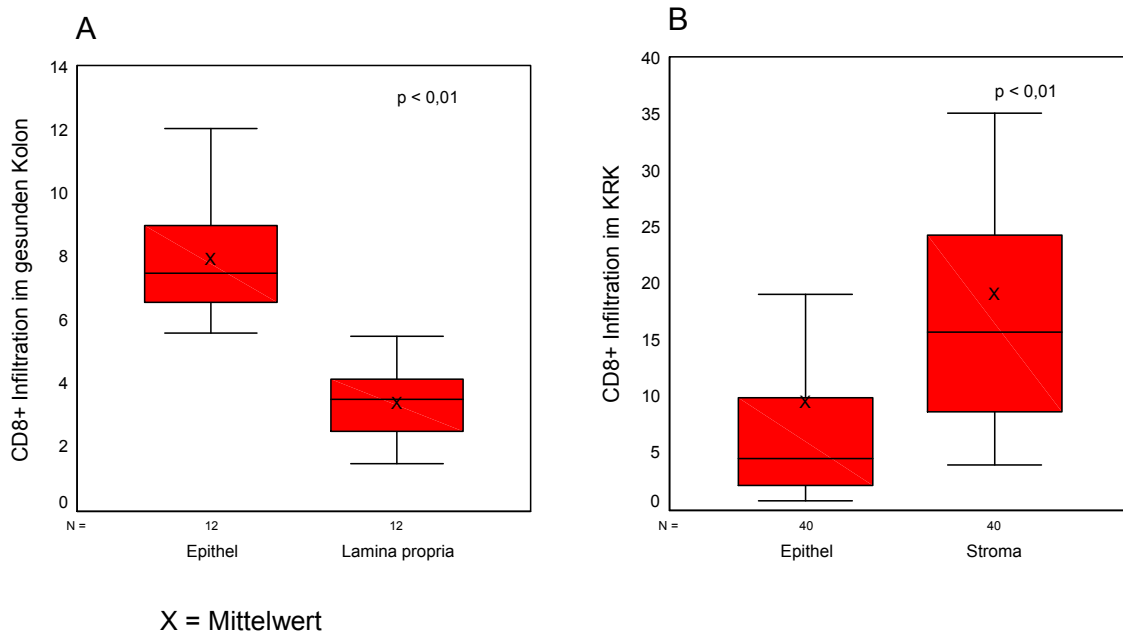


Abb. 3.8 CD8⁺ Infiltration im Epithel und im Tumorstroma bzw. in der Lamina propria des gesunden Kolon

- (A) CD8⁺ Infiltration des gesunden Kolon im Epithel und in der Lamina propria
- (B) CD8⁺ Infiltration des KRK im Epithel und im Tumorstroma

Bei der Auszählung der CD3⁺ Zellen ergab sich eine signifikant höhere Gesamtinfiltration des KRK (45,9/HPF) im Vergleich zum gesunden Kolon (18,3/HPF, $p < 0,01$). Dieser Unterschied basierte hauptsächlich auf einer stärkeren Stromalen CD3⁺ Infiltration im KRK (33,3/HPF) als in der Lamina propria des gesunden Kolon (9,5/HPF, $p < 0,01$). Beim Vergleich der CD3⁺ Infiltration des Tumorepithels (12,6/HPF) mit der des gesunden Kolonepithels (8,8/HPF) war hingegen kein signifikanter Unterschied auszumachen ($p = 0,46$). Abbildung 3.9 zeigt eine grafische Darstellung der Verhältnisse. Die ermittelten CD3⁺ Zellzahlen können den Tabellen 3.2 (S. 42) und 3.6 (S. 58) entnommen werden.

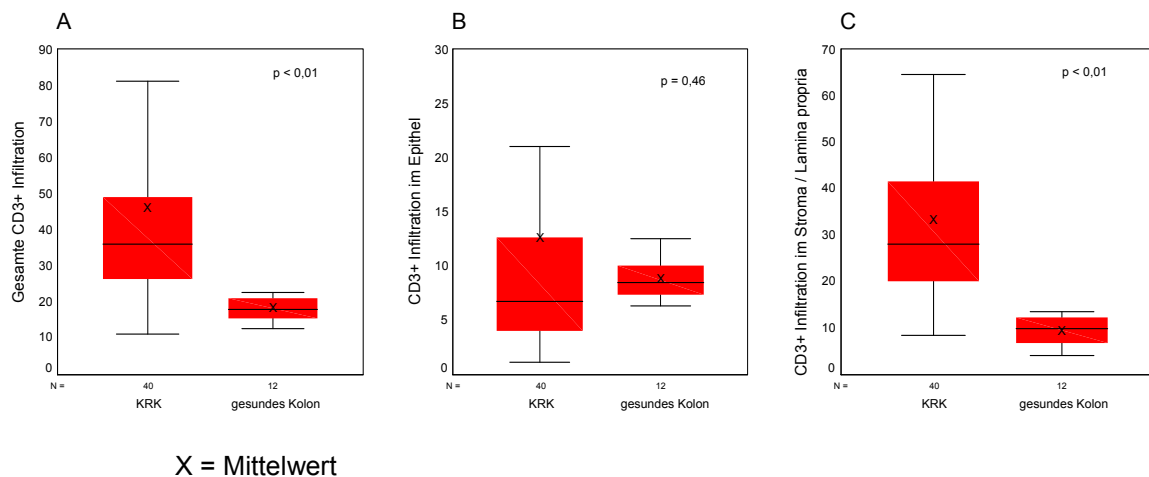


Abb. 3.9 CD3⁺ Infiltration des KRK und des gesunden Kolon

- (A) Gesamte CD3⁺ Infiltration im Tumor und im gesunden Kolon
- (B) CD3⁺ Infiltration im Epithel des KRK und des gesunden Kolon
- (C) CD3⁺ Infiltration im Stroma des KRK und in der Lamina propria des gesunden Kolon

Ein Vergleich der CD3⁺ Infiltration in der Lamina propria (9,5/HPF) und dem Epithel (8,8/HPF) des gesunden Kolon ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,58$). Ein signifikanter Unterschied war jedoch zwischen der CD3⁺ Infiltration des KRK-Stromas (33,3/HPF) und des KRK-Epithels (12,6/HPF) festzustellen ($p < 0,01$). Die Unterschiede können anhand von Abbildung 3.10 nachvollzogen und die genauen Zellzahlen Tabelle 3.2 (S. 42) sowie Tabelle 3.6 (S. 58) entnommen werden. Repräsentative Beispiele der ausgewerteten immunhistochemischen Färbungen sind in Abbildung 3.2 (S. 47) zu sehen.

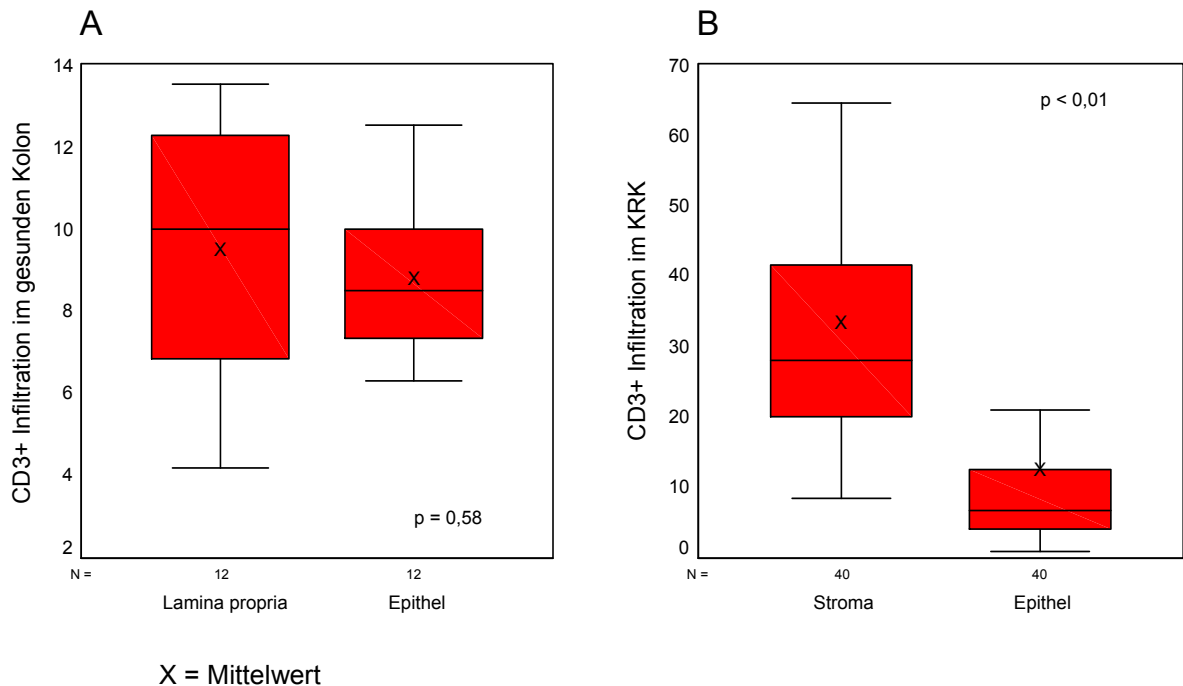


Abb. 3.10 CD3⁺ Infiltration im Epithel und im Tumorstroma / Lamina propria

- (A) Vergleich der CD3⁺ Infiltration des gesunden Kolon im Epithel und in der Lamina propria
- (B) Vergleich der CD3⁺ Infiltration des KRK im Epithel und im Stroma des Tumors

Tab. 3.6 Detaillierte Patienten-Charakteristika mit CD3⁺ und CD8⁺ Zellzahlen

Patienten-Nr.	Alter ^a / Geschlecht	Stadium (UICC)	T-Zell-Antwort ^b	Überleben/ Nachbeobachtung (mo) ^c	Status (tot/lebend)	CD3 ⁺ TIL / HPF ^d			CD8 ⁺ TIL / HPF ^d		
						Total ^e	Stroma	Epithel	Total ^e	Stroma	Epithel
P1	55/M	II	-	74+	lebend	39,5	33	6,5	23,2	20	3,2
P2	51/W	IV	+	59+	lebend	31	25,1	5,9	26,5	21,5	5
P3	66/W	II	-	49+	lebend	81	39	42	70,4	32,4	38
P4	64/M	II	-	52+	lebend	49	28	21	41	22	19
P5	60/W	II	-	53+	lebend	26,4	21,1	5,3	13	10	3
P6	78/W	III	-	100+	lebend	28,5	15,5	13	17	6,5	10,5
P7	58/M	IV	-	29	tot	35,8	23,6	12,2	12,7	9,5	3,2
P8	74/W	II	-	53+	lebend	55,9	52,9	3	23,7	21,6	2,1
P9	44/W	II	+	48+	lebend	37,5	29	8,5	11,2	9	2,2
P10	71/M	II	+	53+	lebend	35,4	27,4	8	22,1	15,5	6,6
P11	53/M	II	-	44+	lebend	49	42	7	34	29	5
P12	56/M	III	-	5	tot	48	33	15	33,5	28	5,5
P13	40/W	II	-	54+	lebend	104	88	16	49	35	14
P14	61/M	II	-	54+	lebend	47	36	11	34	24	10
P15	73/W	II	-	25+	lebend	29	22	7	15	10	5
P16	60/W	IV	-	19	tot	21,6	19	2,6	10	8,5	1,5
P17	70/M	III	+	13	tot	14,4	11,5	2,9	10	8	2
P18	73/W	II	-	10	tot	11,3	10	1,3	6,8	6	0,8
P19	72/W	II	-	5+	lebend	152	64,5	87,5	87,6	17,6	70
P20	77/M	II	-	60+	lebend	32	25	7	17	13	4
P21	64/W	II	-	50+	lebend	55,4	50	5,4	26,5	24,5	2
P22	52/M	IV	+	12	tot	15	9,5	5,5	9,5	5	4,5
P23	68/M	IV	+	8	tot	33,1	29	4,1	22,7	21	1,7
P24	68/W	III	-	43+	lebend	33	27	6	27	19	8
P25	76/W	IV	+	65+	lebend	45	41	4	35,8	32	3,8
P26	72/W	II	-	45+	lebend	15,5	13,5	2	5,6	4,5	1,1
P27	37/W	IV	+	11	tot	72,2	60	12,2	15,9	11,2	4,7
P28	51/M	I	-	73+	lebend	49	29,5	19,5	28,5	22,5	6
P29	83/M	IV	+	8	tot	26,6	25,5	1,1	17,5	7,6	9,9
P30	70/W	II	-	74+	lebend	160	95	65	130	75	55
P31	57/M	IV	-	30+	lebend	15	11	4	8	6	2
P32	61/M	IV	-	53+	lebend	49	45	4	31,5	27,5	4
P33	66/M	II	-	25	tot	39	28	11	27	16	11
P34	63/M	IV	-	6	tot	20,5	18	2,5	10	8	2
P35	55/W	III	+	69+	lebend	20,2	15,2	5	14,5	11,5	3
P36	49/W	IV	-	53+	lebend	18,5	8,5	10	7	4	3
P37	48/W	II	-	37+	lebend	36	30	6	18,7	13,3	5,4
P38	57/M	IV	-	10	tot	28,9	26,5	2,4	16,5	14,7	1,8
P39	58/W	II	-	77+	lebend	58,1	45,1	13	36,1	25,1	11
P40	72/M	III	+	76+	lebend	117	79	38	95	66	29

- a** Alter bei Erstdiagnose in Jahren,
b +, positive T-Zell-Antwort gegen Ep-CAM, Her2/neu und/oder CEA,
c Überlebenszeit nach Erstdiagnose in Monaten,
d 10 HPF (high power fields) wurden jeweils gemittelt,
e gesamte Infiltration als Summe von stromaler und epithelialer Infiltration.

3.9 CD3⁺ und CD8⁺ T-Zell-Infiltration und das Überleben beim KRK

Ein Trend hin zu einem längeren Überleben wurde bei den Patienten mit einer höheren CD3⁺ T-Zell-Infiltration im Stroma gefunden ($p=0,07$). Nach einer Stadienkorrektur ließ sich dieser Unterschied allerdings nicht mehr nachweisen. Bezüglich einer hohen oder niedrigen CD3⁺ T-Zell-Infiltration in den epithelialen Bereichen war kein signifikanter Unterschied im Überleben festzustellen.

Ebenso war für die Patientengruppe mit einer höheren stromalen CD8⁺ T-Zell-Infiltration ein statistischer Trend zu einem längeren Überleben ersichtlich ($p = 0,06$). Dieser Trend zeigte sich jedoch nicht bei einer stadienkorrigierten Analyse ($p = 0,31$). Die Unterschiede sind in Abbildung 3.11 grafisch dargestellt.

3.10 CD3⁺ und CD8⁺ T-Zell-Infiltration und KRK-Stadium

Es waren Trends zu einer höheren CD3⁺ und CD8⁺ T-Zell-Infiltration bei den limitierten Stadien des KRK im Vergleich zu den metastasierten Stadien vorhanden. Diese Unterschiede waren allerdings nicht signifikant (epitheliale CD8⁺ T-Zell-Infiltration: $p=0,10$; stromale CD8⁺ T-Zell-Infiltration: $p=0,33$; epitheliale CD3⁺ T-Zell-Infiltration: $p=0,11$; stromale CD3⁺ T-Zell Infiltration: $p=0,09$).

3.11 Treg/CD3⁺ und Treg/CD8⁺ Quotienten und das Überleben beim KRK

In früheren Studien wurden zum Teil auch Quotienten zwischen den infiltrierenden Treg und CD8⁺ T-Zellen berechnet. Zum Vergleich wurde in dieser Arbeit ebenfalls nach Zusammenhängen zwischen dem Treg/CD3⁺- und dem Treg/CD8⁺-Quotienten und dem Überleben gesucht. Dabei konnten jedoch keine Zusammenhänge zwischen einem höheren oder niedrigeren Treg/CD3⁺-Quotienten bzw. Treg/CD8⁺-Quotienten und einem besseren Überleben festgestellt werden. So ließ sich diesbezüglich weder im Epithel noch im Stroma und weder vor noch nach Stadienkorrektur ein signifikanter Unterschied nachweisen.

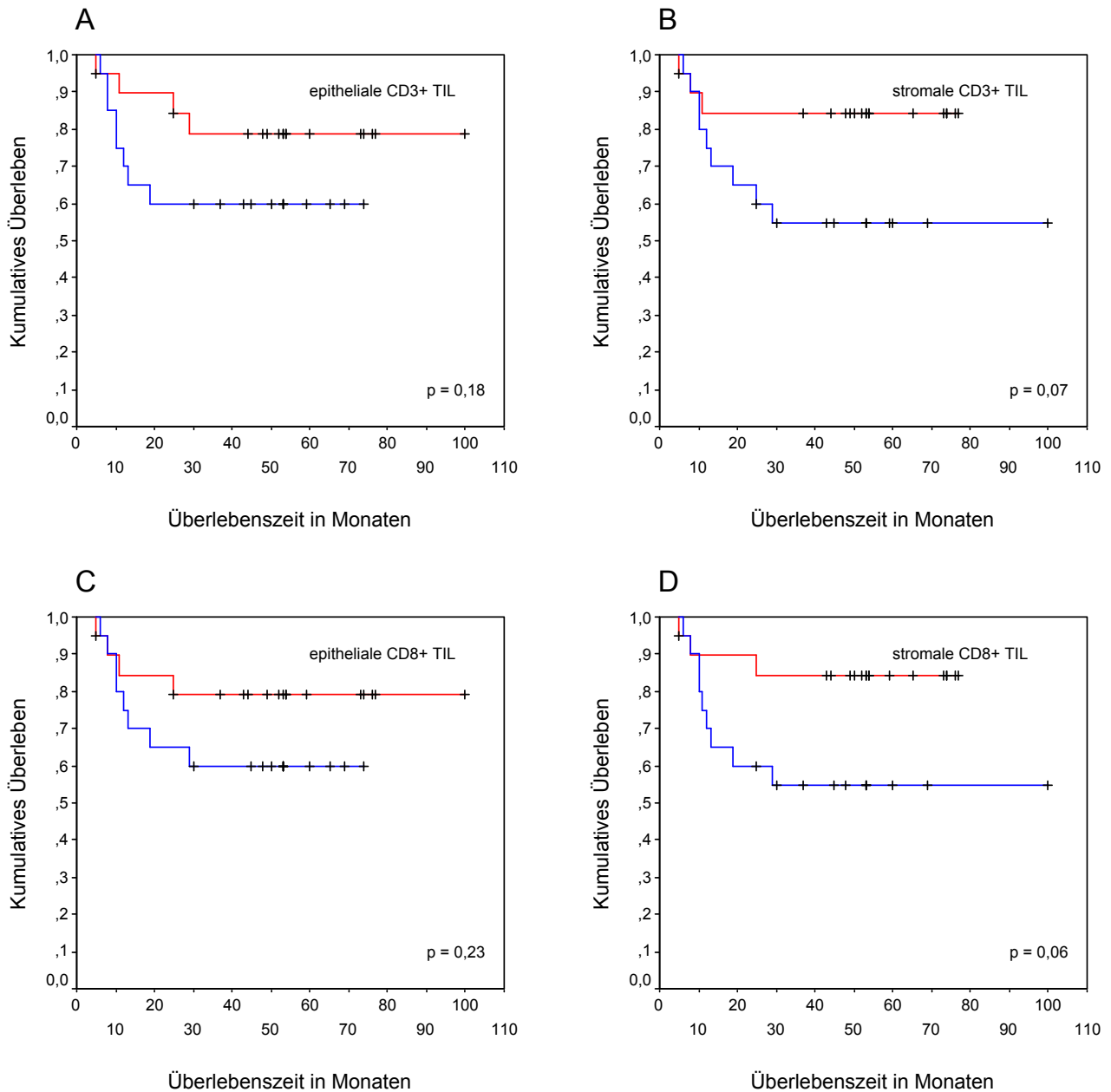
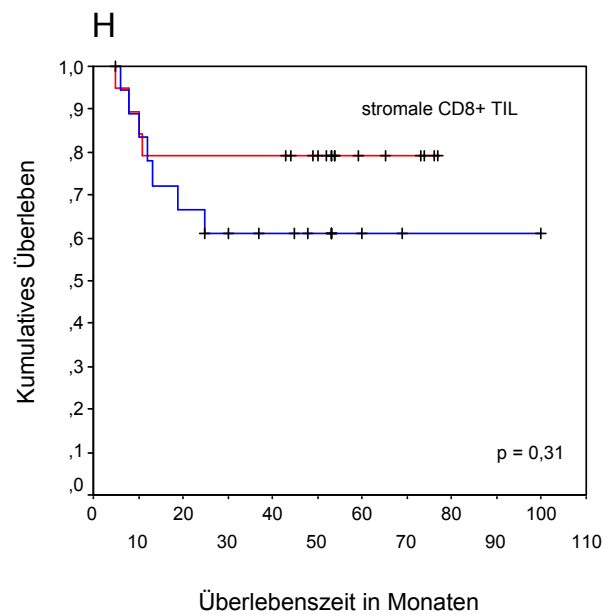
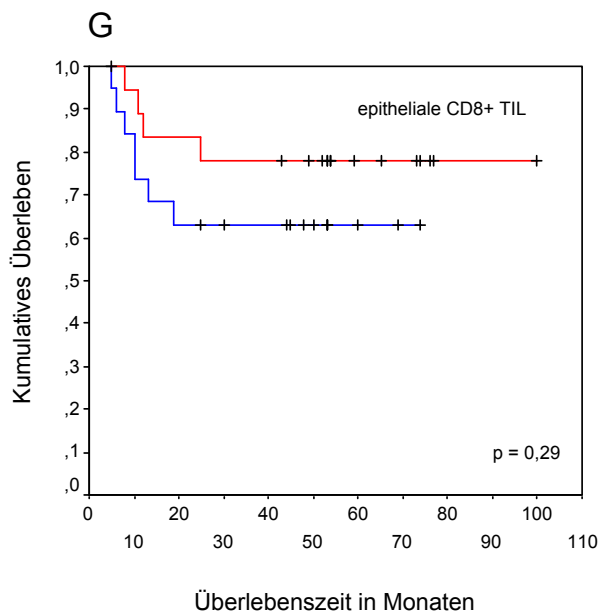
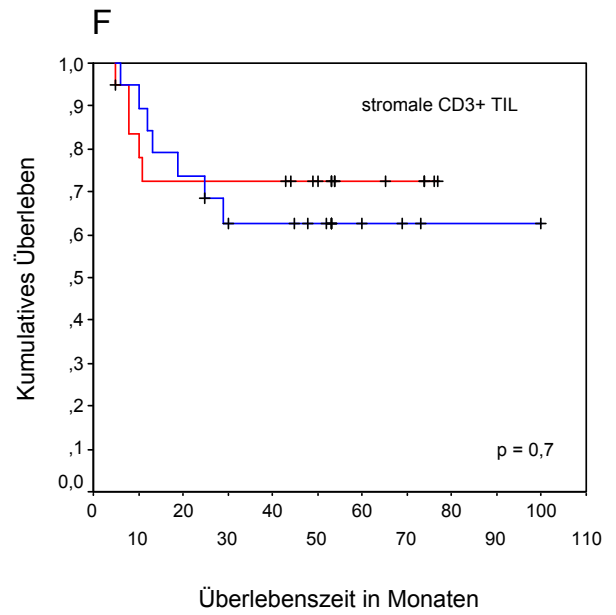
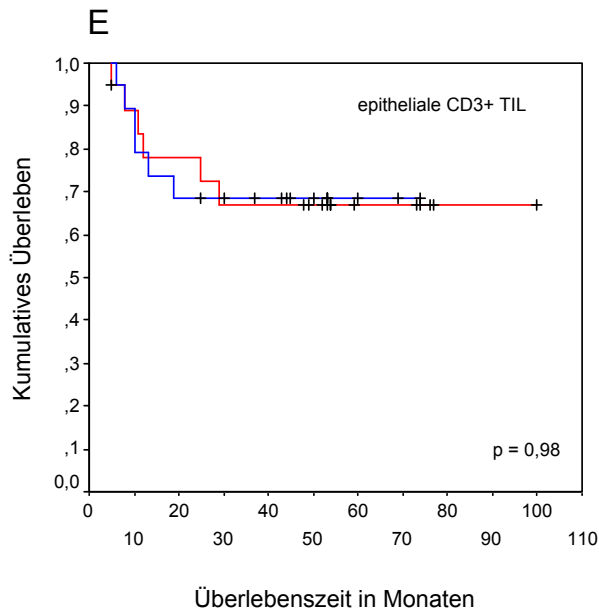


Abb. 3.11 Überlebensanalyse zur CD3⁺ und CD8⁺ T-Zell-Infiltration

Kaplan-Meier-Überlebens-Analyse von Patienten mit hoher (rot) und niedriger (blau) T-Zell-Infiltration. (A) bis (D) zeigen die Analyse ohne Berücksichtigung der verschiedenen KRK-Stadien. Bei (E) bis (H) wurde die Analysen stadienkoriert, indem die Zuordnung zur hohen oder niedrigen Infiltrationsgruppe für jedes KRK-Stadium einzeln erfolgte.



- (A) Epitheliale CD3⁺ T-Zell-Infiltration ohne Berücksichtigung der Stadien
 (B) Stromale CD3⁺ T-Zell-Infiltration ohne Berücksichtigung der Stadien
 (C) Epitheliale CD8⁺ T-Zell-Infiltration ohne Berücksichtigung der Stadien
 (D) Stromale CD8⁺ T-Zell-Infiltration ohne Berücksichtigung der Stadien
 (E) Epitheliale CD3⁺ T-Zell-Infiltration, stadienkorrigiert
 (F) Stromale CD3⁺ T-Zell-Infiltration, stadienkorrigiert
 (G) Epitheliale CD8⁺ T-Zell-Infiltration, stadienkorrigiert
 (H) Stromale CD8⁺ T-Zell-Infiltration, stadienkorrigiert

4 Diskussion

4.1 Infiltration des KRK durch regulatorische T-Zellen

4.1.1 Treg-Infiltration des gesunden Kolons, sowie des limitierten und metastasierten KRK

In der vorliegenden Arbeit wurde beim Vergleich von normalem Kolon und KRK eine signifikant erhöhte Gesamtinfiltration durch Treg im KRK gefunden. Dieses Ergebnis wurde inzwischen durch die Studie einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt, in welcher die FOXP3⁺ Treg-Infiltration im KRK mit der Infiltration in unauffälligen Kolonabschnitten derselben Patienten verglichen wurde (LING 2007). Im Rahmen einer Untersuchung von Clarke et al. wurden mesenteriale Lymphknoten von KRK-Patienten analysiert und eine erhöhte Frequenz von CD4⁺ CD25⁺ Treg in diesem Kompartiment verglichen mit Lymphknoten von CED-Patienten festgestellt (CLARKE 2006). Für andere Tumorentitäten lagen bereits zuvor Ergebnisse bezüglich der intratumoralen Infiltration durch Treg vor: So konnte eine Anreicherung von Treg in Kopf- und Halstumoren bereits gezeigt werden (ALBERS 2005). Eine signifikante Erhöhung der Treg-Zahlen im Tumor konnte ebenfalls für Magen- und Ösophaguskarzinome (ICHIHARA 2003) sowie für das Mammakarzinom (LIYANAGE 2002, BATES 2006) nachgewiesen werden. Neben dem Mammakarzinom untersuchten Liyanage et al. auch das Pankreaskarzinom und fanden auch hier eine verstärkte Ansammlung von CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen (LIYANAGE 2002). Curiel et al. beschrieben auch für das Ovarialkarzinom eine verstärkte Durchsetzung mit Treg (CURIEL 2004). Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelte Unterschied betrug eine um den Faktor 20 erhöhte Treg-Zellzahl im KRK beim Vergleich mit gesunder Kolonmukosa. Dieser Unterschied lässt sich sowohl beim separaten Vergleich des Tumorepithels mit dem gesunden Epithel als auch beim Vergleich des Tumorstromas mit der gesunden Lamina propria in etwa gleichem Ausmaß nachweisen. Ursachen und Folgen dieser erhöhten Treg-Zahlen im Tumor bleiben zunächst unklar.

In allen 40 KRK-Proben fand sich eine signifikant höhere Infiltration durch Treg im Tumorstroma als im Tumorepithel. Ebenso wurde bei der diesbezüglichen Untersuchung der gesunden Kontrollen eine höhere Zellzahl an Treg in der Lamina propria als im Epithel der Dickdarmmukosa festgestellt. Hierzu lagen bisher keine weiteren in-situ-Analysen mit differenzierter Untersuchung der verschiedenen Tumorteile hinsichtlich tumorinfiltrierenden Treg vor. Da das Verhältnis der Treg-Zahlen sowohl im gesunden Kolongewebe als auch im KRK zugunsten des Stromas ausfällt, kann man spekulieren, dass es sich wahrscheinlich nicht um ein Phänomen im Zusammenhang mit der KRK-Pathogenese handelt, sondern die Gründe hierfür eher in den physiologischen Eigenarten des jeweiligen Gewebes zu suchen sein könnten.

Bei Tumoren von Patienten mit limitierter Erkrankung (UICC I + II) wurde eine Infiltration auf etwa die doppelte Anzahl regulatorischer T-Zellen im Vergleich mit Tumoren von Patienten mit metastasierter Erkrankung (UICC III + IV) gefunden ($p = 0,04$). Mittels der Durchflusszytometrie untersuchten auch Ling et al. diesen Sachverhalt und stellten hingegen keinen statistisch signifikanten Unterschied fest. Es wurde sogar eher eine geringfügig höhere Treg-Zellzahl bei den späteren KRK-Stadien ermittelt (LING 2007). Auch Studien zu anderen Tumorentitäten kamen zu einem gegensätzlichen Ergebnis: Ichihara et al. stellten eine stärkere intratumorale Ansammlung $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen bei fortgeschrittenen Magen- und Ösophagealkarzinomen fest als bei frühen Stadien der Erkrankung (ICHIHARA 2003). Bei der Untersuchung des Ovarialkarzinoms hinsichtlich der Infiltration durch $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen ermittelten auch Curiel et al. eine höhere Frequenz in späteren Stadien (CURIEL 2004).

Eine Untersuchung zum kutanen T-Zell-Lymphom beschreibt wiederum ähnliche Verhältnisse wie wir sie für das KRK ermitteln konnten: Es wurde eine hochsignifikant stärkere Infiltration durch Treg in den niedrigen Stadien der Erkrankung festgestellt (GJERDRUM 2007). Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten, neben den unterschiedlichen Pathogenesemechanismen der verschiedenen Tumoren, durch zwei weitere Faktoren bedingt sein:

Erstens befinden sich unter der Population der CD4⁺ CD25⁺ Zellen, die von Ichihara und Curiel et al. ermittelt wurden, immer auch aktivierte Effektor-T-Zellen, da CD25 auch auf diesen Zellen exprimiert wird (ZOU 2006). Somit werden bei der Nutzung dieses Oberflächenmarkers immer auch andere Zellen miterfasst, was gerade in einem immunologisch aktiven Umfeld – wie dem eines Tumors – zu einem anderen Ergebnis führen kann.

Zweitens wurde durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete in-situ-Methode deutlich, dass die ausgeprägtere intratumorale Gesamt-Treg-Infiltration bei den limitierten Stadien hauptsächlich durch eine stärkere Treg-Anreicherung im Tumorstroma hervorgerufen wird. Bei der separaten Betrachtung der Treg-Zellzahlen im Epithel des Tumors ließ sich hingegen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Krankheitsstadiums nachweisen. Somit könnte diese Beobachtung durch den Einfluss der epithelialen Tumoranteile auf das Ergebnis verdeckt werden, wenn bei der Untersuchung keine separate Betrachtung der verschiedenen Tumoranteile erfolgt oder aufgrund der verwendeten Methode nicht möglich ist (wie z.B. bei der Durchflusszytometrie). Der Stellenwert einer differenzierten Untersuchung der verschiedenen Tumoranteile mittels in-situ-Analysen wird hierbei deutlich.

Die Ursache für die gemachte Beobachtung, dass bei den KRK-Patienten mit limitierter Erkrankung (UICC I + II) eine stärkere Tumordinfiltration durch Treg vorliegt, ist bislang unklar. Möglich wäre, dass bei der Metastasierung die Migration von Treg aus der primären Tumorlokalisierung eine Rolle spielt. So könnten die vorliegenden Daten dahingehend interpretiert werden, dass die lokale Treg-Infiltration bei malignen Erkrankungen möglicherweise einen dynamischen Prozess darstellt, bei dem es zunächst zu einer initialen Reaktion mit verstärkter Infiltration bei limitierter Erkrankung und nach der metastatischen Streuung zu einer relativen Abschwächung der Treg-Infiltration käme. Es bleibt abzuwarten, inwiefern sich bei zukünftigen Studien weitere Anhaltspunkte für diese Interpretation ergeben.

4.1.2 Treg-Infiltration und systemische T-Zell-Antwort beim KRK

Die durchschnittliche Infiltration durch Treg war bei Patienten ohne systemische TAA-spezifische T-Zell-Antwort etwas höher. Auch wenn diese Unterschiede nicht signifikant waren, könnte dies ein erster Hinweis auf eine T-Zell-Antwort-hemmende Rolle von tumorinfiltrierenden Treg beim KRK sein. In diesem Zusammenhang ist auch die schon beschriebene erhöhte Treg-Infiltration bei limitierter Erkrankung bemerkenswert, da systemische T-Zell-Antworten signifikant seltener in Patienten mit limitierter Erkrankung zu beobachten sind (NAGORSEN 2000 + 2003). Es wäre also möglich, dass eine indirekte Verbindung zwischen systemischer T-Zell-Antwort und Treg-Infiltration besteht. Zu bedenken ist dabei natürlich, dass die untersuchten T-Zell-Antworten gegen die TAA EpCAM, her-2/neu und CEA nur einen kleinen Anteil der möglichen Zielepitope für T-Zellen beim KRK darstellen.

Obwohl es bisher nur wenig Erkenntnisse über die Wirkung der Treg am Ort des Tumors auf die Ausbildung einer TAA-spezifischen systemischen Immunantwort gibt, wurde ein T-Zell-Antwort-hemmender Effekt durch Treg in der Peripherie bereits beschrieben. In einer anderen Studie wurden PBMC-Proben von 14 KRK-Patienten auf eine systemische T-Zell-Antwort gegen das TAA 5T4 untersucht – und zwar vor und nach einer Treg-Depletion: Während vorher bei 1/14 der Patienten eine 5T4-spezifische T-Zell-Antwort feststellbar war, konnte nach der Depletion der Treg-Population eine 5T4-Antwort in 5/14 der Patienten nachgewiesen werden. Bei der Verwendung von Kontrollantigenen war dieser „demaskierende“ Effekt nicht zu beobachten, ebenso wenig wie bei der gleichartigen Untersuchung gesunder Probanden auf eine 5T4-Antwort (CLARKE 2006). TAA-spezifische Treg konnten auch schon gegen LAGE-1 und ARTC-1 nachgewiesen werden (WANG 2004 + 2005). Auch wenn der genaue Mechanismus der Induktion TAA-spezifischer Treg bislang unklar bleibt, findet dieser Prozess wahrscheinlich am Ort des Tumors oder in den drainierenden Lymphknoten statt (ZOU 2006) und könnte im weiteren Verlauf zur Unterbindung einer systemischen TAA-spezifischen T-Zellantwort führen.

4.1.3 Treg-Infiltration und Überleben beim KRK

Um mögliche Zusammenhänge zwischen der Treg-Infiltration und dem Überleben zu untersuchen, war eine stadienkorrigierte Analyse notwendig, da bekanntermaßen das Tumorstadium mit dem Überleben korreliert. Es konnte allerdings weder mit noch ohne Stadienkorrektur ein Zusammenhang zwischen der Gesamt-Treg-Infiltration und dem Überleben gefunden werden. In einer deskriptiven post-hoc-Analyse war jedoch ein signifikant verbessertes Überleben für Patienten mit einer hohen epithelialen Treg-Infiltration nach Stadienkorrektur zu vermerken. Aufgrund des mehrfachen Testens und der kleinen Zahlen epithelialer Treg sollte diese Teilmengen-Analyse allerdings nicht überinterpretiert und mit Vorsicht betrachtet werden.

Geht man von der Annahme aus, dass eine hohe Treg-Infiltration die Anti-Tumor-Immunität verringert und auf diesem Weg auch das Überleben, wie es z.B. für das Ovarialkarzinom gezeigt werden konnte (CURIEL 2004, SATO 2005, WOLF 2005), so passen unsere Ergebnisse zunächst nicht in das allgemeine Bild. Es wurden jedoch bereits zuvor über gegensätzliche Ergebnisse für verschiedene Neoplasien berichtet. Erdmann et al. haben gezeigt, dass die Entwicklung von bakteriell-induzierten Kolonkarzinomen durch die adoptive Gabe von Treg verhindert werden kann (ERDMAN 2003 a + b). In einer Studie zum humanen Hodgkin Lymphom wurde festgestellt, dass eine schwächere Infiltration durch FOXP3⁺ Treg mit einem schlechteren klinischen Verlauf korreliert (ALVARO 2005). Auch für das folliculäre Lymphom wurde gezeigt, dass eine hohe Zahl an tumor-infiltrierenden Treg mit einem verbesserten Überleben einhergeht (CARRERAS 2006). Gjerdrum und seine Kollegen fanden bei Patienten mit kutanem T-Zell-Lymphom ebenfalls eine positive Korrelation zwischen intratumoraler Treg-Infiltration und dem Überleben (GJERDRUM 2007). Da angenommen wird, dass das Fortschreiten maligner Veränderungen durch ein aggressives, zytotoxisches und potenziell proliferationsförderndes Zytokinmilieu begünstigt wird (WHITESIDE 2006, LU 2006), könnten tumor-infiltrierende Treg bei einigen malignen Erkrankungen – bis jetzt vorzugsweise lymphoproliferative oder bakteriell induzierte – einen protektiven Effekt haben, indem sie der Ausbildung einer solchen entzündlichen Umgebung entgegenwirken. Pagès et al. haben zuvor schon FOXP3 auf RNA-Level in KRK-Proben gemessen und konnten – im Einklang mit unseren Ergebnissen – ebenfalls keine

Unterschiede im Überleben beim Vergleich von hoher und niedriger FOXP3-Expression finden (PAGÈS 2005).

4.1.4 Zusammenhänge zwischen Treg- und CD3⁺ sowie CD8⁺ Infiltration

Die beobachteten schwach positiven Korrelationen zwischen der Treg und der CD3⁺ Infiltration, die sowohl im Epithel als auch im Stroma des Tumors auftraten, sind sicherlich kein überraschendes Ergebnis. Sie reflektieren wahrscheinlich in erster Linie die Beobachtung, dass Treg einen erheblichen Anteil an der Gesamtpopulation der intratumoralen CD3⁺ Zellen haben (CURIEL 2004, YU 2005, KO 2005).

In den epithelialen Anteilen des Tumors war außerdem eine schwach positive Korrelation zwischen der Infiltration durch Treg und CD8⁺ T-Zellen nachweisbar. Positive Korrelationen zwischen diesen beiden Subpopulationen tumorinfiltrierender Lymphozyten sind bereits beschrieben (SATO 2005). Generell lässt sich sagen, dass die aus den vorliegenden Ergebnissen ermittelten Korrelationen nur schwach sind und somit eine weiterführende Interpretation nicht sinnvoll erscheint. Es ist bekannt, dass das Umfeld eines Tumors chemotaktische Zytokine enthält, welche die Einwanderung einer Vielzahl unterschiedlicher Lymphozytenpopulationen fördern – darunter auch CD8⁺ T-Zellen.

4.2 CD3⁺ und CD8⁺ T-Zell-Infiltration des KRK

4.2.1 CD3⁺ und CD8⁺ T-Zell-Infiltration beim KRK und beim gesunden Kolon

Eine signifikant erhöhte Gesamtinfiltration durch CD8⁺ T-Zellen im KRK gegenüber gesundem Kolongewebe wurde in unserer Studie nachgewiesen. Dies bestätigt die Ergebnisse einiger bereits zuvor durchgeführter Studien, in welchen eine CD8⁺ Infiltration des KRK festgestellt wurde – allerdings ohne dass hierbei ein direkter Vergleich zu gesunden Kolonproben durchgeführt wurde (BALCH 1990, NAITO 1998, OBERG 2002, FUNDADA 2003). In einer weiteren Studie zum KRK, in der die CD8⁺ Infiltration auch für gesunde Kolonabschnitte ermittelt wurde, konnte dieser Unterschied nicht nachgewiesen werden. Als gesunde Kontrollen wurde dort allerdings Dickdarmschleimhaut aus den mit dem Tumor resezierten gesunden Kolonabschnitten gewonnen. Überdies zeigte sich bei der Untersuchung, dass zumindest die Anzahl der aktivierten CD8⁺ T-Zellen mit zytotoxischer Aktivität im Tumor höher war als in den angrenzenden Darmabschnitten mit histologisch unauffälliger Morphologie (KOCH 2006).

Durch den in-situ-Ansatz dieser Arbeit wurde weiterhin deutlich, dass dieser Unterschied zwischen KRK und gesunder Kolonmukosa in einer erhöhten stromalen CD8⁺ Infiltration des Tumors begründet ist, während in den epithelialen Bereichen kein Unterschied zwischen Tumor- und normalem Kolongewebe zu verzeichnen war.

Beim Vergleich des Verteilungsmusters der CD8⁺ T-Zellen in der gesunden Kolonmukosa und im KRK wurden bei unseren Untersuchungen interessanterweise gegensätzliche Verhältnisse festgestellt: Im gesunden Kolon war die Mehrheit der CD8⁺ T-Zellen im Epithel lokalisiert und im KRK überwog die Infiltration des Stromas. Dies steht in Übereinstimmung mit dem Ergebnis von Naito et al., die bei ihrer Untersuchung des KRK hinsichtlich der Infiltration durch CD8⁺ T-Zellen ebenfalls eine höhere Zellzahl im Stroma als im Tumorepithel feststellten. Ein Vergleich mit normalem Kolongewebe wurde in diesem Fall aber nicht durchgeführt, so dass sich lediglich eine Aussage zur Verteilung zwischen stromalen und epithelialen Tumorbereichen, nicht aber zu dem aufgetretenen Unterschied zur gesunden Kolonmukosa, treffen lässt (NAITO 1998).

Auch bei der Analyse der CD3⁺ Infiltration ergab sich eine höhere Gesamtinfiltration im KRK als im gesunden Kolon, die wiederum auf einer höheren Stromalen Infiltration beruht.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass zwar eine erhöhte Anzahl von CD3⁺ sowie CD8⁺ Lymphozyten im Umfeld des Tumors vorliegen, der Zugang zu den epithelialen Tumoranteilen und somit auch der direkte Zellkontakt zu den Tumorzellen für die TIL jedoch erschwert sein könnte. Dieser Umstand könnte dazu beitragen, dass trotz der Anwesenheit aktivierter zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen (KOCH 2006) eine effektive Eradikation der Tumorzellen durch T-Zell-Effektorfunktionen ausbleibt. Als Ursache für diese erschwerte Zugänglichkeit der epithelialen Tumoranteile und den verminderten Tumorzell-T-Zell-Kontakt kommen verschiedene Erklärungsmodelle bzw. deren Kombination in Frage:

KRK scheinen um die epithelialen Bereiche zum Teil eine Basalmembran-ähnliche Struktur auszubilden, welche den direkten Kontakt zwischen Leukozyten und Tumorzellen verhindert (HAGENAARS 2000). Menon et al. zeigten, dass in etwa der Hälfte der von ihnen untersuchten KRK-Proben solch eine Basalmembran-ähnliche Struktur vorlag. Darüber hinaus stellten sie fest, dass das Vorhandensein dieser Struktur mit der epithelialen Infiltration durch CD8⁺ T-Zellen invers korreliert (MENON 2003 + 2004).

Weiterhin könnte auch die Produktion von FAS-L, IL-10 oder TGF- β durch die Tumorzellen die verminderte T-Zell-Infiltration in den epithelialen Bereichen erklären (O'CONNELL 1998, ROBSON 1996, WOJTOVICZ-PRAGA 1997).

Auch eine Herabregulation der Integrine β 1 und β 2 bei T-Lymphozyten in der Umgebung des Tumors könnte eine Ursache sein, da die Bindungsfähigkeit der TIL an die Tumorzellen dadurch eingeschränkt ist. Was genau die verminderte Expression dieser Integrine auslöst, konnte bislang nicht ermittelt werden (KITAYAMA 1999).

Eine Vielzahl weiterer Escape-Mechanismen kommt als Ursache für die verminderte epitheliale Infiltration in Frage. Welche davon tatsächlich zutreffen und ob man diese Erkenntnisse therapeutisch nutzen kann, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

4.2.2 CD3⁺ und CD8⁺ T-Zell-Infiltration und das KRK-Stadium

Verschiedene Studien zum KRK haben bereits einen Zusammenhang zwischen der intratumoralen Infiltration durch CD8⁺ und CD3⁺ Lymphozyten und dem KRK-Stadium festgestellt (ROPPONEN 1997, NAITO 1998, CHIBA 2004). Im Einklang mit diesen Studien waren im Rahmen der vorliegenden Arbeit Trends zu einer höheren CD3⁺ und CD8⁺ Infiltration bei den niedrigeren KRK-Stadien feststellbar – allerdings ohne das Signifikanzniveau zu erreichen. Die inverse Korrelation der tumorinfiltrierenden CD8⁺ T-Zellen mit dem Tumorstadium ist insbesondere Gegenstand von Diskussionen, da immer noch unklar ist, ob es sich bei der des Öfteren beobachteten Korrelation zwischen der Anzahl intratumoraler CD8⁺ T-Zellen und einer besseren Prognose nicht vielmehr um ein Epiphänomen – verursacht durch die begünstigten pathomorphologischen Merkmale des jeweiligen Tumorstadiums – handelt (KOCH 2006).

4.2.3 CD3⁺ und CD8⁺ T-Zell-Infiltration und das Überleben beim KRK

Da die Tumorinfiltration durch CD8⁺ T-Zellen bereits in mehreren Studien zum KRK als ein positiver prognostischer Faktor beschrieben wurde (ROPPONEN 1997, NAITO 1998, OBERG 2002, DIEDERICHSEN 2003, FUNADA 2003, CHIBA 2004, PAGÈS 2005), ist im Rahmen dieser Arbeit auch die CD8⁺ T-Zell-Infiltration auf Zusammenhänge mit dem Überleben geprüft worden. Es war hierbei in Übereinstimmung mit den genannten Studien ein Trend zu einem besseren Überleben bei Patienten mit einer stärkeren CD8⁺ Infiltration im Stroma nachweisbar. Da bekanntermaßen das Stadium mit dem Überleben korreliert und eine Korrelation der CD8⁺ T-Zell-Infiltration mit dem Stadium für das KRK ebenfalls vorbeschrieben ist (NAITO 1998, KOCH 2006, CHIBA 2004), führten wir zusätzlich eine Stadienkorrektur durch. Der beschriebene Trend war bei dieser stadienkorrigierten Analyse nicht mehr nachweisbar.

Ebenso gab es einen Trend zu einem besseren Überleben bei Patienten mit einer hohen stromalen CD3⁺ Infiltration. Bei einer stadienkorrigierten Analyse trat dieser Unterschied wiederum nicht in Erscheinung.

Ein statistischer Zusammenhang des Überlebens mit der Stromalen CD3⁺ und CD8⁺ Infiltration ist sicherlich aufgrund der vorliegenden Ergebnisse und der vorangehenden Studien anzunehmen. Möglicherweise kommt dieser Zusammenhang aber nur durch die erhöhten Zahlen CD8⁺ tumorinfiltrierender T-Zellen bei den niedrigeren Stadien der Erkrankung zustande. Da sowohl das Krankheitsstadium als auch die Infiltration durch CD8⁺ T-Zellen mit einem besseren Überleben assoziiert sind, lässt sich aus dem Ergebnis keine direkte Kausalität ableiten. Somit sollte in weiteren Untersuchungen zum Einfluss von TIL auf das Überleben bedacht werden, dass die Infiltration bei niedrigeren Stadien der Erkrankung höher sein könnte.

Um unsere Daten mit einer Studie zum Ovarialkarzinom vergleichen zu können, in welcher der Einfluss von Quotienten aus Treg und CD8⁺ T-Zellen auf das Überleben analysiert wurde (SATO 2005), untersuchten wir ebenfalls den Einfluss des Treg/CD8⁺ Quotienten auf das Überleben. Dabei fanden wir im Gegensatz zu der betreffenden Ovarialkarzinom-Studie keinen Zusammenhang. Dieser Unterschied zwischen den Ergebnissen beim Ovarialkarzinom und beim KRK könnte eventuell durch die spezifischen biologischen Charakteristika der Tumoren zustande kommen, die z.B. auch zu einer vorzugsweise lokalen Streuung beim Ovarialkarzinom und einer höheren Tendenz zur systemischen Metastasierung beim KRK beitragen.

4.3 Schlussfolgerungen

Die in-situ-Analyse in dieser Arbeit demonstriert eine deutlich erhöhte Infiltration von Treg beim KRK verglichen mit normaler Dickdarm-Mukosa. Außerdem konnte eine überwiegende Präsenz der Treg im Stroma des KRK gezeigt werden. Darüber hinaus wurde aufgezeigt, dass speziell in den limitierten Stadien des KRK die Treg-Infiltration in stärkerem Ausmaß vorliegt. Anhand der Ergebnisse lässt sich die Treg-Infiltration als ein dynamischer Prozess interpretieren, in welchem die Zahl der intratumoralen Treg in den frühen Stadien zunächst zunimmt und dann bei fortgeschrittener Erkrankung wieder abfällt.

Treg werden als Hindernis bei der Generierung einer klinisch erfolgreichen tumorgerichteten T-Zell-Antwort diskutiert. Besonders im Zusammenhang mit Versuchen zur aktiven Antigen-spezifischen Immunisierung und dem adoptiven Transfer von T-Zellen bei Krebspatienten könnten sie ein limitierender Faktor sein (ROSENBERG 2004). Unsere Daten können diese Annahme nicht direkt bestätigen. Lediglich indirekte Verbindungen zwischen der Ausbildung einer T-Zell-Antwort und der Treg-Infiltration lassen sich herstellen: Erstens ist die Treg-Infiltration höher bei Patienten ohne eine systemische TAA-spezifische T-Zell-Antwort auf einem nichtsignifikanten Niveau. Zweitens ist die Treg-Infiltration höher bei Patienten in limitierten Stadien, in welchen wiederum auch T-Zell-Antworten seltener zu beobachten sind. Dies kann lediglich als ein Anfang zu einem fundierten Verständnis über die Zusammenhänge zwischen tumorinfiltrierenden Treg, dem Krankheitsstadium und der Generierung einer systemischen TAA-spezifischen T-Zell-Antwort angesehen werden. Weitere Untersuchungen müssen erfolgen, um dieses Verständnis auszubauen.

Es wird außerdem deutlich, dass jede maligne Erkrankung ihre Spezifika – den Einfluss von Treg auf das Überleben betreffend – zu haben scheint. Die Schlussfolgerung hieraus ist, dass eine vorsichtige Herangehensweise bei der Einflussnahme auf das balancierte System von Treg und CD8⁺ T-Zellen durch Immun- und Chemotherapie für jede einzelne Tumorentität geboten ist.

Zu der laufenden Diskussion über die Wirksamkeit tumorinfiltrierender CD8⁺ T-Zellen konnte durch den in-situ-Ansatz dieser Arbeit beigetragen werden, dass zwar eine erhöhte Infiltration im KRK gegenüber gesundem Kolongewebe feststellbar ist, die epithelialen Anteile von diesem Effekt aber weitgehend ausgeschlossen bleiben. Die genauen Gründe für das Phänomen sowie die Möglichkeit einer klinischen Relevanz bleiben jedoch in weiten Teilen ungeklärt und geben Anlass zu weiteren diesbezüglichen Analysen.

Eine höhere Infiltration durch CD3⁺ und CD8⁺ T-Zellen in den niedrigeren KRK-Stadien, wie sie in zahlreichen anderen Studien beobachtet wurde, konnte mit der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Darüber hinaus wurde im Rahmen dieser Arbeit deutlich, dass es sich bei dem bereits zuvor beschriebenen Zusammenhang zwischen einer hohen CD8⁺ T-Zell-Infiltration im Tumorstroma und einer besseren Prognose eventuell nur um ein Epiphänomen – bedingt durch die bevorzugten pathomorphologischen Merkmale des jeweiligen Krankheitsstadiums – handeln könnte. Es sollte somit bei der weiteren Untersuchung der Zusammenhänge zwischen tumorinfiltrierenden CD8⁺ T-Zellen und dem Überleben nach Möglichkeit der gleichzeitige Einfluss des Tumorstadiums auf die Ergebnisse minimiert werden, wie es z.B. in der vorliegenden Arbeit durch eine Stadienkorrektur demonstriert wurde.

5 Zusammenfassung

Das Immunsystem ist grundsätzlich in der Lage, TAA-spezifische T-Zell-Antworten bei Patienten mit bösartigen Tumorerkrankungen zu generieren. Entsprechende tumorreaktive T-Zellen konnten bereits im unstimulierten, peripheren Blut von Patienten mit verschiedenen malignen Erkrankungen nachgewiesen werden. Allerdings konnte weder für spontane noch für durch Vakzine induzierte TAA-spezifische T-Zell-Antworten bei Patienten mit kolorektalem Karzinom (KRK) eine klinische Wirksamkeit gezeigt werden. Für dieses klinische Versagen der eigentlich gegen den Tumor gerichteten Immunantworten werden viele Ursachen diskutiert. Eine dieser Ursachen könnte in der immunsuppressiven Wirkung tumorinfiltrierender regulatorischer T-Zellen (Treg) begründet sein. In der vorliegenden Arbeit wird die Infiltration des KRK durch FOXP3⁺ Treg sowie durch CD3⁺ und CD8⁺ T-Zellen untersucht. Es wurde dabei der Zusammenhang zwischen diesen infiltrierenden Zellen, einer systemischen TAA-spezifischen T-Zell-Antwort, dem Krankheitsstadium und dem Überleben geprüft.

Um die Treg mikroskopisch spezifisch identifizieren zu können, wurde die immunhistochemische Färbung des Transkriptionsfaktors „forkhead box P3“ (FOXP3) angewandt. Für die immunhistochemische Doppelfärbung von CD3 und FOXP3 wurde zunächst die Färbung des FOXP3-Proteins nach der polymerbasierten Peroxidase-Methode und anschließend die Membranfärbung von CD3 nach der APAAP-Methode durchgeführt. Ebenso wurde für die Färbung von CD8 die APAAP-Methode benutzt. Die Zellen wurden in jeweils 10 zufällig ausgewählten High Power Fields (1 HPF = 0,237mm²) manuell ausgezählt und gemittelt. Hierbei wurden die stromalen und epithelialen Anteile separat ausgewertet. Da das Stadium des KRK einen wesentlichen prognostischen Faktor darstellt, wurde für die Überlebensanalysen zusätzlich eine Stadienkorrektur durchgeführt.

In allen 40 KRK-Proben wurde eine signifikant höhere Infiltration durch Treg gefunden als in den 12 Proben gesunder Kolonmukosa. Der hierbei ermittelte Unterschied war gleichermaßen im Epithel als auch im Tumorstroma/Lamina propria nachweisbar und betrug eine etwa um den Faktor 20 erhöhte Treg-Zellzahl im KRK. Die Infiltration im Stroma des KRK übertraf signifikant die Infiltration in den epithelialen Anteilen, wobei sich das gleiche Verteilungsmuster auch beim gesunden Kolongewebe zeigte. Des Weiteren war die Treg-Infiltration des KRK signifikant stärker bei den limitierten Stadien UICC I und UICC II als bei den metastasierten Stadien UICC III und IV (15,6/HPF

gegenüber 9,9/HPF, $p = 0,04$). Bei Patienten *ohne* eine systemische TAA-spezifische T-Zell-Antwort war die durchschnittliche Infiltration durch Treg etwas stärker ausgeprägt als bei Patienten *mit* einer entsprechenden T-Zell-Antwort (14,1/HPF gegenüber 9,6/HPF, $p = 0,16$). Auch wenn dieser Unterschied nicht signifikant war, könnte dies ein erster Hinweis auf eine T-Zell-Antwort-hemmende Rolle von tumorinfiltrierenden Treg beim KRK sein. Bezüglich des Überlebens gab es keinen Unterschied zwischen einer starken und einer schwachen Treg-Infiltration.

Auch die Untersuchung des KRK auf CD3⁺ und CD8⁺ T-Zellen ergab eine signifikant stärkere Infiltration im Vergleich zu gesundem Kolongewebe. Dieser Unterschied basierte fast ausschließlich auf einer stärkeren Stromalen Infiltration des Tumors. Ein Trend zu einem besseren Überleben war bei Patienten mit einer hohen CD3⁺ und auch CD8⁺ Infiltration im Stroma des KRK feststellbar. Nach der Durchführung einer stadienkorrigierten Analyse trat dieser Unterschied allerdings nicht mehr auf, so dass es sich möglicherweise nur um ein Epiphänomen – bedingt durch die bevorzugten pathomorphologischen Merkmale des jeweiligen Krankheitsstadiums – handeln könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine direkte Verbindung zwischen der Tumorinfiltration durch Treg und der Ausbildung einer TAA-spezifischen T-Zell-Antwort nicht belegt werden kann. Allerdings war eine signifikant erhöhte Treg-Infiltration bei den limitierten Stadien der Erkrankung zu verzeichnen, in denen wiederum eine systemische TAA-spezifische T-Zell-Antwort seltener zu beobachten ist. Weitere Untersuchungen hinsichtlich eines möglichen Einflusses tumorinfiltrierender Treg auf die Ausbildung spontaner T-Zell-Antworten sind nötig, um die vorliegenden Ergebnisse und deren Relevanz im Hinblick auf die Entwicklung zukünftiger Vakzinierungs-strategien richtig einzuordnen.

6 Literaturverzeichnis

- Aarnoudse CA, van den Doel PB, Heemskerk B, Schrier PI (1999):
Interleukin-2-induced, melanoma-specific T cells recognize CAMEL, an
unexpected translation product of LAGE-1.
Int J Cancer. 30;82(3):442-8.
- Albers AE, Ferris RL, Kim GG, Chikamatsu K, DeLeo AB, Whiteside TL (2005):
Immune responses to p53 in patients with cancer: enrichment in tetramer+ p53
peptide-specific T cells and regulatory T cells at tumor sites.
Cancer Immunol Immunother. 54(11):1072-81.
- Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N (1998):
Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted
CTLs.
Nature. 5;392(6671):86-9.
- Altman JD, Moss PA, Goulder PJ et al. (1996):
Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes.
Science. 4;274(5284):94-6.
- Alvaro T, Lejeune M, Salvadó MT et al. (2005):
Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of
accompanying cytotoxic and regulatory T cells.
Clin Cancer Res. 15;11(4):1467-73.
- Andersson U, Halldén G, Persson U, Hed J, Möller G, DeLey M (1988):
Enumeration of IFN-gamma-producing cells by flow cytometry. Comparison with
fluorescence microscopy.
J Immunol Methods. 9;112(1):139-42.
- André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L et al. (2004):
Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer.
N Engl J Med. 3;350(23):2343-51.
- Anichini A, Maccalli C, Mortarini R et al. (1993):
Melanoma cells and normal melanocytes share antigens recognized by HLA-A2-
restricted cytotoxic T cell clones from melanoma patients.
J Exp Med. 1;177(4):989-98.
- Antony PA, Piccirillo CA, Akpınarli A et al. (2005):
CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T
helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells.
J Immunol. 1;174(5):2591-601.
- Arosarena OA, Baranwal S, Strome S et al. (1999):
Expression of major histocompatibility complex antigens in squamous cell
carcinomas of the head and neck: effects of interferon gene transfer.
Otolaryngol Head Neck Surg. 120(5):665-71.

- Atkins MB, Robertson M, Gordon MS et al. (1996):
Phase I evaluation of intravenous recombinant human IL-12 in patients with advanced malignancies. Proceedings of ASCO.
Journal of Clinical Oncology, 15, Abstract No. 718.
- Aulitzky W, Gastl G, Aulitzky WE et al. (1989):
Successful treatment of metastatic renal cell carcinoma with a biologically active dose of recombinant interferon-gamma.
J Clin Oncol. 7(12):1875-84.
- Balch CM, Riley LB, Bae YJ et al. (1990):
Patterns of human tumor-infiltrating lymphocytes in 120 human cancers.
Arch Surg. 125(2):200-5.
- Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, Banham AH (2006):
Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse.
J Clin Oncol. 1;24(34):5373-80.
- Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR (1998):
Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling.
Nature. 4;393(6684):478-80.
- Bieganowska K, Höllsberg P, Buckle GJ et al. (1999):
Direct analysis of viral-specific CD8+ T cells with soluble HLA-A2/Tax11-19 tetramer complexes in patients with human T cell lymphotropic virus-associated myelopathy.
J Immunol. 1;162(3):1765-71.
- Boël P, Wildmann C, Sensi ML et al. (1995):
BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes.
Immunity. 2(2):167-75.
- Boon T, van der Bruggen P (1996):
Human tumor antigens recognized by T lymphocytes.
J Exp Med.1;183(3):725-9.
- Boon T, Coulie PG, van den Eynde B (1997):
Tumor antigens recognized by T cells.
Immunol Today.18(6):267-8.
- Bromberg JF, Horvath CM, Wen Z, Schreiber RD, Darnell JE (1996):
Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma.
Proc Natl Acad Sci U S A. 23;93(15):7673-8.

- Brosterhus H, Brings S, Leyendeckers H et al. (1999):
Enrichment and detection of live antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T cells based on cytokine secretion.
Eur J Immunol. 29(12):4053-9.
- Callan MF, Tan L, Annels N et al. (1998):
Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo.
J Exp Med. 4;187(9):1395-402.
- Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC et al. (2006):
High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma.
Blood. 1;108(9):2957-64.
- Cattoretti G, Pileri S, Parravicini C et al. (1993):
Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections.
J Pathol. 171(2):83-98.
- Chiba T, Ohtani H, Mizoi T et al. (2004):
Intraepithelial CD8+ T-cell-count becomes a prognostic factor after a longer follow-up period in human colorectal carcinoma: possible association with suppression of micrometastasis.
Br J Cancer. 1;91(9):1711-7.
- Choi BK, Bae JS, Choi EM, Kang WJ, Sakaguchi S, Vinay DS, Kwon BS (2004):
4-1BB-dependent inhibition of immunosuppression by activated CD4+CD25+ T cells.
J Leukoc Biol. 75(5):785-91.
- Clarke SL, Betts GJ, Plant A et al. (2006):
CD4CD25FOXP3 Regulatory T Cells Suppress Anti-Tumor Immune Responses in Patients with Colorectal Cancer.
PLoS ONE. 27;1:e129.
- Colacchio TA, Niedzwiecki D, Compton C et al. (2004):
Phase III trial of adjuvant immunotherapy with MOAb 17-1A following resection for stage II adenocarcinoma of the colon (CALGB 9581).
Journal of Clinical Oncology, ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). Vol 22, No 14S (July 15 Supplement), 2004: 3522.
- Colucci G, Gebbia V, Paoletti G et al. (2005):
Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale.
J Clin Oncol. 1;23(22):4866-75.

- Cordell JL, Falini B, Erber WN et al. (1984):
Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes).
J Histochem Cytochem. 32(2):219-29.
- Corman JM, Sercarz EE, Nanda NK (1998):
Recognition of prostate-specific antigenic peptide determinants by human CD4 and CD8 T cells.
Clin Exp Immunol. 114(2):166-72.
- Coulie PG, Brichard V, van Pel A et al. (1994):
A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas.
J Exp Med. 1;180(1):35-42.
- Coulie PG, Ikeda H, Baurain JF, Chiari R (1999):
Antitumor immunity at work in a melanoma patient.
Adv Cancer Res. 76:213-42.
- Cunningham D, Humblet Y, Siena S et al. (2004):
Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer.
N Engl J Med. 22;351(4):337-45.
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L et al. (2004):
Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival.
Nat Med. 10(9):942-9.
- Czerkinsky C, Andersson G, Ekre HP, Nilsson LA, Klareskog L, Ouchterlony O (1988):
Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells.
J Immunol Methods. 25;110(1):29-36.
- De la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A (2004):
Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function.
Eur J Immunol. 34(9):2480-8.
- Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (2004):
Kolorektales Karzinom – Leitlinien.
AWMF-Leitlinien-Register Nr. 021/007.
- Diederichsen AC, Hjelmberg JB, Christensen PB, Zeuthen J, Fenger C (2003):
Prognostic value of the CD4+/CD8+ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells.
Cancer Immunol Immunother. 52(7):423-8.

- Díaz Rubio E, Tabernero J, Van Cutsem E et al. (2005):
 Cetuximab in combination with oxaliplatin/5-fluorouracil (5-FU)/folinic acid (FA) (FOLFOX-4) in the first-line treatment of patients with epidermal growth factor receptor (EGFR)-expressing metastatic colorectal cancer: An international phase II study.
 Journal of Clinical Oncology, ASCO Annual Meeting Proceedings. Vol 23, No. 16S, Part I of II (June 1 Supplement), 2005: 3535
- Di Fabio S, Mbawuiké IN, Kiyono H, Fujihashi K, Couch RB, McGhee JR (1994):
 Quantitation of human influenza virus-specific cytotoxic T lymphocytes: correlation of cytotoxicity and increased numbers of IFN-gamma producing CD8+ T cells.
 Int Immunol. 6(1):11-9.
- Dobrzanski MJ, Reome JB, Dutton RW (2000):
 Type 1 and type 2 CD8+ effector T cell subpopulations promote long-term tumor immunity and protection to progressively growing tumor.
 J Immunol. 15;164(2):916-25.
- Douillard JY, Cunningham D, Roth AD et al. (2000):
 Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial.
 Lancet. 25;355(9209):1041-7.
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004):
 The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting.
 Immunity. 21(2):137-48.
- Dunnion DJ, Cywinski AL, Tucker VC et al. (1999):
 Human antigen-presenting cell/tumour cell hybrids stimulate strong allogeneic responses and present tumour-associated antigens to cytotoxic T cells in vitro.
 Immunology. 98(4):541-50.
- Ehrlich, P (1909):
 Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung.
 Nederlandsch Tijdschrift voor Geneeskunde; Eerste Heft A No.5:273-290.
- Erdman SE, Poutahidis T, Tomczak M et al. (2003 a):
 CD4+ CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit microbially induced colon cancer in Rag2-deficient mice.
 Am J Pathol. 162(2):691-702.
- Erdman SE, Rao VP, Poutahidis T et al. (2003 b):
 CD4(+)CD25(+) regulatory lymphocytes require interleukin 10 to interrupt colon carcinogenesis in mice.
 Cancer Res. 15;63(18):6042-50.

- Falcone A, Ricci S, Brunetti I et al. (2007):
Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest.
J Clin Oncol. 1;25(13):1670-6.
- Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW et al. (2003):
Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells.
Nat Immunol. 4(12):1206-12.
- Farrar JD, Katz KH, Windsor J et al. (1999):
Cancer dormancy. VII. A regulatory role for CD8+ T cells and IFN-gamma in establishing and maintaining the tumor-dormant state.
J Immunol. 1;162(5):2842-9.
- Figueredo A, Germond C, Maroun J, Browman G, Walker-Dilks C, Wong S (1997):
Adjuvant therapy for stage II colon cancer after complete resection. Provincial Gastrointestinal Disease Site Group.
Cancer Prev Control. 1(5):379-92.
- Fisk B, Blevins TL, Wharton JT, Ioannides CG (1995):
Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines.
J Exp Med. 1;181(6):2109-17.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003):
Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells.
Nat Immunol. 4(4):330-6.
- Francini G, Petrioli R, Lorenzini L et al. (1994):
Folinic acid and 5-fluorouracil as adjuvant chemotherapy in colon cancer.
Gastroenterology. 106(4):899-906.
- Funada Y, Noguchi T, Kikuchi R, Takeno S, Uchida Y, Gabbert HE (2003):
Prognostic significance of CD8+ T cell and macrophage peritumoral infiltration in colorectal cancer.
Oncol Rep. 10(2):309-13.
- Gad M, Brimnes J, Claesson MH (2003):
CD4+ T regulatory cells from the colonic lamina propria of normal mice inhibit proliferation of enterobacteria-reactive, disease-inducing Th1-cells from scid mice with colitis.
Clin Exp Immunol. 131(1):34-40.
- Gastrointestinal Tumor Study Group (1985):
Prolongation of the disease-free interval in surgically treated rectal carcinoma.
N Engl J Med. 6;312(23):1465-72.

- Gastrointestinal Tumor Study Group (1992):
Radiation therapy and fluorouracil with or without semustine for the treatment of patients with surgical adjuvant adenocarcinoma of the rectum.
J Clin Oncol. 10(4):549-57.
- Gershon RK, Kondo K (1970):
Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes.
Immunology. 18(5):723-37.
- Gershon RK, Kondo K (1971):
Infectious immunological tolerance.
Immunology. 21(6):903-14.
- Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E et al. (2004):
CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative.
Eur J Immunol. 34(2):336-44.
- Ghiringhelli F, Ménard C, Terme M et al. (2005):
CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner.
J Exp Med. 17;202(8):1075-85.
- Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R et al. (2000):
Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer.
J Clin Oncol. 18(1):136-47.
- Gjerdrum LM, Woetmann A, Odum N et al. (2007):
FOXP3+ regulatory T cells in cutaneous T-cell lymphomas: association with disease stage and survival.
Leukemia. 21(12):2512-8.
- Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ (2005):
Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism.
J Immunol. 15;174(4):1783-6.
- Graubert TA, Ley TJ (1996):
How do lymphocytes kill tumor cells?
Clin Cancer Res. 2(5):785-9.
- Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ (2004):
Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death.
Immunity. 21(4):589-601.

- Hagenaars M, Ensink NG, Basse PH et al. (2000):
The microscopic anatomy of experimental rat CC531 colon tumour metastases: consequences for immunotherapy?
Clin Exp Metastasis. 18(2):189-96.
- Hahn S, Gehri R, Erb P (1995):
Mechanism and biological significance of CD4-mediated cytotoxicity.
Immunol Rev. 146:57-79.
- Hanna MG, Hoover HC, Vermorken JB, Harris JE, Pinedo HM (2001):
Adjuvant active specific immunotherapy of stage II and stage III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: first randomized phase III trials show promise.
Vaccine. 21;19(17-19):2576-82.
- Harris JE, Ryan L, Hoover HC et al. (2000):
Adjuvant active specific immunotherapy for stage II and III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: Eastern Cooperative Oncology Group Study E5283.
J Clin Oncol. 18(1):148-57.
- Hartung G, Hofheinz RD, Dencausse Y et al. (2005):
Adjuvant therapy with edrecolomab versus observation in stage II colon cancer: a multicenter randomized phase III study.
Onkologie. 28(6-7):347-50.
- Hewitt HB, Blake ER, Walder AS (1976):
A critique of the evidence for active host defence against cancer, based on personal studies of 27 murine tumours of spontaneous origin.
Br J Cancer. 33(3):241-59.
- Hicklin DJ, Ellis LM (2005):
Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis.
J Clin Oncol. 10;23(5):1011-27.
- Hochster HS (2006):
Bevacizumab in combination with chemotherapy: first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer.
Semin Oncol. 33(5 Suppl 10):S8-14.
- Hom SS, Rosenberg SA, Topalian SL (1993):
Specific immune recognition of autologous tumor by lymphocytes infiltrating colon carcinomas: analysis by cytokine secretion.
Cancer Immunol Immunother. 36(1):1-8.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003):
Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3.
Science. 14;299(5609):1057-61.

- Hsieh CS, Liang Y, Tyznik AJ, Self SG, Liggitt D, Rudensky AY (2004):
Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors.
Immunity. 21(2):267-77.
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W et al. (2004):
Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer.
N Engl J Med. 3;350(23):2335-42.
- Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H (2003):
Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers.
Clin Cancer Res. 1;9(12):4404-8.
- IMPACT-Studie (1995):
Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators.
Lancet. 15;345(8955):939-44.
- IMPACT-B2-Studie (1999):
Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in B2 colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of B2 Colon Cancer Trials (IMPACT B2) Investigators.
J Clin Oncol. 17(5):1356-63.
- Jäger E, Chen YT, Drijfhout JW et al. (1998):
Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes.
J Exp Med. 19;187(2):265-70.
- Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C (1993):
Detection of intracellular cytokines by flow cytometry.
J Immunol Methods. 26;159(1-2):197-207.
- Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R (2002):
Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development.
Nat Rev Immunol. 2(4):251-62.
- Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS et al. (1998):
Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice.
Proc Natl Acad Sci U S A. 23;95(13):7556-61.
- Keilholz U, Stoter G, Punt CJ, Scheibenbogen C, Lejeune F, Eggermont AM (1997):
Recombinant interleukin-2-based treatments for advanced melanoma: the experience of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Melanoma Cooperative Group.
Cancer J Sci Am. 3 Suppl 1:S22-8.

- Keilholz U, Eggermont AM (2000):
The role of interleukin-2 in the management of stage IV melanoma: the EORTC melanoma cooperative group program.
Cancer J Sci Am. 2000 Feb;6 Suppl 1:S99-103.
- Keilholz U, Weber J, Finke JH et al. (2002):
Immunologic monitoring of cancer vaccine therapy: results of a workshop sponsored by the Society for Biological Therapy.
J Immunother. 25(2):97-138.
- Kern F, Surel IP, Brock C et al. (1998):
T-cell epitope mapping by flow cytometry.
Nat Med. 4(8):975-8.
- Khanna R, Burrows SR (2000):
Role of cytotoxic T lymphocytes in Epstein-Barr virus-associated diseases.
Annu Rev Microbiol. 54:19-48.
- Khattari R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F (2003):
An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells.
Nat Immunol. 4(4):337-42.
- Kitayama J, Tuno N, Nakayama H, Shibata Y, Muto T, Nagawa H (1999):
Functional down-regulation of beta1 and beta2 integrins of lamina propria lymphocytes (LPL) and tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) in colorectal cancer patients.
Ann Surg Oncol. 6(5):500-6.
- Klinman DM (2003):
CpG DNA as a vaccine adjuvant.
Expert Rev Vaccines. 2(2):305-15.
- Koch M, Beckhove P, Op den Winkel J et al. (2006):
Tumor infiltrating T lymphocytes in colorectal cancer: Tumor-selective activation and cytotoxic activity in situ.
Ann Surg. 244(6):986-92; discussion 992-3.
- Köhne CH, van Cutsem E, Wils J et al. (2005):
Phase III study of weekly high-dose infusional fluorouracil plus folinic acid with or without irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer: European Organisation for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Group Study 40986.
J Clin Oncol. 1;23(22):4856-65.
- Ko K, Yamazaki S, Nakamura K et al. (2005):
Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells.
J Exp Med. 3;202(7):885-91.

- Kono K, Kawaida H, Takahashi A et al. (2006):
CD4(+)CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers.
Cancer Immunol Immunother. 55(9):1064-71.
- Krook JE, Moertel CG, Gunderson LL et al.(1991):
Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma.
N Engl J Med. 14;324(11):709-15.
- Kryczek I, Zou L, Rodriguez P et al. (2006 a):
B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma.
J Exp Med. 17;203(4):871-81.
- Kryczek I, Wei S, Zou L et al. (2006 b):
Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells.
J Immunol. 1;177(1):40-4.
- Lanzavecchia A (1998):
Immunology. Licence to kill.
Nature. 4;393(6684):413-4.
- Lee PP, Yee C, Savage PA et al. (1999):
Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients.
Nat Med. 5(6):677-85.
- Legha SS (1986):
Interferons in the treatment of malignant melanoma. A review of recent trials.
Cancer. 15;57(8 Suppl):1675-7.
- Lethé B, Lucas S, Michaux L et al. (1998):
LAGE-1, a new gene with tumor specificity.
Int J Cancer. 10;76(6):903-8.
- Levitsky HI, Lazenby A, Hayashi RJ, Pardoll DM (1994):
In vivo priming of two distinct antitumor effector populations: the role of MHC class I expression.
J Exp Med. 1;179(4):1215-24.
- Liang W, Wang H, Sun TM et al. (2003):
Application of autologous tumor cell vaccine and NDV vaccine in treatment of tumors of digestive tract.
World J Gastroenterol. 9(3):495-8.
- Liebrich W, Schlag P, Manasterski M et al. (1991):
In vitro and clinical characterisation of a Newcastle disease virus-modified autologous tumour cell vaccine for treatment of colorectal cancer patients.
Eur J Cancer. 27(6):703-10.

- Ling KL, Pratap SE, Bates GJ et al. (2007):
Increased frequency of regulatory T cells in peripheral blood and tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer patients.
Cancer Immun. 28;7:7.
- Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P, Ferguson KM (2005):
Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab.
Cancer Cell. 7(4):301-11.
- Litvinov SV, Velders MP, Bakker HA, Fleuren GJ, Warnaar SO (1994):
Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule.
J Cell Biol. 125(2):437-46.
- Litvinov SV, Balzar M, Winter MJ et al. (1997):
Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins.
J Cell Biol. 1;139(5):1337-48.
- Liyanage UK, Moore TT, Joo HG et al. (2002):
Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma.
J Immunol. 1;169(5):2756-61.
- Lotze MT, Rubin JT, Carty S et al. (1994):
Gene therapy of cancer: a pilot study of IL-4-gene-modified fibroblasts admixed with autologous tumor to elicit an immune response.
Hum Gene Ther. 5(1):41-55.
- Lu H, Ouyang W, Huang C (2006):
Inflammation, a key event in cancer development.
Mol Cancer Res. 4(4):221-33.
- Maher S, Toomey D, Condrón C, Bouchier-Hayes D (2002):
Activation-induced cell death: the controversial role of Fas and Fas ligand in immune privilege and tumour counterattack.
Immunol Cell Biol. 80(2):131-7.
- Maloy KJ, Antonelli LR, Lefevre M, Powrie F (2005):
Cure of innate intestinal immune pathology by CD4+CD25+ regulatory T cells.
Immunol Lett. 15;97(2):189-92
- Masi G, Cupini S, Marcucci L et al. (2006):
Treatment with 5-fluorouracil/folinic acid, oxaliplatin, and irinotecan enables surgical resection of metastases in patients with initially unresectable metastatic colorectal cancer.
Ann Surg Oncol. 13(1):58-65.

- Maul J, Loddenkemper C, Mundt P et al. (2005):
Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease.
Gastroenterology. 128(7):1868-78.
- Mellor AL, Munn DH (2004):
IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism.
Nat Rev Immunol. 4(10):762-74.
- Menon AG, Fleuren GJ, Alphenaar EA et al. (2003):
A basal membrane-like structure surrounding tumour nodules may prevent intraepithelial leucocyte infiltration in colorectal cancer.
Cancer Immunol Immunother. 52(2):121-6.
- Menon AG, Janssen-van Rhijn CM, Morreau H et al. (2004):
Immune system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis.
Lab Invest. 84(4):493-501.
- Miyahira Y, Murata K, Rodriguez D et al. (1995):
Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay.
J Immunol Methods. 12;181(1):45-54.
- Mocellin S, Rossi CR, Lise M, Marincola FM (2002):
Adjuvant immunotherapy for solid tumors: from promise to clinical application.
Cancer Immunol Immunother. 51(11-12):583-95.
- Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS et al. (1995):
Intergroup study of fluorouracil plus levamisole as adjuvant therapy for stage II/Dukes' B2 colon cancer.
J Clin Oncol. 13(12):2936-43.
- Mosolits S, Ullenhag G, Mellstedt H (2005):
Therapeutic vaccination in patients with gastrointestinal malignancies. A review of immunological and clinical results.
Ann Oncol. 16(6):847-62. Epub 2005 Apr 13.
- Mottet C, Uhlig HH, Powrie F (2003):
Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells.
J Immunol. 15;170(8):3939-43.
- Nagorsen D, Keilholz U, Rivoltini L, Schmittel A, Letsch A, Asemissen AM, Berger G, Buhr HJ, Thiel E, Scheibenbogen C (2000):
Natural T-cell response against MHC class I epitopes of epithelial cell adhesion molecule, her-2/neu, and carcinoembryonic antigen in patients with colorectal cancer.
Cancer Res. 1;60(17):4850-4.

- Nagorsen D, Scheibenbogen C, Schaller G et al. (2003):
Differences in T-cell immunity toward tumor-associated antigens in colorectal cancer and breast cancer patients.
Int J Cancer. 10;105(2):221-5.
- Nagorsen D, Scheibenbogen C, Thiel E, Keilholz U (2004):
Immunological monitoring of cancer vaccine therapy.
Expert Opin Biol Ther. 4(10):1677-84.
- Nagorsen D, Scheibenbogen C, Letsch A et al. (2005):
T cell responses against tumor associated antigens and prognosis in colorectal cancer patients.
J Transl Med. 19;3(1):3.
- Nagorsen D, Thiel E (2006):
Clinical and immunologic responses to active specific cancer vaccines in human colorectal cancer.
Clin Cancer Res. 15;12(10):3064-9.
- Naito Y, Saito K, Shiiba K et al. (1998):
CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer.
Cancer Res. 15;58(16):3491-4.
- Nakamura K, Kitani A, Strober W (2001):
Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta.
J Exp Med. 3;194(5):629-44.
- NIH Consensus Conference (1990):
Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. National Institutes of Health.
Conn Med. 54(10):573-81.
- Nishikawa H, Jäger E, Ritter G, Old LJ, Gnjatic S (2005):
CD4+ CD25+ regulatory T cells control the induction of antigen-specific CD4+ helper T cell responses in cancer patients.
Blood. 1;106(3):1008-11.
- Nomura T, Sakaguchi S (2005):
Naturally arising CD25+CD4+ regulatory T cells in tumor immunity.
Curr Top Microbiol Immunol. 293:287-302.
- Norton AJ, Jordan S, Yeomans P (1994):
Brief, high-temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues.
J Pathol. 173(4):371-9.

- Novellino L, Castelli C, Parmiani G (2005):
A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update.
Cancer Immunol Immunother. 54(3):187-207.
- Oberg A, Samii S, Stenling R, Lindmark G (2002):
Different occurrence of CD8+, CD45RO+, and CD68+ immune cells in regional lymph node metastases from colorectal cancer as potential prognostic predictors.
Int J Colorectal Dis. 17(1):25-9.
- O'Connell J, Bennett MW, O'Sullivan GC et al. (1998):
Fas ligand expression in primary colon adenocarcinomas: evidence that the Fas counterattack is a prevalent mechanism of immune evasion in human colon cancer.
J Pathol. 186(3):240-6.
- Ogg GS, Rod Dunbar P, Romero P, Chen JL, Cerundolo V (1998):
High frequency of skin-homing melanocyte-specific cytotoxic T lymphocytes in autoimmune vitiligo.
J Exp Med. 21;188(6):1203-8.
- Ohnmacht GA, Marincola FM (2000):
Heterogeneity in expression of human leukocyte antigens and melanoma-associated antigens in advanced melanoma.
J Cell Physiol. 182(3):332-8.
- Okita R, Saeki T, Takashima S, Yamaguchi Y, Toge T (2005):
CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with breast cancer and non-small cell lung cancer.
Oncol Rep. 14(5):1269-73.
- Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E (1999):
Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody.
Cancer Res. 1;59(13):3128-33.
- Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F (2005):
Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma.
Cancer Res. 15;65(6):2457-64.
- Overwijk WW, Lee DS, Surman DR et al. (1999):
Vaccination with a recombinant vaccinia virus encoding a "self" antigen induces autoimmune vitiligo and tumor cell destruction in mice: requirement for CD4(+) T lymphocytes.
Proc Natl Acad Sci U S A. 16;96(6):2982-7.
- Pagès F, Berger A, Camus M et al. (2005):
Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer.
N Engl J Med. 22;353(25):2654-66.

- Pass HA, Schwarz SL, Wunderlich JR, Rosenberg SA (1998):
Immunization of patients with melanoma peptide vaccines: immunologic assessment using the ELISPOT assay.
Cancer J Sci Am. 4(5):316-23.
- Prasad DV, Richards S, Mai XM, Dong C (2003):
B7S1, a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation.
Immunity. 18(6):863-73.
- Prehn RT, Main JM (1957):
Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas.
J Natl Cancer Inst. 18(6):769-78.
- Prussin C, Metcalfe DD (1995):
Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies.
J Immunol Methods. 15;188(1):117-28.
- Prussin C (1997):
Cytokine flow cytometry: understanding cytokine biology at the single-cell level.
J Clin Immunol. 17(3):195-204.
- Punt CJ, Nagy A, Douillard JY et al. (2002):
Edrecolomab alone or in combination with fluorouracil and folinic acid in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: a randomised study.
Lancet. 31;360(9334):671-7.
- Read S, Malmström V, Powrie F (2000):
Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation.
J Exp Med. 17;192(2):295-302.
- Redman BG, Flaherty L, Chou TH et al. (1992):
Phase I trial of recombinant macrophage colony-stimulating factor by rapid intravenous infusion in patients with cancer.
J Immunother. 12(1):50-4.
- Renkvist N, Castelli C, Robbins PF, Parmiani G (2001):
A listing of human tumor antigens recognized by T cells.
Cancer Immunol Immunother. 50(1):3-15.
- Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P (1998):
A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell.
Nature. 4;393(6684):474-8.
- Rieger K, Loddenkemper C, Maul J et al. (2006):
Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD.
Blood. 15;107(4):1717-23.

- Riethmüller G, Holz E, Schlimok G et al. (1998):
Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial.
J Clin Oncol. 16(5):1788-94.
- Robson H, Anderson E, James RD, Schofield PF (1996):
Transforming growth factor beta 1 expression in human colorectal tumours: an independent prognostic marker in a subgroup of poor prognosis patients.
Br J Cancer. 74(5):753-8.
- Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Alhava E, Kosma VM (1997):
Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer.
J Pathol. 182(3):318-24.
- Rosenberg SA, Dudley ME (2004):
Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes.
Proc Natl Acad Sci U S A. 5;101 Suppl 2:14639-45.
- Rudolf MP, Man S, Melief CJ, Sette A, Kast WM (2001):
Human T-cell responses to HLA-A-restricted high binding affinity peptides of human papillomavirus type 18 proteins E6 and E7.
Clin Cancer Res. 7(3 Suppl):788s-795s.
- Saadeh CE, Lee HS (2007):
Panitumumab: a fully human monoclonal antibody with activity in metastatic colorectal cancer.
Ann Pharmacother. 41(4):606-13.
- Sahin U, Türeci O, Pfreundschuh M (1997):
Serological identification of human tumor antigens.
Curr Opin Immunol. 9(5):709-16.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995):
Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.
J Immunol. 1;155(3):1151-64.
- Saleh MN, LoBuglio AF, Wheeler RH et al. (1990):
A phase II trial of murine monoclonal antibody 17-1A and interferon-gamma: clinical and immunological data.
Cancer Immunol Immunother. 32(3):185-90.
- Saltz LB, Cox JV, Blanke C et al. (2000):
Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group.
N Engl J Med. 28;343(13):905-14.

- Sargent DJ, Goldberg RM, Jacobson SD et al. (2001):
A pooled analysis of adjuvant chemotherapy for resected colon cancer in elderly patients.
N Engl J Med. 11;345(15):1091-7.
- Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A (2003):
CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies:
possible involvement of regulatory T cells in disease progression.
Cancer. 1;98(5):1089-99.
- Sato E, Olson SH, Ahn J et al. (2005):
Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T
cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer.
Proc Natl Acad Sci U S A. 20;102(51):18538-43.
- Saunders M, Iveson T (2006):
Management of advanced colorectal cancer: state of the art.
Br J Cancer. 17;95(2):131-8.
- Scheibenbogen C, Lee KH, Mayer S et al. (1997 a):
A sensitive ELISPOT assay for detection of CD8+ T lymphocytes specific for HLA
class I-binding peptide epitopes derived from influenza proteins in the blood of
healthy donors and melanoma patients.
Clin Cancer Res. 3(2):221-6.
- Scheibenbogen C, Lee KH, Stevanovic S et al. (1997 b):
Analysis of the T cell response to tumor and viral peptide antigens by an
IFNgamma-ELISPOT assay.
Int J Cancer. 11;71(6):932-6.
- Scheibenbogen C, Romero P, Rivoltini L et al. (2000):
Quantitation of antigen-reactive T cells in peripheral blood by IFNgamma-
ELISPOT assay and chromium-release assay: a four-centre comparative trial.
J Immunol Methods. 20;244(1-2):81-9.
- Schimanski CC, Hörner V, Kanzler S, Galle PR, Moehler M (2006):
Immunotherapy of colorectal cancer - overview and perspectives.
Z Gastroenterol. 44(8):673-81.
- Schiltz PM, Beutel LD, Nayak SK, Dillman RO (1997):
Characterization of tumor-infiltrating lymphocytes derived from human tumors for
use as adoptive immunotherapy of cancer.
J Immunother. 20(5):377-86.
- Schmittel A, Keilholz U, Thiel E, Scheibenbogen C (2000):
Quantification of tumor-specific T lymphocytes with the ELISPOT assay.
J Immunother. 23(3):289-95.

- Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ (1998):
T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions.
Nature. 4;393(6684):480-3.
- Schrag D, Rifas-Shiman S, Saltz L, Bach PB, Begg CB (2002):
Adjuvant chemotherapy use for Medicare beneficiaries with stage II colon cancer.
J Clin Oncol. 1;20(19):3999-4005.
- Seliger B, Dunn T, Schwenzer A, Casper J, Huber C, Schmoll HJ. (1997):
Analysis of the MHC class I antigen presentation machinery in human embryonal
carcinomas: evidence for deficiencies in TAP, LMP and MHC class I expression
and their upregulation by IFN-gamma.
Scand J Immunol. 46(6):625-32.
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD (2001):
IFN-gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape
tumour immunogenicity.
Nature. 26;410(6832):1107-11.
- Shevach EM (2002):
CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers.
Nat Rev Immunol. 2(6):389-400.
- Shevach EM (2004):
Fatal attraction: tumors beckon regulatory T cells.
Nat Med. 10(9):900-1.
- Shi SR, Key ME, Kalra KL (1991):
Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement
method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of
tissue sections.
J Histochem Cytochem. 39(6):741-8.
- Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S (1999):
Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis
between tumor immunity and autoimmunity.
J Immunol. 15;163(10):5211-8.
- Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S (2002):
Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks
immunological self-tolerance.
Nat Immunol. 3(2):135-42.
- Sica GL, Choi IH, Zhu G, Tamada K, Wang SD, Tamura H, Chapoval AI, Flies DB,
Bajorath J, Chen L (2003):
B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity.
Immunity. 18(6):849-61.

- Sijts A, Zaiss D, Kloetzel PM (2001):
The role of the ubiquitin-proteasome pathway in MHC class I antigen processing: implications for vaccine design.
Curr Mol Med. 1(6):665-76.
- Smyth MJ, Trapani JA (1995):
Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis.
Immunol Today. 16(4):202-6.
- Somasundaram R, Robbins P, Moonka D et al. (2000):
CD4(+), HLA class I-restricted, cytolytic T-lymphocyte clone against primary malignant melanoma cells.
Int J Cancer. 15;85(2):253-9.
- Souglakos J, Androulakis N, Syrigos K et al. (2006):
FOLFOXIRI (folinic acid, 5-fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan) vs FOLFIRI (folinic acid, 5-fluorouracil and irinotecan) as first-line treatment in metastatic colorectal cancer (MCC): a multicentre randomised phase III trial from the Hellenic Oncology Research Group (HORG).
Br J Cancer. 27;94(6):798-805.
- Strasser A, O'Connor L, Dixit VM (2000):
Apoptosis signaling.
Annu Rev Biochem. 69:217-45.
- Stutman O (1974):
Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice.
Science. 8;183(124):534-6.
- Sun H, Kundu N, Dorsey R, Jackson MJ, Fulton AM (2001):
Expression of the Chemokines IP-10 and Mig in IL-10 Transduced Tumors.
J Immunother. 24(2):138-143.
- Tabi Z, Moutaftsi M, Borysiewicz LK (2001):
Human cytomegalovirus pp65- and immediate early 1 antigen-specific HLA class I-restricted cytotoxic T cell responses induced by cross-presentation of viral antigens.
J Immunol. 1;166(9):5695-703.
- Takahashi M, Nakamura K, Honda K et al. (2006):
An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis.
Dig Dis Sci. 51(4):677-86.
- Thomas WD, Hersey P (1998):
TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells.
J Immunol. 1;161(5):2195-200.

- Tournigand C, André T, Achille E et al. (2004):
FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study.
J Clin Oncol. 15;22(2):229-37.
- Trapani JA, Sutton VR, Smyth MJ (1999):
CTL granules: evolution of vesicles essential for combating virus infections.
Immunol Today. 20(8):351-6.
- Trubiani O, Bosco D, Di Primio R (1994):
Interferon-gamma (IFN-gamma) induces programmed cell death in differentiated human leukemic B cell lines.
Exp Cell Res. 215(1):23-7.
- Tsang KY, Zaremba S, Nieroda CA, Zhu MZ, Hamilton JM, Schlom J (1995):
Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine.
J Natl Cancer Inst. 5;87(13):982-90.
- Tsang KY, Zhu M, Nieroda CA et al. (1997):
Phenotypic stability of a cytotoxic T-cell line directed against an immunodominant epitope of human carcinoembryonic antigen.
Clin Cancer Res. 3(12 Pt 1):2439-49.
- Tumor Zentrum Berlin e.V. - Leitlinien (2006):
Kolorektale Karzinome – Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie.
3. überarbeitete Auflage
- Turk MJ, Guevara-Patiño JA, Rizzuto GA, Engelhorn ME, Sakaguchi S, Houghton AN (2004):
Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells.
J Exp Med. 20;200(6):771-82.
- Tveit KM, Guldvog I, Hagen S et al. (1997):
Randomized controlled trial of postoperative radiotherapy and short-term time-scheduled 5-fluorouracil against surgery alone in the treatment of Dukes B and C rectal cancer. Norwegian Adjuvant Rectal Cancer Project Group.
Br J Surg. 84(8):1130-5.
- Umano Y, Tsunoda T, Tanaka H, Matsuda K, Yamaue H, Tanimura H (2001):
Generation of cytotoxic T cell responses to an HLA-A24 restricted epitope peptide derived from wild-type p53.
Br J Cancer. 20;84(8):1052-7.
- Valzasina B, Guiducci C, Dislich H, Killeen N, Weinberg AD, Colombo MP (2005):
Triggering of OX40 (CD134) on CD4(+)CD25+ T cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role for OX40 and its comparison with GITR.
Blood. 1;105(7):2845-51.

- Van den Eynde B, Peeters O, De Backer O, Gaugler B, Lucas S, Boon T (1995):
A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous
cytolytic T lymphocytes on a human melanoma.
J Exp Med. 1;182(3):689-98.
- Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P et al. (1991):
A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human
melanoma.
Science. 13;254(5038):1643-7.
- Van Pel A, Boon T (1982):
Protection against a nonimmunogenic mouse leukemia by an immunogenic
variant obtained by mutagenesis.
Proc Natl Acad Sci U S A. 79(15):4718-22.
- Vermorken JB, Claessen AM, van Tinteren H et al. (1999):
Active specific immunotherapy for stage II and stage III human colon cancer: a
randomised trial.
Lancet. 30;353(9150):345-50.
- Viguier M, Lemaître F, Verola O et al. (2004):
Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in
human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T
cells.
J Immunol. 15;173(2):1444-53.
- Von Boehmer H (2005):
Mechanisms of suppression by suppressor T cells.
Nat Immunol. 6(4):338-44.
- Vonderheide RH, Hahn WC, Schultze JL, Nadler LM (1999):
The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen
recognized by cytotoxic T lymphocytes.
Immunity. 10(6):673-9.
- Von Herrath MG, Harrison LC (2003):
Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity.
Nat Rev Immunol. 3(3):223-32.
- Wang RF (1999):
Human tumor antigens: implications for cancer vaccine development.
J Mol Med. 77(9):640-55.
- Wang HY, Lee DA, Peng G et al. (2004):
Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for
immunotherapy.
Immunity. 20(1):107-18.

- Wang HY, Peng G, Guo Z, Shevach EM, Wang RF (2005):
Recognition of a new ARTC1 peptide ligand uniquely expressed in tumor cells by
antigen-specific CD4+ regulatory T cells.
J Immunol. 1;174(5):2661-70.
- Whiteside TL (2006):
The role of immune cells in the tumor microenvironment.
Cancer Treat Res. 130:103-24.
- Whittington R, Faulds D (1993):
Interleukin-2. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in
patients with cancer.
Drugs. 46(3):446-514.
- Wilkinson J, Cope A, Gill J et al. (2002):
Identification of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)-specific
cytotoxic T-lymphocyte epitopes and evaluation of reconstitution of KSHV-specific
responses in human immunodeficiency virus type 1-infected patients receiving
highly active antiretroviral therapy.
J Virol. 76(6):2634-40.
- Willimsky G, Blankenstein T (2005):
Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance.
Nature. 1;437(7055):141-6.
- Wölfel T, van Pel A, Brichard V et al. (1994):
Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous
cytolytic T lymphocytes.
Eur J Immunol. 24(3):759-64.
- Wojtowicz-Praga S (1997):
Reversal of tumor-induced immunosuppression: a new approach to cancer
therapy.
J Immunother. 20(3):165-77.
- Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B (2003):
Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients.
Clin Cancer Res. 9(2):606-12.
- Wolf D, Wolf AM, Rumpold H et al. (2005):
The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor
FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer.
Clin Cancer Res. 1;11(23):8326-31.
- Wolmark N, Wieand HS, Hyams DM et al. (2000):
Randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy with or without
radiotherapy for carcinoma of the rectum: National Surgical Adjuvant Breast and
Bowel Project Protocol R-02.
J Natl Cancer Inst. 1;92(5):388-96.

- Yi H, Zhen Y, Jiang L, Zheng J, Zhao Y (2006):
The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ T cells.
Cell Mol Immunol. 3(3):189-95.
- Yoo YK, Heo DS, Hata K, van Thiel DH, Whiteside TL (1990):
Tumor-infiltrating lymphocytes from human colon carcinomas. Functional and phenotypic characteristics after long-term culture in recombinant interleukin 2.
Gastroenterology. 98(2):259-68.
- Yu P, Lee Y, Liu W, Krausz T, Chong A, Schreiber H, Fu YX (2005):
Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors.
J Exp Med. 7;201(5):779-91.
- Zang X, Loke P, Kim J, Murphy K, Waitz R, Allison JP (2003):
B7x: a widely expressed B7 family member that inhibits T cell activation.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2;100(18):10388-92.
- Zelenay S, Lopes-Carvalho T, Caramalho I, Moraes-Fontes MF, Rebelo M, Demengeot J (2005):
Foxp3+ CD25- CD4 T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion.
Proc Natl Acad Sci U S A. 15;102(11):4091-6.
- Zhang X, Izikson L, Liu L, Weiner HL (2001):
Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration.
J Immunol. 15;167(8):4245-53.
- Zhou G, Lu Z, McCadden JD, Levitsky HI, Marson AL (2004):
Reciprocal changes in tumor antigenicity and antigen-specific T cell function during tumor progression.
J Exp Med. 20;200(12):1581-92.
- Zou W (2006):
Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy.
Nat Rev Immunol. 6(4):295-307.

7 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8 Erklärung der Selbständigkeit

„Ich, Martin Schemus, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *„In-situ-Analyse der Infiltration kolorektaler Karzinome durch FOXP3⁺ regulatorische T-Zellen, CD3⁺ und CD8⁺ T-Zellen: Zusammenhänge mit der TAA-spezifischen T-Zell-Antwort, dem Stadium und dem Überleben“* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

9 Danksagung

Ganz besonders herzlich danke ich Herrn PD Dr. med. Dirk Nagorsen, der mir das Thema dieser Arbeit überließ und deren Entstehung er mit sehr großem Engagement, Begeisterungsfähigkeit und unentbehrlichen Hilfestellungen mehr als exzellent betreute und mich mit steter konstruktiver Diskussionsbereitschaft zum wissenschaftlichen Arbeiten anleitete.

Auch Herrn Prof. Dr. med. Christoph Loddenkemper danke ich für viele wertvolle Anregungen und Hilfestellungen, mit denen er mich speziell beim methodischen Teil meiner Dissertation unterstützte und ohne dessen Beitrag diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Eckhard Thiel als Direktor der Medizinischen Klinik für Hämatologie und Onkologie sei gedankt für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in der Medizinischen Klinik für Hämatologie und Onkologie der Charité Universitätsmedizin Berlin – Campus Benjamin Franklin durchführen zu können.

Frau Simone Spiekermann danke ich für diverse nützliche und freundliche Anleitungen bezüglich der Methodik dieser Arbeit.

Ich danke auch meinen Freunden und Bekannten, die mich auf unterschiedlichste Weise begleitet und unterstützt haben, namentlich Dr. med. Dr. rer. nat. Ronny Schuster sei gedankt für viele gute Anregungen.

Mein persönlicher Dank gilt zum einen meiner Frau Alexandra, die mir mit ihrer liebevollen Ermutigung und geduldigen Nachsicht während der Entstehung dieser Arbeit zur Seite stand, weshalb ich ihr diese Arbeit widmen möchte. Zum anderen danke ich sehr herzlich meinen Eltern Prof. Dr. Georg-Peter und Erika Schernus für ihre großzügige finanzielle und emotionale Unterstützung, mit der sie meine gesamte Ausbildung begleitet haben.