

Jan op den Winkel  
Dr. med.

## **Charakterisierung von tumorinfiltrierenden Lymphozyten und deren Einfluss auf die Apoptose beim kolorektalen Karzinom**

Geboren am 08.11.1979 in Basel (Schweiz)  
Staatsexamen am 08.06.2007 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Chirurgie  
Doktorvater: Prof. Dr. med. J. Weitz

Das Ziel dieser Arbeit war eine Charakterisierung tumorinfiltrierender Lymphozyten sowie die Analyse ihrer Interaktion mit den Zellen des kolorektalen Karzinoms. Die Entstehung des kolorektalen Karzinoms ist eng mit einer Störung der Apoptoseinduktion verknüpft. Dennoch ist die Einleitung des programmierten Zelltodes auch nach der malignen Transformation des Gewebes möglich und die Apoptose stellt einen elementaren Mechanismus zur Bekämpfung des Tumors dar. Tumorinfiltrierende Lymphozyten greifen nachweislich in diesen Prozess ein. Die Interaktion von Karzinomzellen und Immunsystem ist bislang jedoch nur unzureichend entschlüsselt. Heutzutage wird von einem entscheidenden Einfluss der infiltrierenden Lymphozyten auf das Fortschreiten des Tumors ausgegangen. Allerdings ist nicht abschließend geklärt, ob es sich hierbei insgesamt um hemmende oder fördernde Effekte handelt. Die Datenlage zu dieser Thematik wird kontrovers diskutiert. Frühere Studien konnten einen Zusammenhang zwischen verbesserter Prognose und verstärktem Eindringen der Lymphozyten in das Tumorgewebe aufzeigen. Sie blieben jedoch den Beweis schuldig, dass es sich hierbei um die direkte Folge der intratumoralen Lymphozyten handelt. Zudem wurden funktionellen Charakteristika der T-Zell Populationen meist wenig Beachtung geschenkt. Karzinome entstehen häufig in Lokalisationen mit chronischen Gewebsirritationen, Infektionen und Entzündungsprozessen. Daher ist derzeit noch unklar, ob die Anwesenheit der tumorinfiltrierenden Lymphozyten auf diese Prozesse zurückzuführen ist und sie zum Tumorprogress beitragen, oder ob sie Anzeichen eines funktionierenden und protektiven Immunsystems darstellen. Vorherige Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe sprechen für den protektiven Einfluss, da erstmals tumorselektive Aktivierung und Zytotoxizität beim Vergleich von gesunder Darmmukosa und korrespondierendem malignem Gewebe des kolorektalen Karzinoms gezeigt werden konnten. Die genannten Aspekte bedürfen einer grundlegenden Klärung, um Vorgänge in Karzinomen besser verstehen und neue Behandlungsmöglichkeiten eröffnen zu können.

Der Fokus dieser Arbeit lag neben der Analyse der Ausprägung von Aktivierung und zytotoxischer Aktivität auch auf der unterschiedlichen quantitativen und lokalisierten Infiltration der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten im kolorektalen Karzinom. In Beziehung gesetzt wurden die Daten zu den Untersuchungen der Apoptose, welche an den korrespondierenden Tumorgeweben stattfanden. Die Durchführung der Experimente erfolgte an Geweben von 31 Patienten, die bei kurativer oder palliativer chirurgischer Resektion aus kolorektalen Karzinomen gewonnen wurden. Eingeschlossen wurden Patienten aus den UICC-Stadien II, III und IV. Keiner der gewebspendenden Patienten erhielt präoperativ eine Chemo- oder Radiotherapie. Somit konnte eine mögliche Beeinflussung der Analyse durch eine neoadjuvante Therapie vermieden werden. Mittels indirekter Immunfluoreszenztechnik wurden die entsprechenden Zielantigene in den Tumorgeweben dargestellt und fluoreszenzmikroskopisch detektiert. Die Apoptose konnte durch TUNEL-Färbung sichtbar

gemacht und gleichfalls unter dem Fluoreszenzmikroskop quantifiziert werden. Abschließend fand in der statistischen Auswertung die Prüfung einer Korrelation von experimentell erhobenen Daten und klinischen Parametern der Patienten statt. Damit sollte die Bedeutung der Ergebnisse erfasst und eingeschätzt werden. Eine Einschränkung der Aussagekraft, der im Folgenden dargestellten Daten, ergibt sich aus dem Fehlen von Gewebematerial des UICC-Stadiums I. Daher sind Rückschlüsse auf die Lymphozyten- und Tumorzelleigenschaften im frühesten Tumorstadium des KRK nicht möglich.

Die hochsignifikanten Korrelationen von CD4+ und CD8+ Infiltration sowie von CD69 und CD107a Expression auf CD8+ tumorinfiltrierenden Lymphozyten lassen auf eine Interaktion der T-Zell Subtypen mit anschließender Aktivierung und zytotoxischer Aktivität schließen. Dies belegt eine intakte intrazelluläre Signalkaskade der TIL im KRK. Die Analyse der Ergebnisse ergab zudem den Nachweis einer signifikanten kontinuierlichen Abnahme der Aktivierung (CD69+), zytotoxischen Funktion (CD107a+) und intraepithelialen Lokalisation tumorinfiltrierender CD8+ Lymphozyten von UICC-Stadium II bis IV. In Analogie dazu, wiesen Tumorgewebe, welche zum Zeitpunkt der Resektion bereits metastasiert hatten, eine signifikant verminderte Aktivität und Zytotoxizität der CD8+ T-Zellen auf. Somit scheinen selektive Reaktionen gegen die Zellen des KRK besonders in frühen Stadien zu erfolgen. Eine progrediente Suppression der Immunantwort führt schließlich zu Fernmetastasierung und zunehmender lokaler Karzinomausdehnung. Ein signifikant längeres postoperatives Überleben bei erhöhter Expression von CD69 und vermehrter Epithelinfiltration sowie die Tendenz zur Prognoseverbesserung bei verstärkter CD107a-Expression durch CD8+ Lymphozyten implizieren einen selektiven und effektiven Angriff des KRK durch das Immunsystem. Die nachgewiesene Beziehung zwischen den dargestellten Variablen verdeutlicht den gravierenden Einfluss der Lymphozyten auf die Prognose der Erkrankung. Der zukünftige Einsatz der untersuchten Biomarker als prognostische Indikatoren ist aufgrund der angeführten Ergebnisse denkbar. Statistisch relevante Zusammenhänge zwischen CD4+ und CD8+ Infiltration und der Überlebenszeit nach Tumorresektion sowie den Tumorstadien konnten nicht aufgedeckt werden. Hierdurch wird die Notwendigkeit der Einbeziehung funktioneller Charakteristika der Lymphozyten zur exakten Analyse ihrer intratumoralen Wirkung hervorgehoben. Erstmals konnte auch eine signifikante Altersabhängigkeit der CD69 Expression auf CD8+ Zellen dokumentiert werden. So fand sich eine Erhöhung des Markers in jenem Patientenkollektiv, welches über der Altersgrenze von 70 Jahren lag. Eine Assoziation dieses Phänomens mit besserer Kontrolle des Tumorwachstums im Alter ist möglich.

Eindeutige Korrelationen von spezifischen TIL-Charakteristika und Apoptose im malignen Gewebe wurden nicht beobachtet. Es fand sich lediglich eine Tendenz zur gesteigerten Apoptose bei erhöhter Infiltration durch CD8+ Zellen und verstärktem Eindringen von CD8+ Lymphozyten in das Tumorepithel. Potenzielle Ursachen der scheinbar fehlenden Interaktion sind die Mechanismen des „tumor counterattack“ und des „immune escape“, welche die Tumorzellen vor der Apoptoseinduktion schützen.

Eine signifikante Prognoseverbesserung der Patienten zeigte sich bei erhöhtem Apoptoseindex im Tumorresektat. Dies unterstreicht die grundlegende Bedeutung des programmierten Zelltodes bei der Begrenzung des Tumorwachstums.

Zusammenfassend stellen die gefundenen Ergebnisse neue Erkenntnisse beim kolorektalen Karzinom dar. Sie verdeutlichen immunologische Vorgänge beim Fortschreiten der Erkrankung und sprechen für den protektiven Einfluss von tumorinfiltrierenden Lymphozyten und Apoptose im Malignomgewebe. Somit erweitern die Daten dieser Arbeit das Detailwissen über intratumorale Prozesse und bergen das Potenzial, zur Entwicklung neuartiger Therapiestrategien beizutragen.

