

Aus der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. Dr. Dieter Bröring
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**CHARAKTERISIERUNG DES IMMUNZELLINFILTRATES BEIM
KOLONKARZINOM**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

SOPHIE MORTAZAWI

aus **Freiburg**

Kiel **2009**

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. von Bernstorff

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Kabelitz

Tag der mündlich Prüfung: 07.10.2009

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 07.10.2009

gez.: Prof. Dr. Dr. Schünke
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Meinen Eltern

*Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig:
unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft,
etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat,
wieder wegzuwerfen.*

Albert Einstein

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-präsentierende Zelle
BSA	bovines Serumalbumin
CA	Karzinom
CD-Moleküle	Cluster of differentiation
Ch	Chemotherapie
DAB	Diaminobenzidin-Lösung
DC	Dendritische Zelle
DTH-Reaktion	Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ
5FU/FA	Chemotherapie mit 5-Fluorouracil und Folinsäure
G	histologischer Differenzierungsgrad: G1 = gut diff., G2 = mäßig diff., G3 = schlecht diff., G4 = anaplastisch
Gruppe 1/2	Kolonkarzinom/ Lebermetastasen
h1/h2	heterogen/homogen
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
IL	Interleukin
LK	Lymphknoten
m	männlich (w = weiblich)
M	Metastasenstatus: M0 = Fehlen von Metastasen; M1 = Nachweis von Fernmetastasen; Mx = nicht beurteilbar
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
Muc	Mucin-Core-Polypeptid
n	Anzahl
N	Lymphknotenbefall: N0 = kein Lymphknotenbefall, N1 = Befall regionärer Lymphknoten, N2 = Befall weiterer LK-Stationen
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Obj.	Objektiv
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung)
p-Wert	Irrtumswahrscheinlichkeit
Q1/Q3	25. Perzentil/75. Perzentil
R	Resektionsstatus: R0 = kein Residualtumor R1 = histologisch Residualtumor R2 = makroskopisch Residualtumor
Ra	Radiatio
S-H	Stroma-Hotspots
SC S	Scoring Stroma
SC T	Scoring Tumor
SC S-H	Scoring Stroma-Hotspots
SC T-H	Scoring Tumor-Hotspots
sFas-L	soluble Fas-Ligand
SPSS	Statistikprogramm der Firma SPSS
T1-4	Ausmaße der Tumordinfiltration
TCR	T-Zell-Rezeptor
Th1/2	therapeutisch vorbehandelt/nachbehandelt
TIL	Tumordinfiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
T-H	Tumor-Hotspots
UICC	Union International Contre Cancer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Das Kolorektale Karzinom	8
1.1.1	<i>Epidemiologie</i>	8
1.1.2	<i>Ätiologie</i>	9
1.1.3	<i>Prognose</i>	9
1.1.4	<i>Therapie</i>	10
1.1.5	<i>Metastasierung des Kolorektalen Karzinoms</i>	11
1.2	Immunologische Aspekte bei Tumoren	11
1.2.1	<i>Das Immunsystem</i>	11
1.2.2	<i>Tumorimmunität</i>	12
1.3	In dieser Arbeit untersuchte Zellen und Moleküle	15
1.3.1	<i>T-Lymphozyten (gefärbte Marker: CD4, CD8, CD3 ε, CD3 ζ)</i>	15
1.3.2	<i>Die MHC-I-Expression (gefärbter Marker: MHC-Klasse-I-Komplex)</i>	16
1.3.3	<i>B-Lymphozyten (gefärbter Marker: CD79a)</i>	16
1.3.4	<i>Natürliche Killerzellen (gefärbter Marker: CD16)</i>	16
1.3.5	<i>Neutrophile Granulozyten (gefärbter Marker: KiMy2)</i>	16
1.3.6	<i>Makrophagen (gefärbter Marker: KiM1p)</i>	17
1.3.7	<i>Dendritische Zellen (gefärbte Marker: CD83, KiM4)</i>	17
1.3.8	<i>Die Expression des Fas-Liganden (gefärbter Marker: Fas-Ligand)</i>	17
1.3.9	<i>Zytokeratin (gefärbter Marker: KL-1)</i>	18
1.4	Fragestellungen und Zielsetzung der Arbeit	18
1.4.1	<i>Untersuchte Zellen und Marker</i>	19
2	Material und Patientenkollektiv	20
2.1	Patientenkollektiv	20
2.2	Verwendete Antikörper	21
2.3	Verwendete Reagenzien zur Färbung	23
3	Methodik	24
3.1	Anfertigung der Kryoschnitte am Mikrotom	24
3.2	Immunhistochemische Färbemethoden	25
3.2.1	<i>Immunhistochemische Färbung per Hand</i>	25
3.2.2	<i>Färbung mit dem DakoCytomation Autostainer</i>	26
3.3	Mikroskopische Auswertung	28
3.4	Photographie	29
3.5	Statistische Analyse	30
4	Ergebnisse	33

4.1	Ermittelte Ergebnisse.....	33
4.2	Zusammenfassung der ermittelten Ergebnisse.....	38
4.2.1	<i>Das Infiltrat der T-Helfer-Zellen.....</i>	38
4.2.2	<i>Das Infiltrat CD8+ T-Lymphozyten.....</i>	40
4.2.3	<i>Ergebnisse in den mit CD3 epsilon markierten Präparaten.....</i>	42
4.2.4	<i>Ergebnisse in den mit CD3 zeta markierten Präparaten.....</i>	43
4.2.5	<i>Das Infiltrat der B-Lymphozyten.....</i>	46
4.2.6	<i>Das Infiltrat Natürlicher Killerzellen.....</i>	48
4.2.7	<i>Das Infiltrat Neutrophiler Granulozyten.....</i>	50
4.2.8	<i>Das Infiltrat dendritischer Zellen.....</i>	51
4.2.9	<i>Das Makrophageninfiltrat.....</i>	53
4.2.10	<i>Die Expression von löslichem Fas-Ligand.....</i>	53
4.2.11	<i>Die Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle.....</i>	54
4.3	Angewendete statistische Verfahren.....	55
5	Diskussion	56
5.1	Ergebnisdiskussion der kolorektalen Karzinome und Lebermetastasen.....	56
5.1.1	<i>Das T-Zell-Infiltrat.....</i>	56
5.1.2	<i>Das Infiltrat der B-Lymphozyten.....</i>	59
5.1.3	<i>Das Infiltrat Natürlicher Killerzellen.....</i>	59
5.1.4	<i>Das Infiltrat Neutrophiler Granulozyten.....</i>	61
5.1.5	<i>Das Infiltrat dendritischer Zellen.....</i>	62
5.1.6	<i>Das Makrophageninfiltrat.....</i>	63
5.1.7	<i>Die Expression von MHC-I.....</i>	64
5.1.8	<i>Die Expression des Fas-Liganden.....</i>	66
5.2	Vergleich zwischen kolorektalem Karzinom und Pankreaskarzinom	69
5.2.1	<i>Das T-Zell-Infiltrat.....</i>	69
5.2.2	<i>Das Infiltrat Natürlicher Killerzellen.....</i>	70
5.2.3	<i>Das Infiltrat Neutrophiler Granulozyten.....</i>	71
5.2.4	<i>Das Infiltrat dendritischer Zellen.....</i>	71
5.2.5	<i>Das Makrophageninfiltrat.....</i>	71
5.2.6	<i>Die Expression von MHC-I.....</i>	72
5.2.7	<i>Die Expression des Fas-Liganden.....</i>	72
5.2.8	<i>Zusammenfassung</i>	72
6	Zusammenfassung.....	74
7	Literaturverzeichnis	77
	Anhang	92
	Danksagung.....	114
	Lebenslauf	115

1 Einleitung

Die häufigsten Erkrankungen mit Todesfolge stellen in den Industrieländern Krankheiten des Herz-Kreislauf-Systems dar. Während die Anzahl der Todesfälle jedoch erheblich abgenommen hat, ist die Krebssterblichkeit in den letzten Jahrzehnten fast gleich geblieben. Wenn sich dieser Trend weiter fortsetzt, ist es denkbar, dass maligne Erkrankungen in fünf bis zehn Jahren die häufigste Todesursache darstellen. Es ist deshalb eine wichtige Aufgabe, weitere und bessere Kenntnisse über die molekularen Ursachen von Krebserkrankungen zu erlangen, um neue Strategien in der Krebsbekämpfung entwickeln zu können.

1.1 Das Kolorektale Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Darmkrebs ist mittlerweile für beide Geschlechter die zweithäufigste Krebserkrankung. Die Inzidenz zeigt eine regionale Abhängigkeit, sie ist am häufigsten in den westlichen Industriestaaten [1]. Das geringste Vorkommen findet sich in Asien, Afrika und Südamerika. Sofern Emigranten aus diesen Ländern einen westlichen Lebensstil übernehmen, gleichen sich die Risiken an. Bei uns in Deutschland rangiert das kolorektale Karzinom bei den Männern nach dem Prostatakarzinom an zweiter Stelle, bei den Frauen nach dem Mammakarzinom ebenfalls an zweiter Stelle.

Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland wird für Männer und Frauen jeweils auf etwas über 35.000 geschätzt. Männer erkranken im Mittel mit 69 Jahren, Frauen mit 75 Jahren [2]. Seit Mitte der 80er Jahre steigt die Neuerkrankungsrate nicht mehr weiter an. Das Lebenszeitrisko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, liegt bei etwa 4-6%, an einem solchen Tumor zu sterben bei etwa 2,5-3% [3].

Darüber hinaus ist Darmkrebs für Frauen und Männer die zweithäufigste Krebstodesursache [2].

1.1.2 Ätiologie

Neben genetischen Faktoren wie der Familiären adenomatösen Polyposis, den kolorektalen Karzinomen in der Familienanamnese oder dem hereditären nichtpolypösen Kolonkarzinom-syndrom, gibt es auch Risikoerkrankungen, die die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms fördern können. Dazu zählen kolorektale Adenome, langjährige chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, sowie Karzinome von Mamma, Ovar und Corpus uteri [4]. Weitere Risikofaktoren sind ballaststoffarme, fettreiche und fleischreiche Ernährung, Übergewicht, ein Alter über 40 Jahren, langjähriges Zigarettenrauchen und regelmäßiger Alkoholkonsum.

1.1.3 Prognose

Für die Einteilung der Tumorausbreitung wird die UICC-Klassifikation in ihrer letzten Version von 2002 (Sobin 2002 [UICC 2002]) mit der TNM-Einteilung und Stadiengruppierung benutzt. Die Prognose der Tumorkrankheit korreliert mit der Eindringtiefe des Tumors in die Darmwand und seiner Ausdehnung in benachbarte Strukturen (T), dem Ausmaß des Befalls von Lymphknoten (N) und der Fernmetastasierung (M).

Die früher übliche Einteilung nach Dukes mit der Modifikation von Astler-Coller sollte nicht mehr benutzt werden. Da im täglichen Umgang die Dukes-Klassifikation allerdings immer noch Verwendung findet, wird sie an dieser Stelle noch einmal mit aufgeführt [5; 6].

Tabelle 1: Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms

Stadium 0	Tis	N0	M0	
Stadium I	T1,T2	N0	M0	Dukes A
	T2	N0	M0	
Stadium II	T3	N0	M0	Dukes B
	T4	N0	M0	
Stadium III	T1,T2	N1	M0	Dukes C
	T3, T4	N1	M0	
	Jedes T	N2	M0	
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1	

Die postoperative Beurteilung bezieht die pathohistologischen Befunde des Operationspräparates mit ein (pTNM).

Die Prognose des kolorektalen Karzinoms hängt in erster Linie davon ab, ob der Tumor kurativ entfernt werden kann oder nicht. Im Falle der kurativen Resektion stellt das Tumorstadium den entscheidenden prognostischen Faktor dar. Erwartungsgemäß sinken die Fünfjahresüberlebenszeiten in Abhängigkeit vom Tumorstadium.

Fünfjahresüberleben in Abhängigkeit vom Stadium [7, 8]:

Stadium I 90-100 %

Stadium II 78 %

Stadium III 54 %

Stadium IV 6 %

Die Mehrzahl der Patienten weist bei Erstdiagnose bereits das Stadium UICC II oder III auf.

1.1.4 Therapie

Nach wie vor stellt beim kolorektalen Karzinom die Operation die Therapie der Wahl dar [9], dabei bietet die R0-Resektion (kein Residualtumor) die einzige Heilungschance. Adjuvante Maßnahmen (zusätzliche Therapie, die nach einer potenziellen kurativen R0-Resektion Rezidive oder Metastasen verhindern soll), wie die Chemotherapie, können bei fortgeschrittenen Tumorstadien die Prognose verbessern. Die Effizienz neoadjuvanter Maßnahmen (präoperative (Radio-) Chemotherapie, um die Operabilität zu verbessern) wurde bisher beim Kolonkarzinom, im Gegensatz zum Rektumkarzinom nicht nachgewiesen [3].

Unter kurativer Zielsetzung besteht die chirurgische Therapie des kolorektalen Karzinoms in der Resektion des tumortragenden Dickdarmabschnittes mit ausreichendem Sicherheitsabstand unter Mitnahme des regionalen Lymphabflußgebietes, eventuell unter Mitentfernung adhärenter Organe (so genannte Multiviszzerale Resektion).

Das Resektionsausmaß bei der radikalen chirurgischen Therapie des Kolonkarzinoms hängt wesentlich von der Tumorlokalisation ab.

1.1.5 Metastasierung des Kolorektalen Karzinoms

Die Metastasierung des kolorektalen Karzinoms erfolgt häufig zunächst lymphogen, wobei die lymphogene Ausbreitung von der Tumorlokalisierung abhängt. Die parakolischen Lymphknoten gelten als regionäre Lymphknoten und bedeuten bei Befall ein pN1- oder pN2-Stadium. Darüber hinaus reichende Lymphknoten werden als juxtaregionäre Lymphknoten bezeichnet und gelten als Fernmetastasen. Die Bestimmung des Lymphknotenstatus erfolgt während der Operation routinemäßig.

Am häufigsten sind Fernmetastasen beim kolorektalen Karzinom in der Leber lokalisiert, am zweithäufigsten in der Lunge. Es folgen in der Häufigkeit Skelettmetastasen und Befall von Nebennieren und Gehirn. Isolierte Leber- und Lungenmetastasen können, eventuell mit vorgeschalteter Chemotherapie und unter Berücksichtigung streng vorgeschriebener Bedingungen, mit kurativer Zielsetzung entfernt werden.

1.2 Immunologische Aspekte bei Tumoren

1.2.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen besteht aus einer unspezifischen Abwehr, die in ein humorales und ein zelluläres System unterteilt wird und aus einer spezifischen Abwehr, welche im Wesentlichen durch Lymphozyten repräsentiert wird.

Zur unspezifischen Abwehr gehören angeborene und sofort verfügbare Abwehreinrichtungen. Diese sind bereits vor der Exposition mit infektiösen Mikroorganismen oder anderen fremden Makromolekülen vorhanden und reagieren bereits beim ersten Kontakt mit den Fremdstoffen. Zu dem zellulären unspezifischen Abwehrsystem zählen unter anderem physikalische Barrieren, phagozytierende Zellen, Eosinophile in Blut und Gewebe und die Natürlichen Killerzellen.

Zur humoralen unspezifischen Abwehr gehören außerdem das Komplementsystem und die Zytokine.

Das Komplementsystem besteht aus Enzymen und Enzymvorstufen, die körpereigene Abwehrzellen aktivieren (z.B. Makrophagen, Granulozyten, Thrombozyten), körperfremde Zellen lysieren und die Phagozytose von Mikroorganismen fördern.

Zytokine sind hormonartige Substanzen, die von T-Lymphozyten, Makrophagen und Granulozyten gebildet werden und die Proliferation und Differenzierung unter anderem von T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen anregen.

Auch die spezifische Abwehr lässt sich in ein humorales und ein zelluläres System unterteilen.

B-Lymphozyten machen etwa 15% der Lymphozyten im Blut aus. Nach dem Kontakt mit einem Antigen durch einen spezifischen Rezeptor an der Oberfläche ihrer Zellmembran wandeln sie sich zum Teil in Plasmazellen um und beginnen, Immunglobuline zu produzieren. Diese Immunglobuline repräsentieren als spezifische Antikörper das spezifische humorale Immunsystem. Ein anderer Teil antigenstimulierter B-Lymphozyten entwickelt sich zu langlebigen B-Gedächtniszellen.

Die spezifische zelluläre Abwehr wird durch T-Lymphozyten repräsentiert, sie machen etwa 60-80% der im Blut zirkulierenden Lymphozyten aus. Zu den einzelnen Subtypen der T-Lymphozyten gehören zytotoxische T-Zellen, T-Helferzellen, T-Suppressorzellen und T-Gedächtniszellen. T-Helferzellen setzen Lymphokine frei und stimulieren damit die Antikörperproduktion, andere Lymphozytensubtypen und die Makrophagen. Zytotoxische T-Zellen können antigenträgende Zellen zerstören. T-Suppressorzellen hemmen die Aktivität von T- und B-Lymphozyten und verhindern dadurch eine überschießende Immunreaktion.

1.2.2 Tumorimmunität

Das Immunsystem spielt im Zusammenhang mit malignen Tumoren eine wichtige Rolle und die Ausprägung der Immunitätslage von Patienten mit unterschiedlichen Neoplasien war und ist bis heute Gegenstand der Forschung [10].

Aufgrund der immer noch unbefriedigenden Ergebnisse bei der Therapie von bösartigen Tumoren treten Therapiekonzepte, die eine Immunstrategie berücksichtigen, immer mehr in das Zentrum des Interesses.

Der Prozess der malignen Transformation geht mit der Expression von Molekülen auf den Tumorzellen einher, so genannten Tumorantigenen, die vom Immunsystem als fremd erkannt werden können. Dadurch besteht potentiell die Möglichkeit, dass veränderte Zellen durch das Immunsystem erkannt und vor dem Heranwachsen zu Tumoren zerstört oder, dass bestehende Tumoren durch Immunreaktionen eliminiert werden können.

Mehrere Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass sich bei bestimmten Krebspatienten eine protektive Tumorimmunität ausbilden kann, die sich in der Spontanrückbildung von bösartigen Tumoren manifestiert. Diese Rückbildungen sind allerdings meist nur inkomplett und temporär.

Wird das Immunsystem supprimiert, wie zum Beispiel bei Transplantatempfängern oder AIDS-Patienten, so ist das Malignomrisiko deutlich erhöht.

Andererseits entstehen maligne, zum Tode führende Neoplasien ebenso bei immun-kompetenten Personen. Im Zweikampf zwischen Tumor und Immunsystem gewinnt leider meist der Tumor.

Auch für das Kolonkarzinom wurden verschiedene Mechanismen beschrieben, mit denen die zum Teil hochangepassten Tumorzellen in der Lage sind, sich einer erfolgreichen Immunantwort zu entziehen. Dies bietet Erklärungen dafür, dass selbst sogenannte immunogene Krebszellen trotz ablaufender Immunreaktionen weiter wachsen können.

Zu diesen Mechanismen, so genannten Tumorescapemechanismen, gehört die Herunterregulation von MHC-Klasse-I-Molekülen. Dies sind Proteine auf der Oberfläche der Tumorzellen, die an der Präsentation von Antigenen beteiligt sind. Durch eine Herunterregulation können die Tumorzellen einer Erkennung und damit schließlich der Lyse durch zytotoxische T-Zellen entgehen. Eine Assoziation mit Tumorprogredienz ist bereits für einige Karzinome, darunter auch das kolorektale Karzinom, nachgewiesen worden [11, 12]. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Phänomen ebenfalls untersucht.

Ein weiterer Tumorescapemechanismus ist die Expression eines funktionslosen Fas-Rezeptors. In der Regel wird über den Fas-Rezeptor der programmierte Zelltod (Apoptose) in den Tumorzellen ausgelöst. Bei Funktionsverlust des Rezeptors kann die Fas-vermittelte Apoptose der malignen Zellen wirkungsvoll verhindert werden [13]. Apoptose ist im Immunsystem normalerweise der Hauptmechanismus, über den autoreaktive Immunzellen, aber auch aktivierte Immunzellen, die nach einer Immunantwort nicht mehr benötigt werden, eliminiert werden. Diese Reaktionen werden meist durch das Fas/Fas-Liganden-System vermittelt. Allerdings kann, sozusagen als „Counterattack“ durch die Tumorzellen, der Fas-Ligand auch in membrangebundener und/oder löslicher Form von Tumorzellen exprimiert werden [14]. Diese können nun in potentiell zytotoxischen aktivierten T-Zellen im Gegenangriff Fas-vermittelte Apoptose induzieren und sich durch diesen Escapemechanismus der T-Zellüberwachung entziehen [15]. Auch für das kolorektale Karzinom ist der Mechanismus des „Counterattack“ durch die Tumorzellen nachgewiesen worden [16]. Wir haben dies nicht nur in den Kolonkarzinomen mit unterschiedlichem Lymphknotenbefall, sondern auch in den Lebermetastasen untersucht.

Eine weitere Ursache für eine eingeschränkte Immunantwort ist das so genannte Immunzelltrapping, das bereits für das Pankreaskarzinom beschrieben wurde [17]. Hierbei finden sich die Immunzellen nur in geringer Anzahl meist im Abstand um die Tumorzellnester und können so keinen direkten Einfluss auf diese nehmen. Dieses Phänomen wurde in ähnlicher Form von Galon et al. beschrieben [18, 19] und wurde in dieser Arbeit

sowohl in den kolorektalen Karzinomen als auch in den Lebermetastasen kolorektaler Karzinome als Primärtumor analysiert.

Zusätzlich führt eine Einschränkung der Aktivität tumorinfiltrierender Lymphozyten durch Verlust signalvermittelnder Moleküle in der T-Zelle zu einer erheblichen Einschränkung der T-zellulären Abwehrmöglichkeiten im Tumor [17]. Diesen bisher nur unzureichend untersuchten Aktivitätsverlust überprüften wir in dieser Arbeit für kolorektale Karzinome und Lebermetastasen.

1.3 In dieser Arbeit untersuchte Zellen und Moleküle

1.3.1 T-Lymphozyten (gefärbte Marker: CD4, CD8, CD3 ϵ , CD3 ζ)

Im Rahmen zellvermittelter Immunreaktionen spielen T-Zellen eine zentrale Rolle [20].

T-Lymphozyten werden weiter unterteilt in funktionelle Subpopulationen, wovon am besten die T-Helfer-Zellen und die zytotoxischen T-Zellen charakterisiert sind.

T-Helfer-Zellen tragen in der Regel den CD4-Marker, sie erkennen ihr Antigen, wenn es durch MHC-Klasse-II-Antigen präsentiert wird. Nach der Antigenstimulation sezernieren T-Helfer-Zellen Zytokine, die die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen und anderen Zellen, einschließlich der B-Zellen und Makrophagen anregen.

Zytotoxische T-Zellen tragen meist den CD8-Marker, sie bedienen sich der MHC-Klasse-I-Moleküle und können Zellen lysieren, die körperfremde Antigene exprimieren [21].

Der T-Zellrezeptor (TCR) ist verantwortlich für die MHC-restringierte Antigenerkennung [21]. Er ist ein Heterodimer das meist aus den zwei Polypeptidketten α und β , seltener auch aus einer γ - und δ -Kette, besteht. Das TCR- $\alpha\beta$ -Heterodimer ermöglicht es den T-Zellen, Peptidantigene, die an MHC-Moleküle gebunden sind, zu erkennen. Aber sowohl die Zelloberflächenexpression der TCR-Moleküle, als auch ihre Funktion bei der Aktivierung der T-Zellen sind von vier bis fünf anderen Proteinen, die mit dem $\alpha\beta$ -Heterodimer assoziiert sind, abhängig. Zusammen bilden diese Proteine den funktionellen TCR-Komplex. Drei Bestandteile dieses Komplexes werden als CD3-Proteine bezeichnet und beinhalten eine γ -Kette, eine δ -Kette und eine ϵ -Kette, diese werden konstant exprimiert. Zusätzlich enthalten die TCR-Komplexe aktivierter T-Zellen ein Homodimer einer ζ -Kette.

Der CD3-Proteinkomplex wird von allen T-Lymphozyten exprimiert. Eine wichtige Funktion des CD3-Komplexes ist die Weiterleitung der im Rahmen der Antigenerkennung von α/β -TCR (γ/δ) gebildeten Signale, die dann die intrazelluläre T-Zell-Aktivierung einleiten.

Als Marker der T-Zell-Aktivität kann die CD3 ζ -Kette dienen, die nur in aktivierten T-Zellen exprimiert wird und für die Signaltransduktion in die Zelle verantwortlich ist. Naive T-Zellen exprimieren diese ζ -Kette nicht.

1.3.2 Die MHC-I-Expression (gefärbter Marker: MHC-Klasse-I-Komplex; W6/32)

Der Haupthistokompatibilitätskomplex ist eine Region von hochpolymorphen Genen, deren Produkte auf der Oberfläche einer Vielzahl von Zellen exprimiert werden [21]. Alle kernhaltigen Zellen exprimieren in unterschiedlichem Maße Klasse-I-MHC-Antigene. Sie dienen unter anderem als zelloberflächenständige Strukturen mit der Aufgabe, CD8+ zytotoxischen T-Zellen Bruchstücke von fremdem Antigen zu präsentieren [21].

1.3.3 B-Lymphozyten (gefärbter Marker: CD79a)

B-Lymphozyten sind für die humoralen Immunreaktionen verantwortlich, sie wandeln sich nach Bindung eines Antigens in Antikörper-sezernierende Zellen um und reifen dabei zu Plasmazellen heran. Bei lang anhaltender Antigenstimulation werden B-Gedächtniszellen ausgebildet, die auf spezifische Antigene bei Reexposition schneller reagieren können. Eine weitere wichtige Funktion ist die Präsentation von Antigenen für T-Zellen.

1.3.4 Natürliche Killerzellen (gefärbter Marker: CD16)

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) stellen eine heterogene Untergruppe von Lymphozyten dar mit der Fähigkeit spontan, antigenunabhängig und genetisch nicht restringiert bestimmte Zielzellen *in vitro* zu zerstören. NK-Zellen exprimieren konstitutiv den IL-2-Rezeptor, sie proliferieren nach Bindung von IL-2, ohne dass sie vorher aktiviert werden müssen. Den NK-Zellen ist in der Vergangenheit eine Vielzahl von biologischen Wirkungen zugeschrieben worden, zum Beispiel bei der Modulation der Hämatopoese. Sie spielen offenbar auch eine Rolle in der Graft-versus-host-Reaktion. Darüber hinaus sind NK-Zellen häufig im Zusammenhang mit der Abwehr insbesondere von viralen Infektionen und von Tumoren genannt worden. Dennoch wird ihre biologische Bedeutung immer noch kontrovers diskutiert [20].

1.3.5 Neutrophile Granulozyten (gefärbter Marker: KiMy2)

Neutrophile Granulozyten stellen die Mehrheit der zirkulierenden Leukozyten dar. Im Allgemeinen sind diese Zellen am raschesten und in hoher Zahl an einem Ort bakterieller Infektion oder zerfallenden Gewebes zu mobilisieren, da sie schon auf geringe chemotaktische Reize reagieren. Phagozytose und intrazelluläres Abtöten von Bakterien ist ihre Hauptaufgabe. Stark erniedrigte Zahlen an Neutrophilen Granulozyten (wie es auch bei verschiedenen Tumorerkrankungen der Fall sein kann), weisen auf eine Schwächung der Immunabwehr hin.

1.3.6 Makrophagen (gefärbter Marker: KiM1p)

Die wichtigsten Funktionen von Makrophagen sind Phagozytose, Zytotoxizität, Kooperation mit Lymphozyten und Sekretion verschiedenster biologisch aktiver Produkte. Zytotoxizität gegen Tumorzellen scheint eine weitere bedeutsame Funktion von Makrophagen zu sein [20] und tritt nur bei einem Zustand der Aktivierung durch eine Kooperation mit T-Lymphozyten über die Freisetzung von Lymphokinen auf.

1.3.7 Dendritische Zellen (gefärbte Marker: CD83, KiM4)

Dendritische Zellen gehören zur Gruppe Antigenpräsentierender Zellen (APZ) und spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung spezifischer Immunantworten gegen Pathogene. Erst kürzlich wurde entdeckt, dass sie möglicherweise eine wichtige Rolle bei der biologischen Immunantwort gegen maligne Tumore spielen [22].

Es gibt verschiedene Differenzierungsgrade dendritischer Zellen, so finden sich folliculäre dendritische Zellen vor allem in Keimzentren von Lymphfollikeln (z.B. im Lymphknoten, Peyer-Plaques). Sie zeigen Phagozytose-Aktivität und sind für die Antigenpräsentation zuständig. Sie interagieren mit B- und T-Lymphozyten, durch Sezernierung von Zytokinen werden Lymphozyten aktiviert und zur Proliferation angeregt.

Langerhans-Zellen finden sich in Haut und Schleimhäuten, nehmen Antigene über Phagozytose auf und wandern in die regionären Lymphknoten. Hier siedeln sie als vollständig differenzierte so genannte interdigitierende dendritische Zellen in den T-Zell-Gebieten und aktivieren T-Zellen antigenspezifisch, indem sie ihnen die Moleküle der Antigene präsentieren. Interdigitierende dendritische Zellen sind die potentesten Stimulatoren für naive T-Lymphozyten. Dieser für die erworbene Immunantwort zentrale Vorgang betrifft sowohl CD4⁺ Lymphozyten als auch CD8⁺ Lymphozyten und wird als „priming“ bezeichnet.

1.3.8 Die Expression des Fas-Liganden (gefärbter Marker: Fas-Ligand)

Fas gehört zur Familie der Tumornekrosefaktor-Zelloberflächenrezeptoren. Das Fas-System ist an der Induktion der Apoptose, des programmierten Zelltodes, beteiligt. Apoptose wird unter anderem ausgelöst, wenn der Fas-Ligand (CD 95L) an seinen Oberflächenrezeptor Fas bindet und spielt bei der Homöostase und Entwicklung aller Gewebe innerhalb eines Organismus eine wichtige Rolle. Der Klon 94, welcher von uns verwendet wurde, erkennt die lösliche Form, der Klon 2 die membranständige Form des humanen Fas-Liganden. Fas-Ligand wird bevorzugt auf aktivierten T-Zellen und Natürlichen Killerzellen exprimiert.

Fas-induzierte Apoptose in aktivierten T-Lymphozyten könnte einen weiteren Tumorescape-Mechanismus darstellen [23, 24].

1.3.9 Zytokeratin (gefärbter Marker: KL-1)

Zytokeratine werden von epithelialen Zellen gebildet und repräsentieren als Intermediärfilamente den wichtigsten Teil des Zytoskeletts, sie sind zytoplasmatisch lokalisiert. Es gibt eine Reihe von Antikörpern mit einer Spezifität für einzelne Zytokeratine, mehrere Zytokeratine und Zytokeratingruppen. Als Marker für Panzytokeratin bietet sich KL-1 an. Antikörper gegen einzelne Zytokeratine helfen bei der Klärung der Histogenese eines Tumors. Nicht selten wird ein Tumor erst durch eine Metastase in einem Lymphknoten oder einem inneren Organ auffällig. Durch die immunhistologische Untersuchung des Zytokeratinprofils mit nur wenigen Antikörpern kann die Primärlokalisation des Tumors häufig eingegrenzt werden, zusammen mit weiteren Tumormarkern ist dabei eine definitive Aussage über den Primärtumor möglich.

1.4 Fragestellungen und Zielsetzung der Arbeit

Vor dem Hintergrund der beschriebenen Befunde war das Ziel dieser Promotionsarbeit die Charakterisierung des Immunzellinfiltrates im primären kolorektalen Karzinom unterschiedlicher nodaler Metastasierung, sowie in Lebermetastasen von Patienten mit einem kolorektalen Karzinom als Primärtumor.

Als Grundlage für diese Arbeit standen Resektionspräparate von Patienten mit diesen Karzinomen für Forschungszwecke zur Verfügung, die im Rahmen der am Klinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel durchgeführten Gewebebankstudie von Patienten während der Operation gewonnen wurden.

Im Einzelnen sollte aus diesen Patientenpräparaten mit immunhistologischen Methoden eine qualitative und semiquantitative Analyse des zellulären Infiltrates erfolgen. Hierdurch sollte Aufschluss über das Ausmaß, die Zusammensetzung, die Aktivität und die Topologie der Immunzellen untereinander und zu den Tumorzellen sowohl im Primärtumor, als auch in den Metastasen gewonnen werden. Außerdem sollten diese Befunde mit verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern verglichen werden, um vorhandene Abhängigkeiten, insbesondere vom Überleben der Patienten, herauszuarbeiten.

Einen weiteren wichtigen Aspekt dieser Promotionsarbeit stellte der Vergleich der Ergebnisse des kolorektalen Karzinoms mit denjenigen des Pankreaskarzinoms dar, die in der

Promotionsarbeit von Herrn Andres Bayer ebenfalls am Klinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, beschrieben wurden [25].

Ausgehend von der deutlich unterschiedlichen Prognose von Pankreas- und Kolonkarzinom-Patienten und vor dem Hintergrund publizierter Daten, die jedoch keinen direkten Vergleich der Ergebnisse erlauben, erwarteten wir Aufschlüsse über eine anzunehmende unterschiedliche Immunbiologie beider gastrointestinaler Tumoren.

1.4.1 Untersuchte Zellen und Marker

Das zelluläre Infiltrat wurde dazu auf die Immunzellen mit obigen Markern untersucht. Ebenfalls wurde die Expression des Fas-Liganden und der MHC-Klasse-I im Hinblick auf die bereits erwähnten Tumorescapemechanismen untersucht, da insbesondere die ubiquitäre Expression des Fas-Liganden aufgrund von Kreuzreaktionen der verwendeten Antikörper wiederholt bezweifelt wurde. Eine erneute Expressionsanalyse erfolgte deshalb mit einem neuen Antikörper, von dem bis jetzt keine Kreuzreaktionen beschrieben wurden und der auf Gefrierschnitten verwendet werden kann.

Als Kontrolle für die Auswertungen diente der Marker KL-1, der spezifisch ist für Zytokeratin, welches von allen Tumorzellen exprimiert wird.

2 Material und Patientenkollektiv

2.1 Patientenkollektiv

Als Grundlage für diese Arbeit standen kryoasservierte Resektionspräparate von Patienten mit kolorektalen Karzinomen für Forschungszwecke zur Verfügung. Diese wurden im Rahmen der an der Christian-Albrechts-Universität Kiel durchgeführten Gewebebankstudie, gefördert durch die Firma Merck/Darmstadt, während der Operation von Patienten in den Jahren 1999 bis 2002 gewonnen (Forschungsprojekt: Aufbau einer Krebsgewebesammlung Aktenzeichen A 110/99).

Die in dieser Arbeit verwendeten Resektionspräparate wurden hinsichtlich des Lymphknotenbefalls ausgewählt, dabei wurde darauf geachtet, dass zu etwa gleichen Teilen Patienten ohne pathologischen Lymphknotenbefall (mit mehr als 12 untersuchten Lymphknoten) und Patienten mit Lymphknotenbefall des Stadiums N2 in die Studie aufgenommen wurden.

Das Kollektiv der untersuchten Patienten mit Kolonkarzinomen setzte sich wie folgt zusammen:

Ursprünglich sollten Tumorblöcke von 52 Patienten untersucht werden. 5 Blöcke mussten wegen Gefrierbrand oder aufgrund zu geringer Tumormitschnitte aus der Arbeit herausgenommen werden.

Untersucht wurden schließlich 47 histologische Präparate, darunter waren 24 Frauen und 23 Männer im Alter von 48 bis 86 Jahren, das Durchschnittsalter betrug 66,2 Jahre.

Hinsichtlich des histologischen Differenzierungsgrades konnten alle Tumoren als mäßig differenziert (G2) klassifiziert werden.

Die Stadieneinteilung zur Bestimmung der Ausbreitung der Erkrankung im Organismus erfolgte nach dem TNM-System. Dabei wies die überwiegende Zahl der Patienten (36) ein T3-Stadium auf, zehn Präparate zeigten das Stadium T2 und eines T4; Fernmetastasen und damit ein M1-Stadium zeigte ein Patient zum Zeitpunkt der Operation, drei Patienten waren hinsichtlich Fernmetastasen nicht beurteilbar (Mx). Alle Patienten wurden R0-reseziert.

Bezüglich des Lymphknotenbefalls wiesen 27 Patienten ein N0-Stadium auf und 20 Patienten zeigten zusätzlich zum Befall regionaler Lymphknoten weitere befallene Lymphknotenstationen (N2).

Des Weiteren wurde das immunzelluläre Infiltrat in Lebermetastasen untersucht, Primärtumor war jeweils das kolorektale Karzinom.

Das analysierte Kollektiv setzte sich aus 21 Lebermetastasen zusammen von jeweils acht Frauen und 13 Männern zwischen 45 und 79 Jahren, das Durchschnittsalter betrug 64 Jahre.

Die tiefgefrorenen Tumorblöcke sowohl der Kolonkarzinome als auch der Lebermetastasen erhielten wir freundlicher Weise von Herrn Dr. med. B. Sipos aus dem Pathologischen Institut der Universität Kiel.

2.2 Verwendete Antikörper

Das Infiltrat von Immunzellen wurde in den Präparaten untersucht und mit den im Folgenden beschriebenen primären Antikörpern (vgl. Tabelle 2) immunhistochemisch angefärbt.

1. T-Lymphozyten:

- Monoklonaler Antikörper gegen das **CD4**-Antigen, welches auf T-Helfer-Zellen exprimiert wird.
- Monoklonaler Antikörper gegen das **CD8**-Antigen, das von zytotoxischen T-Lymphozyten exprimiert wird.
- Monoklonaler Antikörper gegen das **CD3 epsilon**-Antigen, ein Protein, das zum CD3/T-Zellrezeptorkomplex gehört und von allen T-Lymphozyten konstitutiv exprimiert wird.
- Monoklonaler Antikörper gegen das **CD3 zeta**-Antigen, ein Protein das ebenfalls zum CD3/T-Zellrezeptorkomplex gehört, funktionell für die Signaltransduktion nach intrazellulär und damit für die Aktivierung der T-Lymphozyten zuständig ist.

2. Natürliche Killerzellen: monoklonaler Antikörper gegen das **CD16** Antigen.

3. Neutrophile Granulozyten: Antikörper gegen **KiMy2**.

4. Makrophagen: monoklonaler Antikörper gegen **KiM1p**, Klon CD68.

5. Dendritische Zellen: monoklonaler Antikörper gegen **CD83**, das auf follikulären, interdigitierenden und zirkulierenden dendritischen Zellen exprimiert wird.

6. Follikuläre dendritische Zellen: monoklonaler Antikörper gegen **KiM4**.

7. B-Lymphozyten: monoklonaler Antikörper gegen **CD79a**.

8. Die MHC-1-Expression wurde mit dem Antikörper **W6/32** untersucht.

9. Die Expression des **Fas-Liganden** wurde durch einen monoklonalen Antikörper gegen dieses Protein nachgewiesen. Fas-Ligand wird von aktivierten Lymphozyten, Monozyten und NK-Zellen exprimiert, er gehört zur TNF-Familie und induziert über die Bindung von Fas Apoptose.
10. **KL-1** als Marker gegen Zytokeratin, der von allen Tumorzellen exprimiert wird und somit als Tumormarker diene.

Tabelle 2: verwendete Antikörper

Antikörper	Zielstruktur	Klon	Katalog-Nr.	Firma/Herkunft	Verdünnung
CD4	T-Lymphozyten	M-T441	148-020	Ancell	1:8000
CD8	T-Lymphozyten	14	154-020	Ancell	1:8000
CD3ε	T-Lymphozyten	UCHT1	144-020	Ancell	1:2000
CD3ζ	T-Lymphozyten	2H2D9(TIA-2)	PNIM2549	Immunotech	1:50
CD16	NK-Zellen	3G8	165-020	Ancell	1:5000
KiMy2	Neutrophile Gran.			Prof. Dr. Wacker, Kiel	1:10.000
KiM1p	Makrophagen	PG-M1	M0876	DAKO	1:50
CD83	Dendrit. Zellen	HB15e	36931A	Pharmingen	1:250
KiM4	fol.l.dendr.Zellen			Prof. Dr. Wacker, Kiel	1:500
CD79a	B-Lymphozyten	HM47	35751A	Pharmingen	1:2000
W6/32	MHC-I			Prof. Dr. Zavazava, Kiel	1:10.000
FAS-L	Fas-Ligand	94	Dia 60	Dianova	1:20
KL-1	Zytokeratin	KL-1	1918	Immunotech	1:1000

Mit diesen Antikörpern wurden jeweils 2 Gewebeschnitte jedes einzelnen Kolonkarzinomblocks und jeweils ein Gewebeschnitt jedes Lebermetastasenblocks angefärbt.

Um die ordnungsgemäße Verwendung und Funktion der Reagenzien sowie die korrekte Durchführung der Versuche zu gewährleisten, wurde bei jeder Färbeserie ein positiver Kontrollschnitt mitgefärbt. Hierfür wurden Kryoschnitte von Lymphknoten benutzt.

Ebenso wurden für jede Antikörperfärbung unspezifische Isotypenkontrollen anstelle des Primärantikörpers verwendet, um das Ausmaß einer unspezifischen Anfärbung beurteilen zu können und somit eine bessere Interpretation der spezifischen Anfärbung zu ermöglichen.

Bei den Antikörpern KiMy2 und Fas Ligand diente die Färbung mit bovinem Serumalbumin (BSA) als negative Kontrolle. Für die Negativkontrollen wurden ebenfalls Lymphknoten-Gefrierschnitte benutzt.

Die Antikörper KiMy2, KiM1, KiM4 und W6/32 wurden bei einer Temperatur von -30°C (Gefrierschrank „Comfort“, Liebherr, GS-5203) gelagert, alle übrigen Antikörper wurden bei $+4^{\circ}\text{C}$ (Kühlschrank Liebherr, Typ: KSD3224-5) aufbewahrt.

2.3 Verwendete Reagenzien zur Färbung

ChemMate DAKO EnVision Detection Kit, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse

- ChemMate DAKO EnVision/HRP, Rabbit/Mouse
100ml, gebrauchsfertig
Mit Peroxidasmolekülen und sekundären Ziegenantikörpermolekülen gegen Kaninchen- und Mausimmunglobuline gekoppeltes Dextran. In Pufferlösung mit stabilisierendem Protein und Konservierungsmittel.
- ChemMate Substrate Buffer
250ml
Pufferlösung mit Wasserstoffperoxid und Konservierungsmittel
- ChemMate DAB+ Chromogen
5ml, 50-fache Konzentration
3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid in organischem Lösungsmittel.
- Mayers Hämalaun (Merck, 1.09249.0500) 3:1 verdünnt (mit Leitungswasser)
- Peroxidase Blocking Reagent, ready-to-use, Katalognummer S2001

Das zum Kit gehörende ChemMate DAKO EnVision/HRP, Rabbit/Mouse-Nachweisreagenz besteht aus einem Dextran-Rückgrat, an das eine grosse Zahl Peroxidase (HRP)-Moleküle und sekundäre Antikörpermoleküle gekoppelt wurden. Der Kopplungsreaktion liegt ein

einzigartiger Chemismus zugrunde, der die Bindung von bis zu 100 HRP-Molekülen und bis zu 20 Antikörpermolekülen pro Rückgrat ermöglicht. Der sekundäre Antikörper, der an das Dextran-Rückgrat gekoppelt ist, wurde in Ziegen herangezogen. Er reagiert gleich gut mit Kaninchen- und Mausimmunglobulinen, so dass nur ein Nachweisreagenz für primäre Kaninchen- und Mausantikörper benötigt wird.

Das Substratsystem besteht aus zwei Komponenten, ChemMate DAB+Chromogen, einer konzentrierten Diaminobenzidin(DAB)-Lösung und ChemMate Substrate Buffer mit Wasserstoffperoxid. Vor dem Gebrauch muss das DAB+Chromogen in dem Substratpuffer gemäß einem von DAKO empfohlenen Protokoll verdünnt werden. Das Substratsystem erzeugt an der Stelle des Zielantigens eine braune Färbung.

Zur Gegenfärbung wurde Mayers Hämalaun benutzt, da es eine eindeutige blaue Anfärbung des Zellkerns bewirkt.

Peroxidase Blocking Reagent enthält Wasserstoffperoxid und Natriumazid und unterdrückt so eine unspezifische Färbung aufgrund endogener Peroxidase- und Pseudoperoxidaseaktivität bei immunhistochemischen Färbeverfahren auf Peroxidasebasis, ohne dass jedoch die antigenen Stellen oder die Gewebemorphologie dabei bedeutsam beeinträchtigt werden.

3 Methodik

3.1 Anfertigung der Kryoschnitte am Mikrotom

Zum Anfertigen der Kryoschnitte wurden die eingefrorenen Kolonkarzinomblöcke gegen Wärme geschützt in einer Styropor-Kiste zum Mikrotom-Kryostat HM 500 OM (Carl Zeiss) transportiert. Die Box-Temperatur betrug -18°C , der Objektisch wurde auf eine Temperatur von -25°C eingestellt.

Der jeweilige Tumorblock wurde nun mit Hilfe von Einbettmedium für Gefrierschnitte (Leica instruments GmbH, Nussloch, Katalognummer: 020108926) auf dem Objektisch fixiert.

Von jedem Block wurden die ersten Schnitte verworfen, bis eine gleichmäßige glatte Oberfläche vorhanden war, die sich gut schneiden ließ. Die Schnitte mussten so flach und faltenfrei wie möglich auf den Objektträgern aufgebracht werden, um die Anfärbungsergebnisse nicht zu beeinträchtigen. Das Mikrotom wurde auf eine Schnittdicke

von 5 µm eingestellt und es wurden pro Tumorblock 60 Gewebeschnitte auf 30 Objektträgern (Histo Bond 75x25x1mm, Superior Marienfeld, Katalognr. 901236) angefertigt.

Über Nacht wurden die Gewebeschnitte luftgetrocknet und am nächsten Morgen 10 Minuten in Aceton (Firma Merck Darmstadt, K30276814 206) fixiert. Um die Schnitte vor Feuchtigkeit zu schützen, wurden sie unter Vakuum eingeschweißt und in einer Gefriertruhe bei -30°C aufbewahrt.

Von den Lebermetastasen wurden auf die gleiche Art Serienschnitte angefertigt, fixiert und gelagert.

3.2 Immunhistochemische Färbemethoden

Die hergestellten Gewebeschnitte wurden zunächst per Hand nach dem folgenden Protokoll immunhistochemisch gefärbt, bis die optimalen Verdünnungen der jeweiligen Antikörper ausgetestet waren, mit denen die besten Färbeergebnisse erzielt werden konnten.

Später wurde der zeitsparende DAKO-Autostainer für die weiteren Färbungen benutzt, der zwar in einzelnen Schritten, aber nicht für die Ergebnisse relevant von der Handfärbung abweicht.

3.2.1 Immunhistochemische Färbung per Hand

- Die gefrorenen, in Aceton fixierten Kryoschnitte wurden ca. eine Stunde vor Färbebeginn aufgetaut und die speziellen, ausgetesteten Antikörper-Verdünnungen hergestellt.
- Als nächstes wurde eine feuchte Kammer vorbereitet.
- Die Gewebe wurden nun fünf Minuten in PBS auf einem Vortex Genie-2 Schüttler (Scientific Industries, Model: G560E) gepuffert (wobei die Gewebe niemals austrocknen durften).
- Das PBS wurde abgeklopft, die Objektträger in die feuchte Kammer gelegt und jeweils 100 µl Antikörperlösung auf jede Gewebeprobe und auf jede Negativkontrolle gegeben, mit der Pipettenspitze verteilt (jeweils neue Pipettenspitze verwendet) und 40 Minuten inkubiert.
- Anschließend wurden die Präparate fünf Minuten in PBS gewaschen und wieder abgeklopft.

- Nun kamen jeweils zwei Tropfen (100 µl) Peroxidase Blocking Reagent, ready-to-use (DAKO, Katalognummer: S2001) auf jeden Gewebeschnitt, der so 20 Minuten inkubiert wurde.
- Dieser Schritt wurde insgesamt drei Mal wiederholt, wobei die Objektträger zwischen den einzelnen Schritten abgeklopft werden mussten.
- Anschließend wurde wieder fünf Minuten in PBS gewaschen und dann abgeklopft.
- Nun wurde jeweils ein Tropfen EnVision/HRP Detection Kit, DAB+ (DAKO, Katalognummer K5007) auf jede Gewebeprobe gegeben, mit der Pipettenspitze verteilt und 20 Minuten inkubiert.
- Dann wurde abermals fünf Minuten in PBS gewaschen und dieses anschließend abgeklopft.
- Nun wurde DAB in der gewünschten Konzentration (gemäß Protokoll der Firma DAKO) gemischt, ein Tropfen auf jedes Gewebe gegeben, zehn Minuten inkubiert, abgeklopft und zum Schluss DAB in speziellem Giftmüllbehälter verworfen.
- Zur Gegenfärbung wurde Mayers Hämalaun (Merck, 1.09249.0500) 3:1 verdünnt (mit Leitungswasser), je ein Tropfen auf jeden Schnitt gegeben, fünf Minuten inkubiert, wieder abgeklopft und fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen.
- Die angefärbten Gewebeproben wurden dann durch die aufsteigende Ethanolreihe gezogen (50%, 70%, 100%, für jeweils zwei Mal eine Minute) (Ethanol vergällt, Merck Darmstadt), anschließend zehn Minuten in Xylol dehydriert und feucht mit DePeX- Medium (Serva, Katalognummer: 14576) eingedeckelt, wobei Deckgläser der Größe 24x60mm (Menzel-Gläser) verwendet wurden.
- Zum Schluss wurden die Präparate noch einmal kontrolliert, eventuell entstandene Luftblasen beseitigt und über Nacht getrocknet.

3.2.2 Färbung mit dem DakoCytomation Autostainer

Um zeitsparender zu arbeiten wurde der DakoCytomation Autostainer eingesetzt, der mittels eines speziellen Softwareprogramms auf einem Computer (IBM Personal Computer 300 PL) nach dem in 3.2.1 aufgeführten Färbeprotokoll programmiert wurde.

Um sicher zu stellen, dass durch diese Färbemethode keine Unterschiede in den Ergebnissen entstehen würden, wurden zunächst Testfärbungen durchgeführt, bevor die Präparate zur endgültigen Auswertung angefärbt wurden.

Vor jeder Anwendung des Autostainers wurde eine neue Maske („Template“) erstellt, wie sie unten dargestellt ist:

Slide	R Primary Antibody 100 µl	R End.Enz. Block 100 µl	R End.Enz. Block 100 µl	R Secondary Reagent 100 µl	R S w Substrate 100 µl	R S w 10 min	R S w 10 min
1	CD3 zeta: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
2	CD3 zeta: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
3	CD3 zeta: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
4	CD3 zeta: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
5	CD3 zeta: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
6	CD3 zeta: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
7	CD3 zeta: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
8	CD3 zeta: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
9	CD3 zeta: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
10	CD3 zeta: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
11	CD3 zeta: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
12	CD3 zeta: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
13	CD3 zeta: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
14	CD3 zeta: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
15	CD3 zeta: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
16	CD3 zeta: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
17	CD3 zeta: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
18	CD3 zeta: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
19	CD3 zeta: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
20	CD3 zeta: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
21	CD3 zeta: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
22	CD3 zeta: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
23	CD3 zeta: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
24	CD3 epsilo: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
25	CD3 epsilo: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
26	CD3 epsilo: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
27	CD3 epsilo: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
28	CD3 epsilo: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
29	CD3 epsilo: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
30	CD3 epsilo: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
31	CD3 epsilo: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
32	CD3 epsilo: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
33	CD3 epsilo: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
34	CD3 epsilo: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
35	CD3 epsilo: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
36	CD3 epsilo: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
37	CD3 epsilo: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
38	CD3 epsilo: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
39	CD3 epsilo: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
40	CD3 epsilo: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
41	CD3 epsilo: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
42	CD3 epsilo: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
43	CD3 epsilo: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
44	CD3 epsilo: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
45	CD3 epsilo: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
46	CD3 epsilo: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
47	neg.IgG1: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		
48	neg.IgG1: 40'	H2O2,sophi: 30'	H2O2,sophi: 30'	env hrp: 20'	dab: 10'		

Abb. 1: Bsp. für eine Maske zur Färbung mit dem DAKO Autostainer

Vor jedem Färbedurchgang wurden die Anzahl der Objektträger, die Reagenzien einschließlich der zu benutzenden Reihenfolge gemäß ausgearbeitetem Färbeprotokoll und die Inkubationszeiten in das Template eingegeben. Die Anordnung der Objektträger, die Position der zu färbenden Gewebe und das Volumen der eingesetzten Reagenzien wurden auf

dem Bildschirm des Computers geprüft und gegebenenfalls neu angepasst. Die Reagenzien wurden im Reagenziengestell dann wie gefordert angeordnet.

Nach erfolgtem Färbedurchgang wurden die Präparate wie unter 3.2.1 beschrieben mit Hämalaun gegengefärbt, unter fließendem Leitungswasser gewaschen, durch die aufsteigende Ethanolreihe gezogen, mit Xylol dehydriert, feucht eingedeckelt und über Nacht luftgetrocknet.

3.3 Mikroskopische Auswertung

Kolonkarzinome und Lebermetastasen wurden mit identischen Geräten und nach derselben Methodik wie folgt mikroskopisch analysiert:

Zur Mikroskopie wurde ein Axioskop 2 (Carl Zeiss) benutzt, an dem das Okular durch das Okular E-P1 10x/20 (Carl Zeiss) ersetzt wurde. Dieses Okular enthält ein integriertes Raster aus 4x4 Quadraten, so dass die infiltrierenden Immunzellen auf einer definierten Fläche ausgezählt werden konnten. Ausgezählt wurde bei 200-facher Vergrößerung eine Fläche von 0,03 mm², zum Teil wurde dazu ein Hand-Zählgerät (Link, H20) benutzt.

Die Methodik für die Antikörper CD4, CD8, CD16, CD79a, CD3epsilon, CD3zeta und KiMy2 war folgendermaßen:

Betrachtet wurden zum einen die Tumorzellnester und zum anderen das den Tumor direkt umgebende Gewebe (Tumorstroma), es wurden die Zellen, die in die Tumorzellnester infiltrierten von denjenigen unterschieden, die sich im Tumorstroma befanden (Abb. 2 und 3):

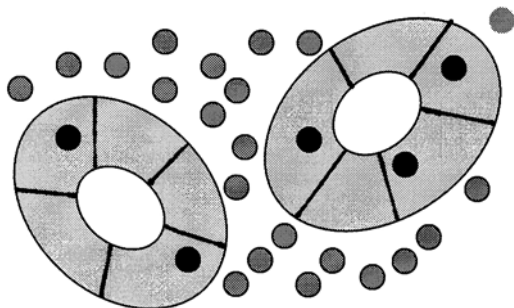


Abb.2: Schemazeichnung: Zellen infiltrieren Tumorzellbereiche (schwarze Punkte) und umgebendes Tumorstroma (graue Punkte)

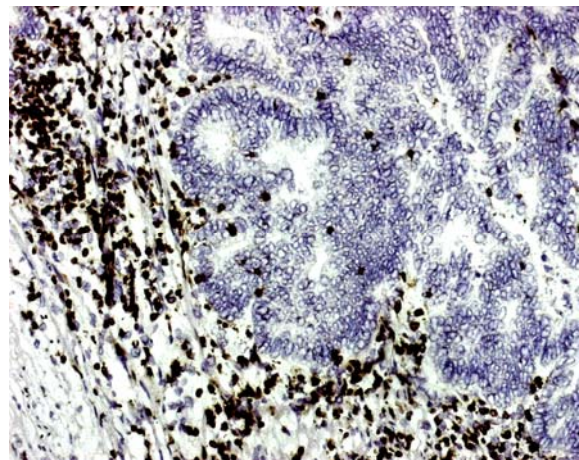


Abb.3: mikroskopisch: Zellen infiltrieren Tumorzellen und umgebendes Tumorstroma Kolon-CA (Nr.: 27006), CD3ε, Obj. 20x0,5

Für jedes Präparat wurden zunächst bei zehnfacher Vergrößerung die drei am stärksten infiltrierten Tumorzellnester (Tumorhotspots) und die drei am stärksten infiltrierten Tumorstromabereiche (Stromahotspots) herausgesucht. Dann wurden jeweils die angefärbten Immunzellen innerhalb dreier Quadrate des oben erwähnten Rasters bei 200-facher Vergrößerung ausgezählt. So wurden für jeden immunhistochemisch gefärbten Marker die drei am stärksten befallenen Tumorzellnester und auch die drei am stärksten infiltrierten Bereiche des Tumorstromas ausgezählt.

Für jeden Marker konnten also drei verschiedene, absolute Werte an infiltrierenden Immunzellen ausgezählt werden, diese wurden addiert und daraus der Mittelwert gebildet.

Um eine semiquantitative Aussage über die Immunzellinfiltration machen zu können, wurde ein Scoring durchgeführt, dazu wurde der Grad der Infiltration in sechs Gruppen unterteilt:

(0 = keine Zelle vorhanden, 1 = wenigstens eine Zelle vorhanden, 2 = geringe Zellzahl, 3 = einige Zellen vorhanden, 4 = mäßig Zellen vorhanden, 5 = starke Zellanhäufung, 6 = sehr starke Zellanhäufung).

Dieses Scoring wurde jeweils für die Tumorhotspots, die Tumorstromahotspots, die Tumorzellbereiche insgesamt und das Tumorstroma des gesamten Präparates durchgeführt.

Bei den mit KiM1, KiM4 und CD83 angefärbten Immunzellen wurde das Infiltrat nur semiquantitativ mittels des Scorings von Tumor- und Tumorstromagewebe ausgewertet. Der Grund dafür war ein sehr geringes Infiltrat an dendritischen Zellen (KiM4 und CD83) und ein geringes Infiltrat an Makrophagen (KiM1) im Tumor.

Die mit KL-1, W6/32 und Fas Ligand gefärbten Tumorzellen wurden, um Fehler zu vermeiden, ebenfalls nur mit Hilfe des Scorings bewertet, da die Infiltration sehr stark und somit nicht auszuzählen war. Allerdings wurde zwischen heterogener (ungleichmäßiger) und homogener (gleichmäßiger) Anfärbung unterschieden.

3.4 Photographie

Nach erfolgter Auszählung wurde von jeder Antikörperfärbung jeweils ein Präparat sowohl eines Kolonkarzinoms als auch einer Lebermetastase exemplarisch photographiert, dazu jeweils Positiv- und Negativkontrolle. Es wurde ein Zeiss-Mikroskop (Axioskop 40) mit aufschraubbarer Digitalkamera (AxioCam MRc, Zeiss) verwendet.

3.5 Statistische Analyse

Für die angewendeten Testverfahren wurde das Programm „SPSS“ verwendet. Die im Folgenden beschriebenen statistischen Tests wurden unter Absprache mit Herrn Dipl. Inform. Jürgen Hedderich vom Institut für Medizinische Informatik und Statistik der Christian-Albrechts-Universität Kiel angewendet.

Die ausführlichen Daten aller statistischen Tests finden sich zur besseren Übersicht im Anhang dieser Arbeit in den Tabellen 8-14.

Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest:

Mit diesem Test wurde geprüft, ob die Messwerte der einzelnen Merkmale in den jeweiligen Gruppen einer Normalverteilung folgten [17]. Dieser Test kann auch für rangskalierte Merkmale verwendet werden. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha \leq 0,10$ festgelegt.

Die Ergebnisse des Tests auf Normalverteilung zeigten, dass die untersuchten Merkmale nicht einheitlich einer Normalverteilung folgten, aus diesem Grunde wurden für die weitere statistische Bearbeitung der Daten verteilungsfreie Tests gewählt.

Mann-Whitney-U-Test:

Um mögliche statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Kolonkarzinom *versus* Lebermetastasen, bzw. N0 *versus* N2) zu erkennen, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet.

Dieser Test stellt eine Alternative zum t-Test für zwei unverbundene Stichproben dar. Dabei werden zwei Mediane miteinander verglichen, Symmetrie oder gar Normalverteilung werden nicht vorausgesetzt [17].

Es wird die Nullhypothese ($H_0 =$ „Es gibt keinen Unterschied im Immunzellinfiltrat zwischen den beiden getesteten Gruppen“) gegen die Alternativhypothese ($H_1 =$ „Es gibt einen Unterschied im Immunzellinfiltrat zwischen den beiden getesteten Gruppen“) geprüft.

Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha \leq 0,10$ festgelegt.

Alle Werte aus beiden Stichproben wurden in aufsteigender Reihenfolge sortiert und mit Rangnummern versehen, in jeder Gruppe wurden die Ränge aufsummiert. H_0 wurde verworfen, wenn U kleiner oder gleich dem kritischen Wert war.

Darstellungen in Box-Plots:

Eine grafische Darstellung als Boxplots diente der Visualisierung der Daten und Gegenüberstellung der verschiedenen Gruppen. Bei Boxplots handelt es sich um Diagramme, die auf dem Median basieren, weiterhin wurden Quartile, Extremwerte und Ausreißer angegeben. Die Box stellt den Interquartilsbereich mit den mittleren 50 % der Werte dar. Die quer über die Box verlaufende Linie gibt die Lage des Medians, die längs von der Box ausgehenden Linien den größten und kleinsten Wert an. Werte, welche zwischen 1,5 Kastenlängen vom oberen oder unteren Rand der Box entfernt lagen, wurden als Ausreißer speziell markiert (o). Die angegebenen Extremwerte (*) umfassten Fälle, welche mehr als 3 Kastenlängen von der oberen oder unteren Kante des Balkens entfernt lagen.

Kaplan-Meier-Methode:

Diese Methode berücksichtigt die Information aller Patienten bezüglich der Überlebenszeit, auch wenn der Tod bei manchen Patienten zum Zeitpunkt der Datenanalyse noch nicht eingetreten ist (zensierte Daten). Wenn bei einigen Patienten das Endereignis am Studienende noch nicht eingetreten ist, kann die Überlebensfunktion nur bis zum Zeitpunkt der letzten zensierten Beobachtung geschätzt werden.

Die graphische Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit der Zeitpunkte ergab die Überlebenskurve.

Logranktest:

Dieser Test eignet sich zum feststellen von Unterschieden zwischen den Überlebensdaten verschiedener Gruppen. Bei einem signifikanten Unterschied ist anzunehmen, dass die Gruppierungsvariable prognostisch relevant ist [26]. Auch zensierte Daten wurden bei diesem Test angemessen berücksichtigt.

Um die Überlebenszeit der Patienten, angegeben in Monaten, mit dem Infiltrat der unterschiedlichen angefärbten Zellen zu vergleichen und den Log-Rank-Test durchzuführen, wurde das betreffende Zellinfiltrat, gemessen am Median, nach den Häufigkeiten niedrig (low) und hoch (high) eingeteilt.

Überlebensstatistik:

Für die Überlebenszeitanalyse wurde die Kaplan-Meier-Methode angewendet, die auch zensierte Daten berücksichtigt.

Im Folgenden ist die Überlebenskurve der in diese Arbeit einbezogenen Patienten zum besseren Verständnis der folgenden Ergebnisse dargestellt.

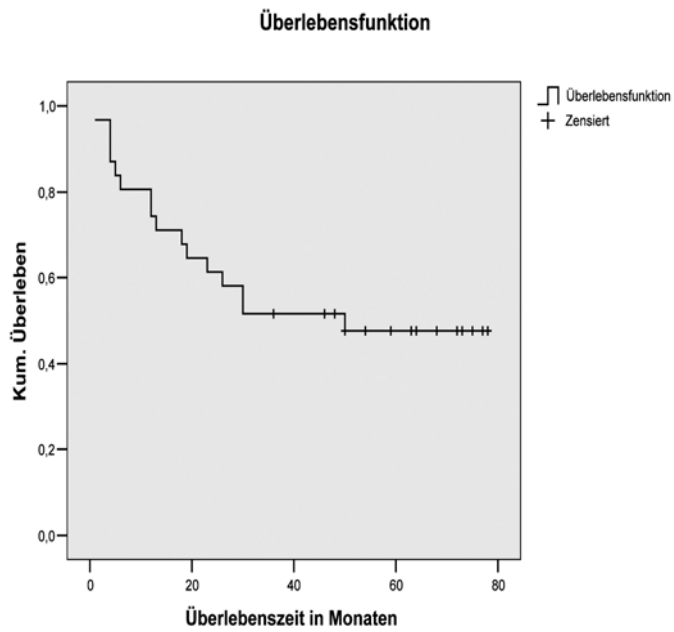


Abb. 4: Überlebenskurve der einbezogenen Patienten

4 Ergebnisse

4.1 Ermittelte Ergebnisse

Die Ergebnisse der mikroskopisch ausgezählten und ausgewerteten Präparate sind im Folgenden in den Tabellen 3-6 aufgeführt. Sie sind geordnet nach den untersuchten Markern in den verschiedenen Gruppen Kolonkarzinom gesamt, Kolonkarzinom mit Lymphknotenmetastasen, Kolonkarzinom ohne Lymphknotenmetastasen und Lebermetastasen.

Zur besseren Übersicht wurden hier nur die Mittelwerte mit Standardabweichung, Minimum, Maximum und der jeweilige Median aufgeführt. Die ausführlichen Ergebnisse finden sich im Anhang dieser Arbeit (Tabellen 15-26).

Die gefärbten Zellen wurden, wie bereits in Kapitel drei erwähnt, hinsichtlich ihres Vorkommens in Tumor-Hotspots und Stroma-Hotspots ausgezählt. Zusätzlich wurde ein Scoring von 0-6 durchgeführt, das sich wie folgt zusammensetzte:

<u>Scoring von 0-6:</u>	0 = keine einzige angefärbte Zelle vorhanden
	1 = wenigstens 1 gefärbte Zelle vorhanden
	2 = geringe Zellzahl
	3 = einige Zellen vorhanden
	4 = mäßige Anzahl Zellen vorhanden
	5 = starke Zellanhäufung
	6 = sehr starke Zellanhäufung

Dieses Scoring wurde jeweils für die Tumorchotspots, die Tumorstromahotspots, die Tumorzellnester gesamt und das Tumorstroma des gesamten Präparates durchgeführt.

Bei den mit KiM1, KiM4 und CD83 angefärbten Immunzellen wurde das Infiltrat nur semiquantitativ mittels des Scorings von Tumor- und Tumorstromagewebe ausgewertet.

Bei den mit KL1, W6/32 und FAS-Ligand gefärbten Präparaten wurde nur die Infiltration in das Tumorgewebe mit Hilfe des Scorings bewertet, allerdings wurde zwischen heterogener (ungleichmäßiger) und homogener (gleichmäßiger) Anfärbung unterschieden.

Allgemeine Erläuterungen zu den folgenden Tabellen 3-6: T-H = Tumor-Hotspots, S-H = Tumorstroma-Hotspots, SC T = Scoring Tumor, SC S = Scoring Tumorstroma, SC T-H = Scoring Tumor-Hotspots, SC S-H = Scoring Tumorstroma-Hotspots, h1 = heterogen, h2 = homogen. n = Anzahl, Q1 = 25. Perzentile, Q3 = 75. Perzentile

Tabelle 3: Ergebnisse Kolonkarzinom gesamt

Antikörper	n	Mittelwert	Standartabweichung	Median	Q1	Q3
CD4 T-H	47	5,62	2,07	5	5	7
CD4 S-H	47	49,45	13,03	49	44	57
CD4 SC T	47	2,26	1,19	2	1	3
CD4 SC S	47	3,57	1,23	4	2	5
CD4 SC T-H	47	2,26	1,22	2	1	3
CD4 SC S-H	47	3,47	1,23	4	2	4
CD8 T-H	46	7,54	2,89	7	5	9
CD8 S-H	46	46,85	15,1	46	34,75	57,5
CD8 SC T	46	3,43	1,46	4	2	5
CD8 SC S	46	3,78	1,09	4	3	5
CD8 SC T-H	46	3,28	1,44	4	2	4
CD8 SC S-H	46	3,61	1,16	4	2,75	4
CD16 T-H	45	3,6	2,44	3	2	5
CD16 S-H	45	12,29	9,94	10	5,5	15
CD16 SC T	45	3,2	1,62	4	2	4,5
CD16 SC S	45	3,69	1,66	4	2	5
CD16 SC T-H	45	2,98	1,52	3	1,5	4
CD16 SC S-H	45	3,42	1,56	4	2	5
CD79 T-H	46	1,89	1,3	2	1	2,25
CD79 S-H	46	5,15	7,88	2	1	4,25
CD79 SC T	46	1,39	0,83	1	1	2
CD79 SC S	46	1,67	1,18	2	1	2
CD79 SC T-H	46	1,35	0,8	1	1	2
CD79 SC S-H	46	1,63	1,1	1,5	1	2
CD3epsilon T-H	47	11,21	3,96	10	9	13
CD3epsilon S-H	47	59,38	18,42	58	43	72
CD3epsilon SC T	47	3,3	1,25	4	2	4
CD3epsilon SC S	47	3,94	1,13	4	4	5
CD3epsilon SC T-H	47	2,98	1,21	3	2	4
CD3epsilon SC S-H	47	3,72	1,26	4	2	5
CD3zeta T-H	47	7,19	3,95	7	5	9
CD3zeta S-H	47	27,4	11,81	29	22	38
CD3zeta SC T	47	3,38	1,42	4	2	4
CD3zeta SC S	47	3,77	1,48	4	3	5
CD3zeta SC T-H	47	3,38	1,42	4	2	4
CD3zeta SC S-H	47	3,77	1,48	4	3	5
KIMY2 T-H	47	5,72	2,37	6	3	7
KIMY2 S-H	47	36,15	15,8	36	22	48
KIMY2 SC T	47	3,87	1,41	4	3	5
KIMY2 SC S	47	4,96	1	5	4	6
KIMY2 SC T-H	47	3,3	1,16	3	2	4
KIMY2 SC S-H	47	4,11	1,03	4	4	5
CD83 SC T	47	1	0	1	1	1
CD83 SC S	47	1	0	1	1	1
KIM4 SC T	47	0	0	0	0	0
KIM4 SC S	47	1	0	1	1	1
KIM1 SC T	47	1,23	1,07	1	1	2
KIM1 SC S	47	3,98	1,78	5	2	5
W6/32 SC T h1	27	5,33	1,54	6	6	6
W6/32 SC S h2	20	5,55	1,47	6	6	6
FAS-L SC T h1	20	2,85	2,3	1	1	6
FAS-L SC T h2	25	2,92	2,68	4	0	6
KL1 SC T h1	29	5,97	0,19	6	6	6
KL1 SC T h2	18	6	0	6	6	6

Tabelle 4: Ergebnisse Kolonkarzinom ohne Lymphknotenmetastasen (N0)

Antikörper	n	Mittelwert	Standartabweichung	Median	Q1	Q3
CD4 T-H	25	6	2,35	6	5	7,5
CD4 S-H	25	48,96	12,76	49	41	57
CD4 SC T	25	2,56	1,36	2	1,5	4
CD4 SC S	25	3,68	1,25	4	2	5
CD4 SC T-H	25	2,52	1,39	2	1	4
CD4 SC S-H	25	3,64	1,15	4	2,5	4
CD8 T-H	25	7,6	2,35	7	5,5	8,5
CD8 S-H	25	46,28	14,94	45	33,5	56
CD8 SC T	25	3,76	1,13	4	3,5	4,5
CD8 SC S	25	4	0,91	4	4	5
CD8 SC T-H	25	3,64	1,11	4	3	4
CD8 SC S-H	25	3,84	0,99	4	3,5	4,5
CD16 T-H	24	3,46	2,15	3	2	5
CD16 S-H	24	12,04	9,98	9	5	15,5
CD16 SC T	24	3,37	1,53	4	2	4,75
CD16 SC S	24	3,67	1,37	4	2	4,75
CD16 SC T-H	24	3,12	1,45	3,5	2	4
CD16 SC S-H	24	3,42	1,38	4	2	4
CD79 T-H	25	2,04	1,46	2	1	2
CD79 S-H	25	5,88	9,3	2	1	5,5
CD79 SC T	25	1,52	0,92	1	1	2
CD79 SC S	25	1,84	1,38	2	1	2
CD79 SC T-H	25	1,52	0,92	1	1	2
CD79 SC S-H	25	1,8	1,26	2	1	2
CD3epsilon T-H	25	11,48	4,21	10	9	13,5
CD3epsilon S-H	25	61,44	18,95	61	43,5	76
CD3epsilon SC T	25	3,32	1,29	4	2	4
CD3epsilon SC S	25	4,08	1	4	4	5
CD3epsilon SC T-H	25	3	1,26	3	2	4
CD3epsilon SC S-H	25	3,8	1,29	4	2,5	5
CD3zeta T-H	25	8,36	3,84	8	5,5	11
CD3zeta S-H	25	29,96	9,35	32	22	39
CD3zeta SC T	25	3,68	1,28	4	2	5
CD3zeta SC S	25	4,16	1,25	5	4	5
CD3zeta SC T-H	25	3,68	1,28	4	2	5
CD3zeta SC S-H	25	4,16	1,25	5	4	5
KIMY2 T-H	25	5,8	2,47	6	3	8
KIMY2 S-H	25	34,88	15,39	36	22	47
KIMY2 SC T	25	3,84	1,34	4	2,5	4,5
KIMY2 SC S	25	4,92	1	5	4	6
KIMY2 SC T-H	25	3,28	1,17	3	2	4
KIMY2 SC S-H	25	4	0,91	4	3,5	5
CD83 SC T	25	1	0	1	1	1
CD83 SC S	25	1	0	1	1	1
KIM4 SC T	25	0	0	0	0	0
KIM4 SC S	25	1	0	1	1	1
KIM1 SC T	25	1,16	0,94	1	0,5	2
KIM1 SC S	25	4	1,85	5	2	5,5
W6/32 SC T h1	13	5,69	0,75	6	6	6
W6/32 SC T h2	12	5,25	1,87	6	6	6
FAS-L SC T h1	14	3	2,45	1	1	6
FAS-L SC T h2	10	5,2	1,03	6	4	6
KL-1 SC T h1	18	6	0	6	6	6
KL-1 SC T h2	7	6	0	6	6	6

Tabelle 5: Ergebnisse Kolonkarzinom mit Lymphknotenmetastasen (N2)

Antikörper	n	Mittelwert	Standartabweichung	Median	Q1	Q3
CD4 T-H	22	5,18	1,65	5	4	6
CD4 S-H	22	50	13,6	50,5	45,75	57,75
CD4 SC T	22	1,91	0,87	2	1	2
CD4 SC S	22	3,45	1,22	4	2	4,25
CD4 SC T-H	22	1,95	0,95	2	1	2,25
CD4 SC S-H	22	3,27	1,32	3,5	2	4,25
CD8 T-H	21	7,48	3,49	7	5	10,5
CD8 S-H	21	47,52	15,64	48	36,5	60
CD8 SC T	21	3,05	1,72	2	1,5	5
CD8 SC S	21	3,52	1,25	4	2	5
CD8 SC T-H	21	2,86	1,68	2	1	4,5
CD8 SC S-H	21	3,33	1,32	4	2	4
CD16 T-H	21	3,76	2,77	3	1	6
CD16 S-H	21	12,57	10,15	11	6,5	15
CD16 SC T	21	3	1,73	3	1	4,5
CD16 SC S	21	3,71	1,98	4	1,5	5,5
CD16 SC T-H	21	2,81	1,6	3	1	4
CD16 SC S-H	21	3,43	1,78	4	1,5	5
CD79 T-H	21	1,71	1,1	1	1	3
CD79 S-H	21	4,29	5,86	2	1	4,5
CD79 SC T	21	1,24	0,7	1	1	2
CD79 SC S	21	1,48	0,87	1	1	2
CD79 SC T-H	21	1,14	0,57	1	1	1,5
CD79 SC S-H	21	1,43	0,87	1	1	2
CD3epsilon T-H	22	10,91	3,7	10	8	13,25
CD3epsilon S-H	22	57,05	17,95	55	42	72
CD3epsilon SC T	22	3,27	1,24	3,5	2	4
CD3epsilon SC S	22	3,77	1,27	4	2	5
CD3epsilon SC T-H	22	2,95	1,17	3	2	4
CD3epsilon SC S-H	22	3,64	1,26	4	2	5
CD3zeta T-H	22	5,86	3,73	6,5	3	8
CD3zeta S-H	22	24,5	13,75	24	17	38
CD3zeta SC T	22	3,05	1,53	4	2	4
CD3zeta SC S	22	3,32	1,62	4	2	4
CD3zeta SC T-H	22	3,05	1,53	4	2	4
CD3zeta SC S-H	22	3,32	1,62	4	2	4
KIMY2 T-H	22	5,64	2,3	5	3,75	7
KIMY2 S-H	22	37,59	16,49	42	21,75	49,25
KIMY2 SC T	22	3,91	1,31	4	3	5
KIMY2 SC S	22	5	1,02	5	4	6
KIMY2 SC T-H	22	3,32	1,17	3	2	4
KIMY2 SC S-H	22	4,23	1,15	4	4	5
CD83 SC T	22	1	0	1	1	1
CD83 SC S	22	1	0	1	1	1
KIM4 SC T	22	0	0	0	0	0
KIM4 SC S	22	1	0	1	1	1
KIM1 SC T	22	1,32	1,21	1	1	2
KIM1 SC S	22	3,95	1,73	4,5	2,75	5
W6/32 SC T h1	14	5	2	6	4,75	6
W6/32 SC T h2	8	6	0	6	6	6
FAS-L SC T h1	6	2,5	2,07	1,5	1	4,5
FAS-L SC T h2	15	1,4	2,32	0	0	4
KL-1 SC T h1	11	5,91	0,3	6	6	6
KL-1 SC T h2	11	6	0	6	6	6

Tabelle 6: Ergebnisse Lebermetastasen

Antikörper	n	Mittelwert	Standartabweichung	Median	Q1	Q3
CD4 T-H	21	3,38	2,38	3	2	5
CD4 S-H	21	28,24	12,06	25	17,5	40
CD4 SC T	21	2,14	1,2	2	1,5	2
CD4 SC S	21	3,86	1,24	4	3	4,5
CD4 SC T-H	21	2,1	1,04	2	1,5	2
CD4 SC S-H	21	3,86	0,85	4	4	4
CD8 T-H	21	2,62	2,13	2	1	4,5
CD8 S-H	21	21,05	9,78	22	11,5	29
CD8 SC T	21	2,57	1,54	2	2	4
CD8 SC S	21	4,14	1,62	4	2	6
CD8 SC T-H	21	2,57	1,25	2	2	4
CD8 SC S-H	21	4,05	1,43	4	3	5,5
CD16 T-H	21	6,57	3,04	7	4	9
CD16 S-H	21	25,19	8,99	26	19,5	32,5
CD16 SC T	21	3,71	1,55	4	2	5
CD16 SC S	21	4,33	1,32	4	4	5
CD16 SC T-H	21	3,62	1,5	4	2	5
CD16 SC S-H	21	4,1	1,18	4	4	5
CD79 T-H	21	3,19	3,37	3	1	4
CD79 S-H	20	9,8	7,34	10,5	3	12,75
CD79 SC T	21	1,9	1,26	2	1	2,5
CD79 SC S	21	2	1,3	2	1	3
CD79 SC T-H	21	1,62	0,92	2	1	2
CD79 SC S-H	21	1,81	1,08	2	1	2,5
CD3epsilon T-H	21	3,9	3,95	2	1	6
CD3epsilon S-H	21	55,9	25,57	56	35	76
CD3epsilon SC T	21	3,24	1,55	4	2	4
CD3epsilon SC S	21	4,57	1,57	4	4	6
CD3epsilon SC T-H	21	3,14	1,56	2	2	4
CD3epsilon SC S-H	21	4,57	1,57	4	4	6
CD3zeta T-H	21	3	2,78	2	1	4,5
CD3zeta S-H	21	28,29	14,52	28	19	40
CD3zeta SC T	21	2,05	1,4	2	1	2
CD3zeta SC S	21	2,81	1,6	2	2	4
CD3zeta SC T-H	21	2,05	1,4	2	1	2
CD3zeta SC S-H	21	2,81	1,6	2	2	4
KIMY2 T-H	21	2,52	1,63	2	1	4
KIMY2 S-H	21	26,43	12,23	27	19	31
KIMY2 SC T	21	2,76	1,55	2	1	4
KIMY2 SC S	21	4,29	1,19	5	4	5
KIMY2 SC T-H	21	2,48	1,21	2	1	4
KIMY2 SC S-H	21	3,24	1,18	4	2	4
CD83 SC T	21	1	0	1	1	1
CD83 SC S	21	1	0	1	1	1
KIM4 SC T	21	0	0	0	0	0
KIM4 SC S	21	1	0	1	1	1
KIM1 SC T	21	0,67	0,48	1	0	1
KIM1 SC S	21	3,05	1,8	2	2	4,5
W6/32 SC T h1	3	5,33	1,16	6	4	6
W6/32 SC T h2	18	5,44	0,92	6	4	6
FAS-L SC T h1	6	4	0	4	4	4
FAS-L SC T h2	15	6	0	6	6	6
KL1 SC T h1	5	4	0	4	4	4
KL1 SC T h2	15	6	0	6	6	6

4.2 Zusammenfassung der ermittelten Ergebnisse

Im Folgenden ist die Auswertung der gefärbten Präparate in einer zusammenfassenden Übersicht dargestellt. Zur besseren Veranschaulichung sind beispielhaft Photos abgebildet, die mit Hilfe einer Digitalkamera angefertigt wurden.

Zusätzlich sind Box-Plots abgebildet, welche die Ergebnisse unterstreichen und verständlicher machen sollen. In den Box-Plots sind jeweils Median, 25. Perzentile, 75. Perzentile, außerdem Minimum und Maximum dargestellt. Ausreißer sind mit ° markiert. Extremwerte sind mit * markiert.

4.2.1 Das Infiltrat der T-Helfer-Zellen

Die Darstellung der T-Helferzellen erfolgte mit dem Antikörper CD4. Es zeigte sich, dass insgesamt eine mäßige Anzahl an T-Lymphozyten das Tumorstroma und nur eine geringe Anzahl die Tumorzellbereiche infiltrierten (Abb. 5 und 6):

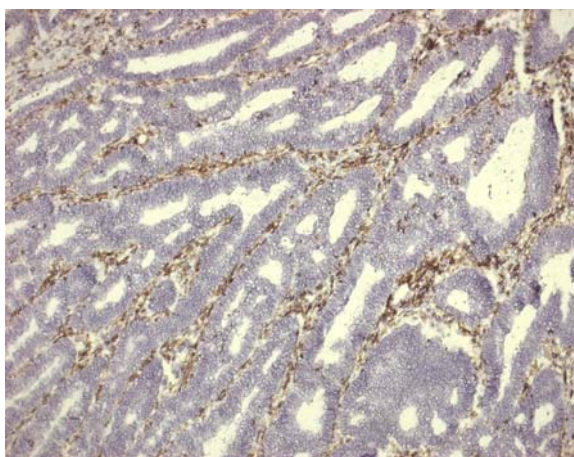


Abb.5: Kolon-CA (24565), CD4, Obj. 10x0,3
T-Lymphozyten vor allem im Tumorstroma

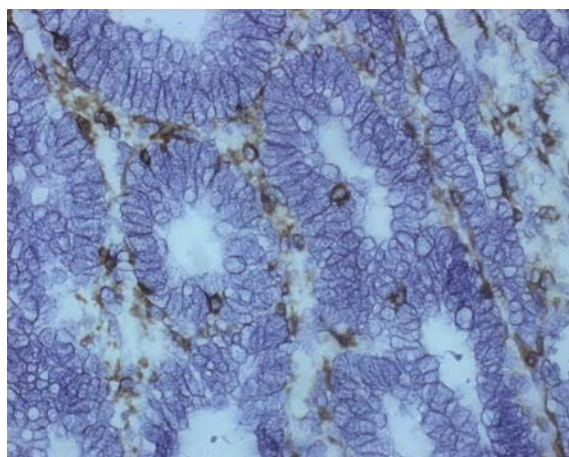


Abb.6: Kolon-CA (24565), CD4, Obj. 40x0,75
T-Lymphozyten infiltrieren vereinzelt
Tumorzellbereiche

Es war ein signifikanter Unterschied ($p=0,001$) zu erkennen zwischen den infiltrierenden Zellen in den Kolonkarzinomen und in den Lebermetastasen, wobei viel weniger T-Helfer-Zellen in den Lebermetastasen vorhanden waren, als in den fernmetastasenfreien Kolonkarzinomen (Abb. 7/8 und 9/10):

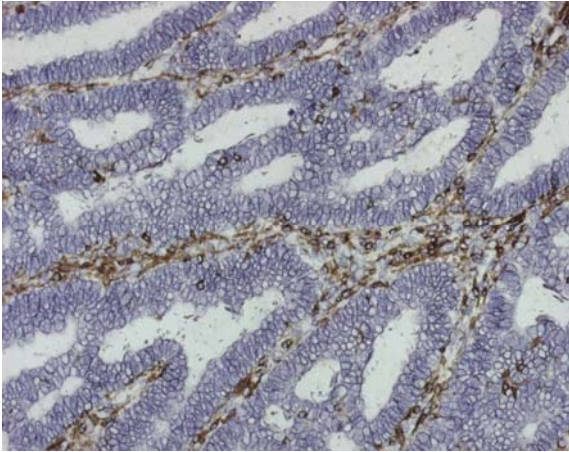


Abb.7: Kolon-CA (24565), CD4, Obj. 20x0,5

Im Vgl. infiltrieren T-Lymphozyten deutlich stärker das Tumorstroma der fernmetastasenfreien Kolon-Karzinome, als das in den Lebermetastasen.

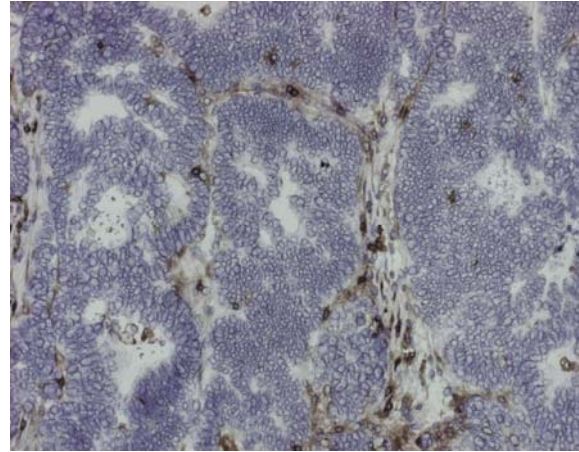


Abb.8: Lebermetastase (9982) , CD4, Obj. 20x0,5

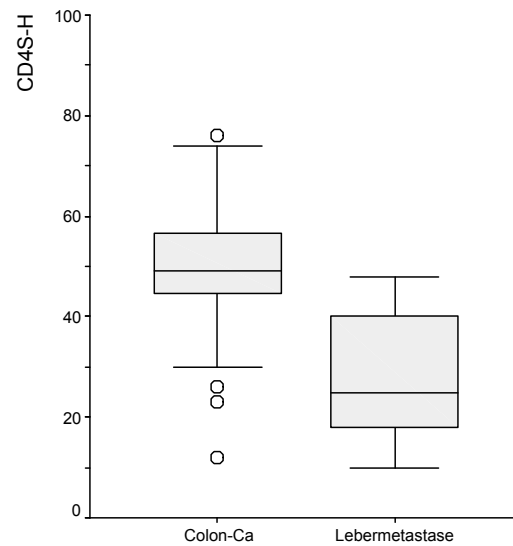
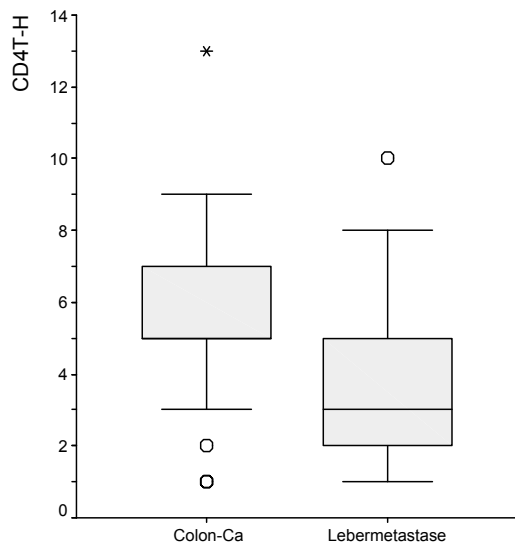


Abb. 9 und 10: signifikanter Unterschied ($p=0,001$) **tumor-** und **tumorstroma-**infiltrierender Leukozyten Colon-CA (N0+N2) versus Lebermetastase.

Ein signifikanter Unterschied im Infiltrat zwischen Kolonkarzinomen mit (N2) und ohne (N0) Lymphknotenmetastasen war dagegen nicht zu erkennen (Abb. 11/12):

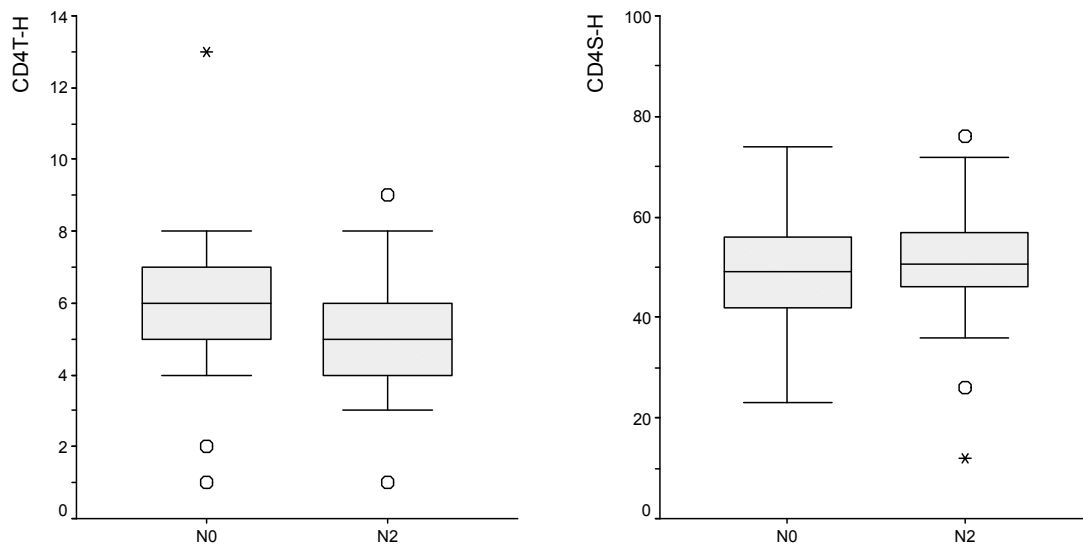


Abb. 11 und 12: kein signifikanter Unterschied **tumor-** und **tumorstroma-**infiltrierender Leukozyten im Colon-CA mit und ohne LK-Metastasen.

4.2.2 Das Infiltrat CD8+ T-Lymphozyten

Die Anfärbung der zytotoxischen T-Lymphozyten erfolgte mit Hilfe des Antikörpers CD8. Auch hier war auffällig, dass die Tumorzellbereiche nur wenig infiltriert wurden, wogegen die Anzahl der infiltrierenden T-Lymphozyten in das Tumorstroma deutlich kräftiger war (Abb. 13 und 14):

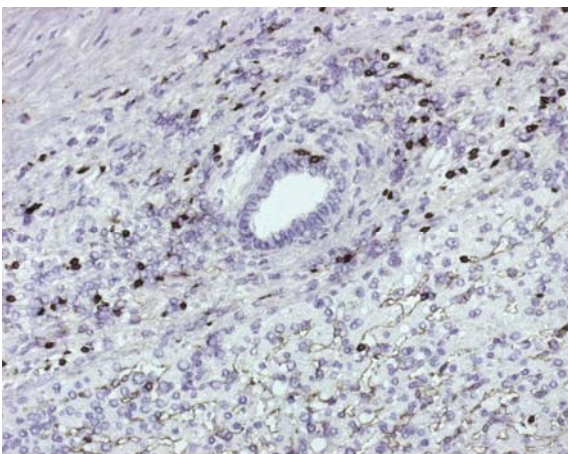


Abb.13: Lebermetastase (6888), CD8, Obj. 20x0,5
CD8+ T-Lymphozyten infiltrieren vor allem das die Tumorzellen umgebende Stroma.

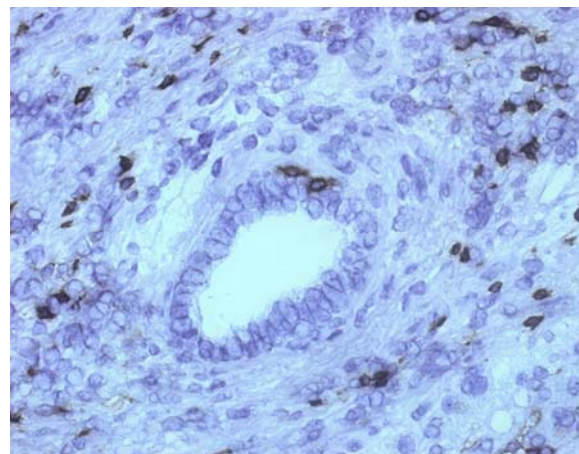


Abb.14: Lebermetastase (6888), CD8, Obj. 40x0,75

Im Unterschied zu den fernmetastasenfreien Kolonkarzinom-Präparaten war das Infiltrat in den Lebermetastasen signifikant ($p=0,001$) geringer ausgeprägt (Abb. 15 und 16). Der Vergleich zwischen den Gruppen N0 und N2 ließ keine signifikante Differenz erkennen (Abb. 17 und 18):

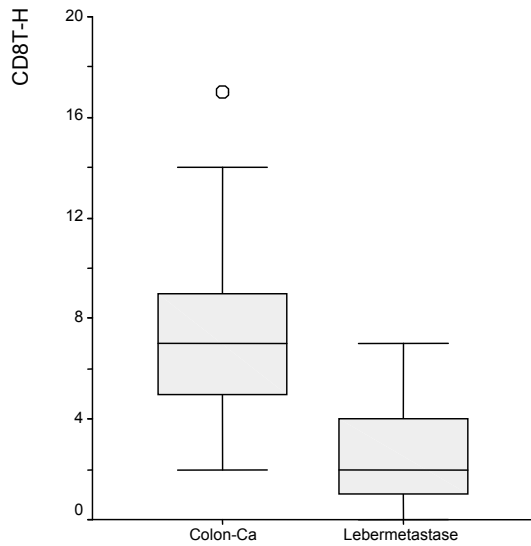


Abb. 15

Signifikanter Unterschied ($p=0,001$) **tumor-** und **tumorstroma-**infiltrierender Leukozyten in fernmetastasenfreiesm Colon-CA und Lebermetastasen.

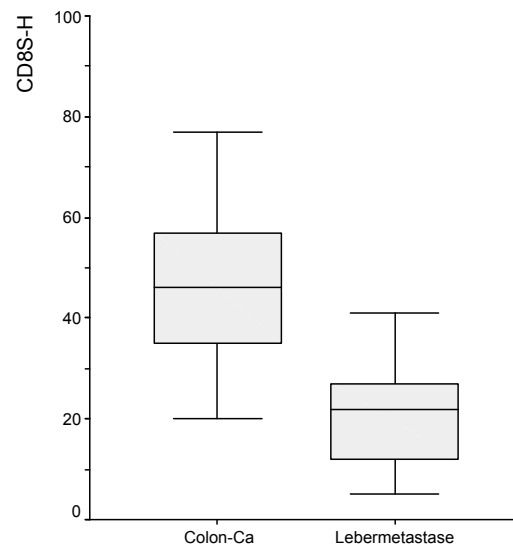


Abb. 16

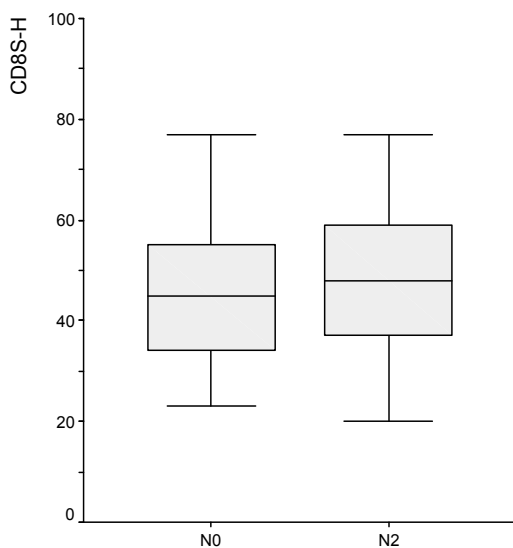


Abb.17

Kein signifikanter Unterschied **tumor-** und **tumorstroma-**infiltrierender Leukozyten im Colon-CA mit und ohne Lymphknotenmetastasen nachweisbar.

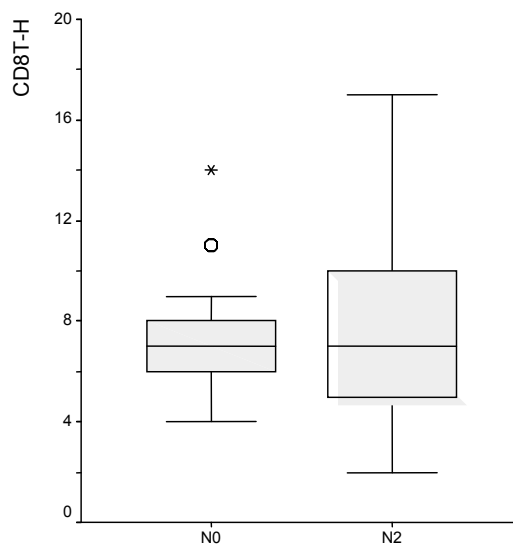


Abb. 18

4.2.3 Ergebnisse in den mit CD3 epsilon markierten Präparaten

CD3ε gehört zum T-Zell-Rezeptorkomplex und wurde auf allen T-Lymphozyten exprimiert. Es konnte ein signifikanter Unterschied ($p=0,001$) zwischen dem geringeren T-Lymphozyten-Infiltrat in den Tumorzellnestern der Lebermetastasen und dem deutlich stärkeren Infiltrat in den Tumorzellnestern der fernmetastasenfreien Kolonkarzinome erfasst werden (Abb. 19).

Die Tumoren des Stagings N0 und N2 stimmten hinsichtlich der Anzahl an T-Lymphozyten überein und zeigten keinen signifikanten Unterschied (Abb. 20).

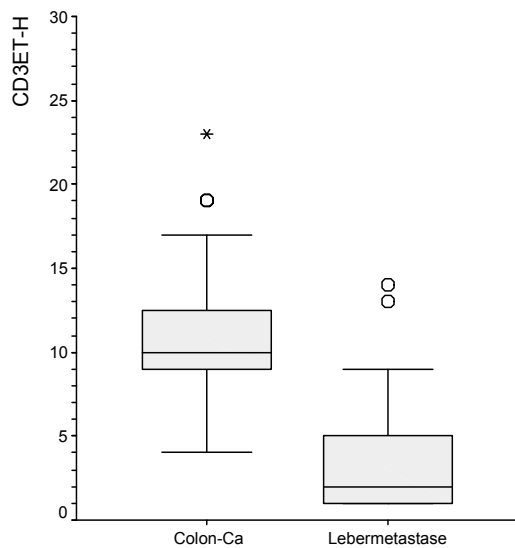


Abb. 19

signifikanter Unterschied TIL Colon-CA (N0+N2) gegenüber Lebermetastasen; hingegen kein erkennbarer Unterschied zwischen Colon-CA mit und ohne LK-Metastasen.

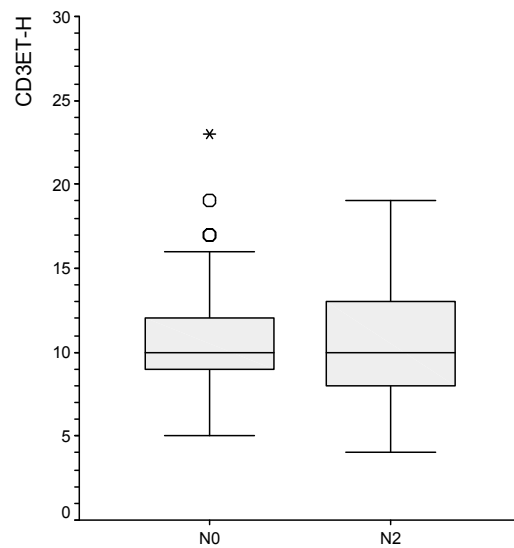


Abb. 20

4.2.4 Ergebnisse in den mit CD3 zeta markierten Präparaten

CD3 zeta gehört ebenfalls zum CD3-T-Zellrezeptorkomplex und gilt als ein Maß für die Aktivität und den Funktionszustand der T-Lymphozyten.

Insgesamt war ein Verlust von mit CD3 zeta markierten T-Zellen gegenüber den mit CD3 epsilon markierten T-Zellen zu erkennen (Abb. 21 und 22):

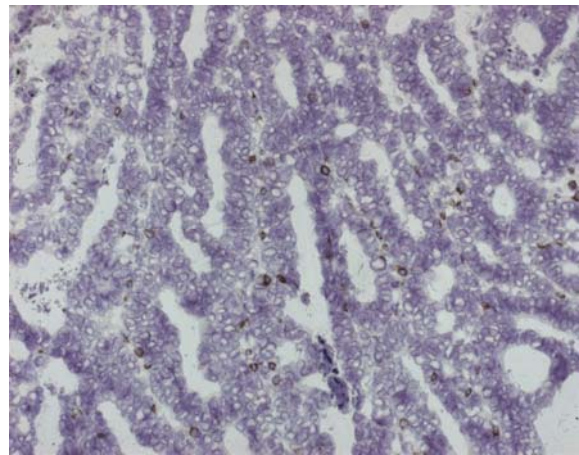
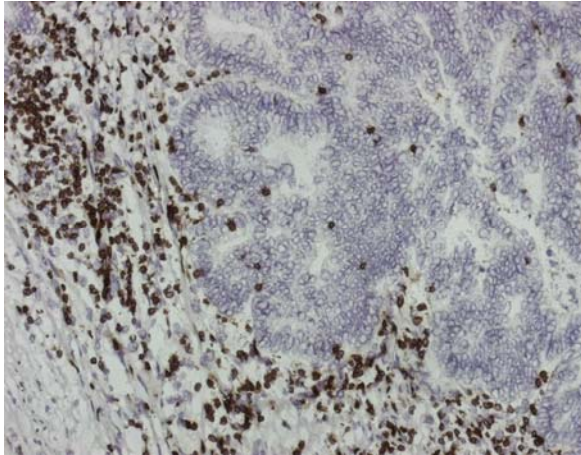


Abb. 21: Kolon-CA (27006), CD3ε, Obj. 20x0,5

Abb. 22: Kolon-CA (26826), CD3ξ, Obj. 20x0,5

Deutlich zu erkennen ist ein Verlust von mit **CD3ξ** markierten T-Zellen gegenüber den mit **CD3ε** markierten T-Zellen.

Ein signifikanter Unterschied ($p=0,001$) war zwischen dem geringeren Infiltrat CD3ξ-markierter Zellen in den Tumorzellen der Lebermetastasen im Vergleich mit den fernmetastasenfreien Kolonkarzinomen ebenfalls zu sehen (Abb. 23):

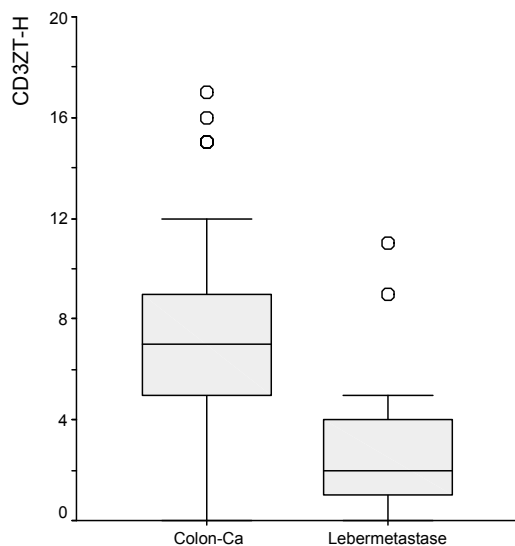


Abb. 23

Signifikanter Unterschied CD3ξ-markierter Zellen im Colon-CA versus Lebermetastasen.

Auffällig war zusätzlich ein signifikant ($p=0,032$) schwächeres Tumor-Infiltrat in den Kolonkarzinomen mit Lymphknotenmetastasen im Gegensatz zu den Karzinomen des Stadiums N0 (Abb. 24):

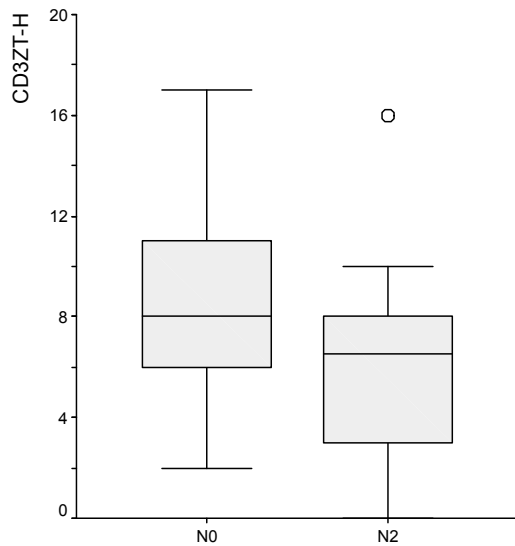


Abb. 24: signifikant ($p=0,032$) schwächeres Tumor-Infiltrat in den Kolonkarzinomen N2 im Gegensatz zu denen des Stadiums N0.

Der Vergleich zwischen dem Infiltrat an aktivierten T-Lymphozyten mit der Überlebenszeit der Patienten ergab einen Zusammenhang zwischen einem niedrigen Anteil CD3 ξ -positiver (aktivierter) T-Zellen und einer niedrigeren Überlebensrate. Patienten mit einer hohen Anzahl aktivierter T-Lymphozyten zeigten einen hoch signifikanten Überlebensvorteil (Abb. 25-27):

Erläuterung zu den Überlebensfunktionen (Abb. 25-27): Die Überlebenszeit in Monaten wurde mit dem in die Häufigkeiten niedrig (low) und hoch (high), gemessen am Median, unterteilten CD3zeta-Infiltrat verglichen. Die daraus resultierenden Überlebenskurven sind für die untersuchten Tumorhotspots, Stromahotspots und das Scoring Tumor abgebildet.

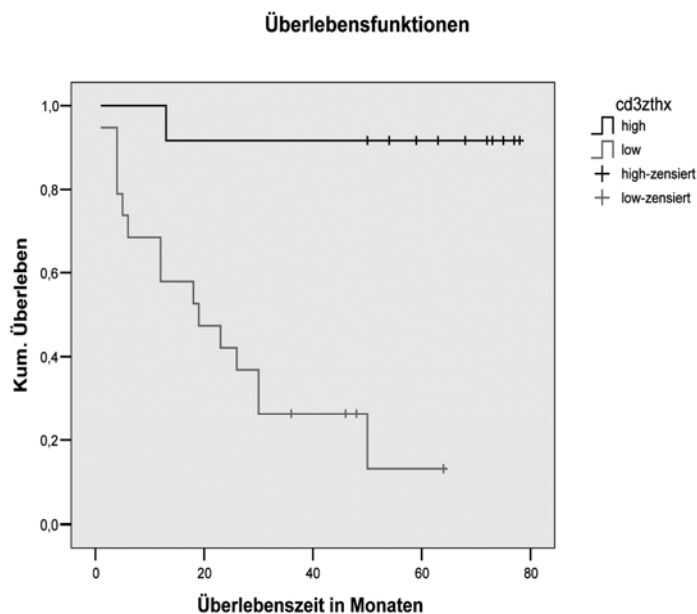


Abb. 25: Überlebensfunktion für CD3 ξ , **Tumor-Hotspots**: Infiltriert eine hohe Anzahl aktivierter T-Lymphozyten direkt die Tumorzellen, ergibt sich ein signifikanter ($p=0,001$) Überlebensvorteil für die Patienten.

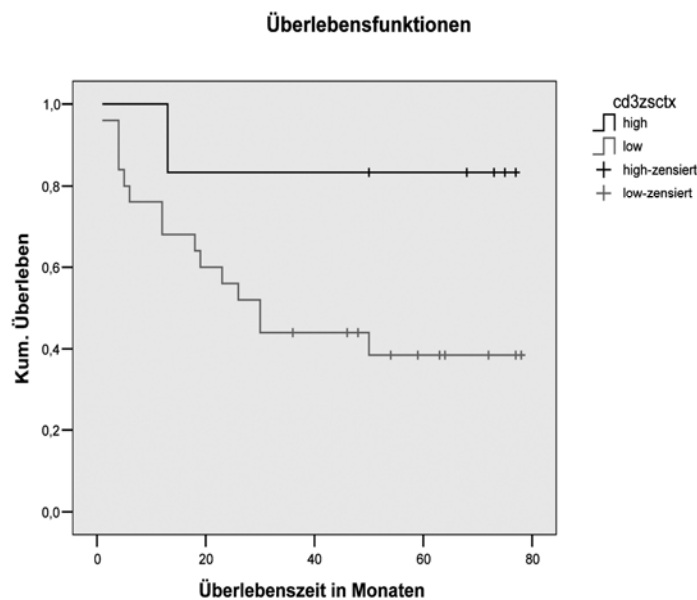


Abb. 26: Überlebensfunktion für CD3 zeta, **Scoring Tumor**. Ein hohes Infiltrat aktivierter T-Lymphozyten in den Tumorzellen korreliert signifikant ($p=0,085$) mit einem Überlebensvorteil

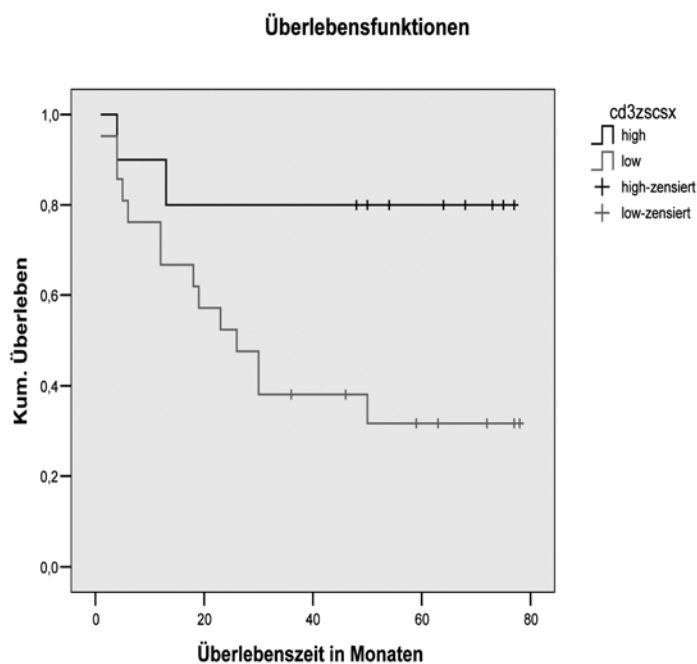


Abb 27: Überlebensfunktion, CD3 zeta, **Scoring Stroma**. Ein hohes Infiltrat aktivierter T-Lymphozyten im Tumorstroma korreliert signifikant ($p=0,031$) mit einem Überlebensvorteil.

4.2.5 Das Infiltrat der B-Lymphozyten

Die Ausprägung der B-Lymphozyten wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des Antikörpers CD 79 beurteilt. Insgesamt fand sich nur eine geringe Anzahl an B-Lymphozyten in den angefärbten Präparaten, das Vorkommen im Tumorstroma war höher als das Infiltrat in den Tumorzellnestern. Die Zellzahl in den Kolonkarzinomen mit Lebermetastasen war signifikant ($p=0,006$) höher als in denen ohne Fernmetastasen (Abb. 28 und 29). Kein signifikanter Unterschied bestand in dem Infiltrat an B-Lymphozyten in den Kolonkarzinomen ohne Lymphknotenmetastasen im Vergleich zu denen mit Lymphknotenmetastasen (Abb. 30 und 31):

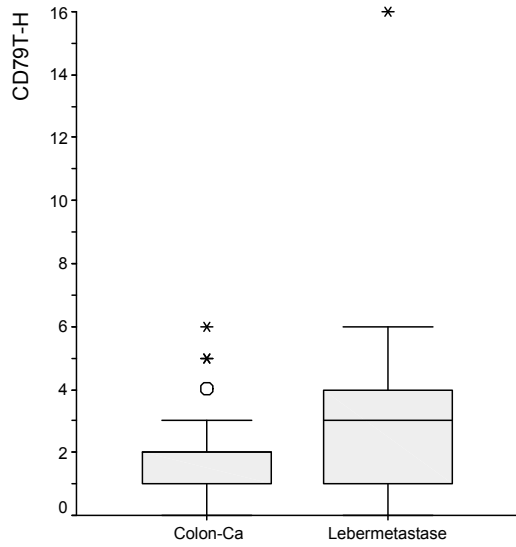


Abb. 28

Zellzahl der B-Lymphozyten in den Lebermetastasen signifikant ($p=0,006$) höher als in den fernmetastasenfreien Präparaten.

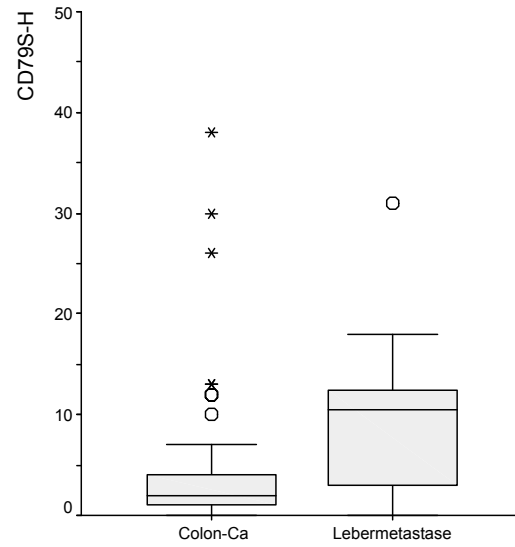


Abb. 29

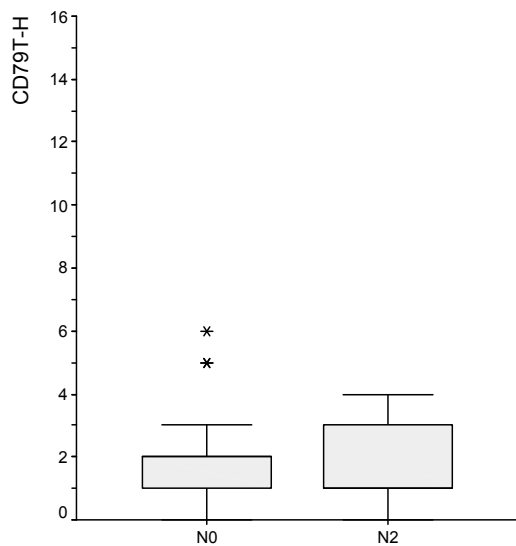


Abb. 30

leicht stärkere Infiltration der B-Lymphozyten in den Kolonkarzinomen ohne Lymphknotenmetastasen im Gegensatz zu denen mit Lymphknotenmetastasen.

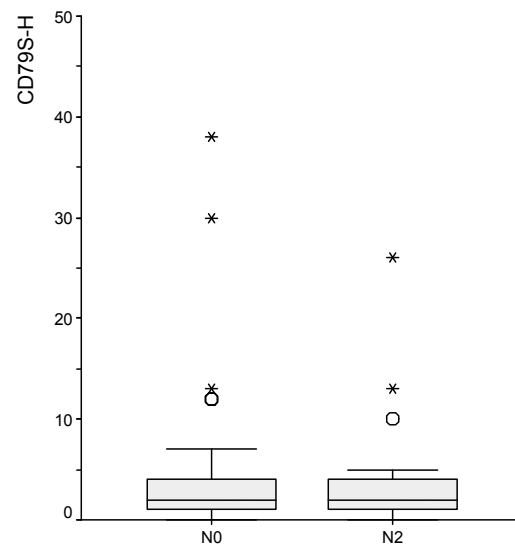


Abb. 31

4.2.6 Das Infiltrat Natürlicher Killerzellen

Das Vorkommen von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) wurde mit Hilfe des Antikörpers CD16 untersucht. In allen angefärbten Präparaten ließen sich diese Zellen eindeutig nachweisen.

Im Durchschnitt zeigten sich einige NK-Zellen in den Kolonkarzinomen mit Lymphknotenmetastasen (N2) und ohne Lymphknotenmetastasen (N0), wobei die Zellzahl im Tumorstroma leicht höher war als in den Tumorzellnestern. Ein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen ließ sich jedoch nicht feststellen (Abb. 32 und 33).

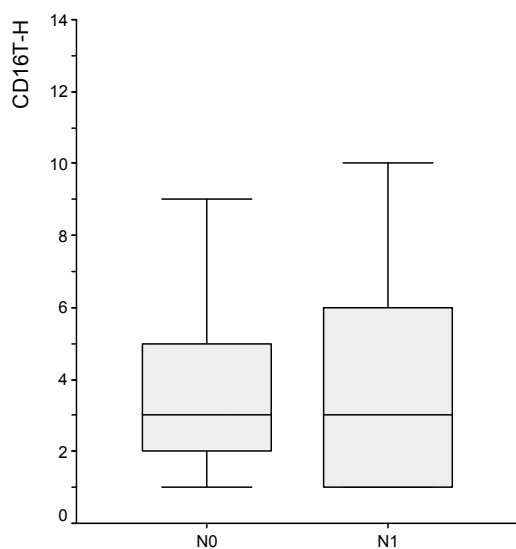


Abb. 32

Kein signifikanter Unterschied im Infiltrat Natürlicher Killerzellen zwischen kolorektalen Karzinomen des Stadiums N0 im Vergleich zu denen des Stadiums N2.

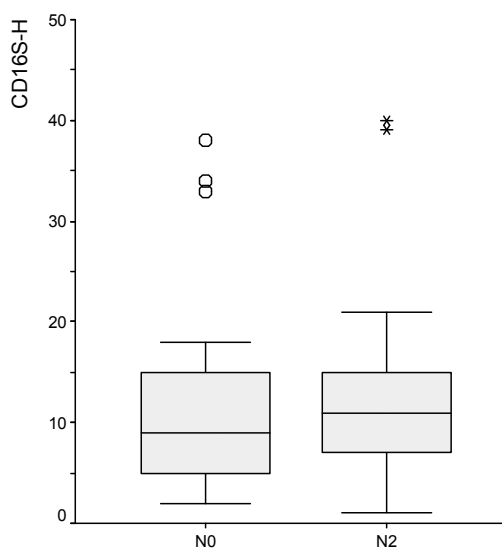


Abb. 33

Im Gegensatz dazu unterschied sich die Zellzahl in den Lebermetastasen, von der in den fernmetastasenfreien Kolonkarzinomen (Abb. 34 und 35, sowie Abb. 36 und 37): In den Lebermetastasen war die Infiltration vor allem im Tumorstroma aber auch in den Tumorzellnestern signifikant ($p=0,01$) höher als in den fernmetastasenfreien Tumoren.

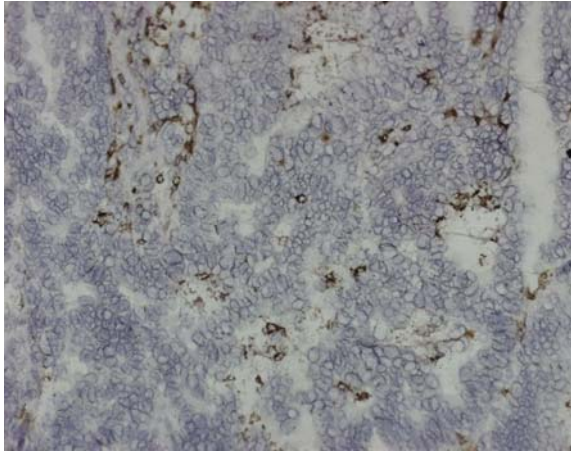


Abb.34:Kolon-CA (20756), CD16,
Obj.20x0,5

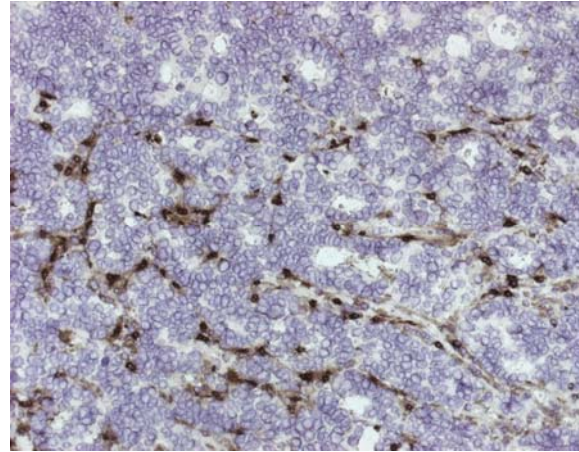


Abb.35:Lebermetastase (18466), CD16,
Obj.20x0,5

Deutlich stärkere NK-Infiltration von Tumorzellnestern und Tumorstroma in den Lebermetastasen, als in den fernmetastasenfreien Präparaten kolorektaler Karzinome.

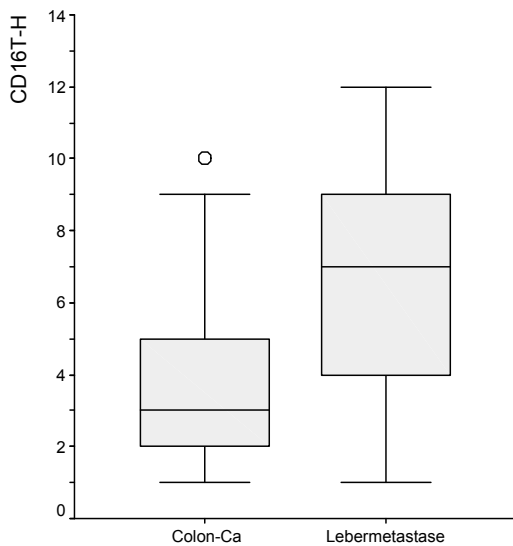


Abb. 36

Signifikant stärkere NK-Infiltration von Tumorzellnestern und Tumorstroma in den Lebermetastasen, als in den fernmetastasenfreien Präparaten kolorektaler Karzinome.

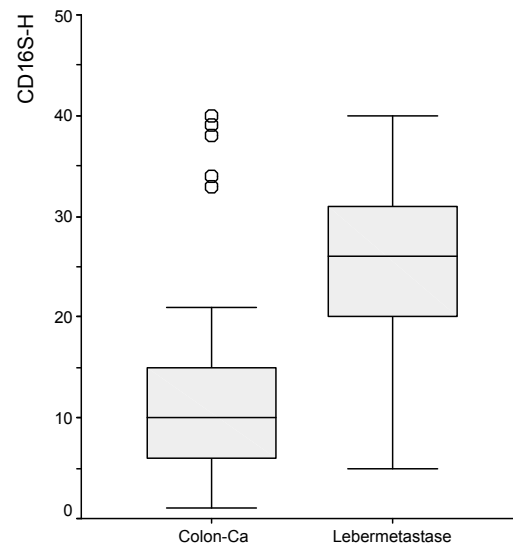


Abb. 37

4.2.7 Das Infiltrat Neutrophiler Granulozyten

Neutrophile Granulozyten wurden mit dem Marker KiMy 2 angefärbt. Bei der Auswertung fiel auf, dass das Infiltrat an Neutrophilen in den Tumorzellnestern deutlich geringer ausgeprägt war als im Tumorstroma (Abb. 38 und 39).

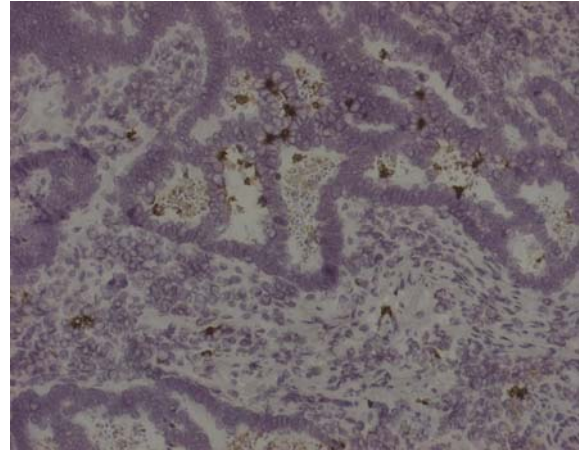
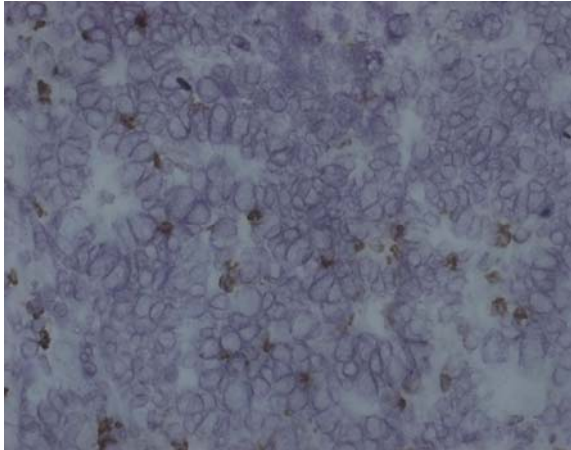


Abb.38: Lebermetastase (1328), KiMy2,Obj. 40x0,75 Abb. 39: Colon-CA (10287), KiMy2, Obj. 20x0,5
Infiltrat an Neutrophilen in Tumorzellbereichen deutlich geringer ausgeprägt als im umgebenden Tumorstroma.

Das Infiltrat im Tumorgewebe der Lebermetastasen war signifikant geringer ($p=0,001$) ausgeprägt, als das der fernmetastasenfreien Kolonkarzinome (Abb. 40 und 41). Dieser Unterschied war sowohl für das Infiltrat in den Tumorzellnestern als auch für das im Tumorstroma signifikant ($p=0,001$ und $p=0,044$).

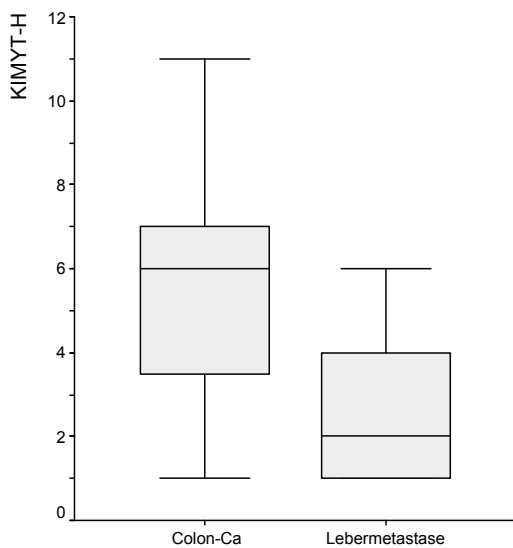


Abb. 40

Signifikant geringeres Infiltrat in Tumorzellnestern, sowie im Tumorstroma der Lebermetastasen, als in den fernmetastasenfreien Kolonkarzinomen.

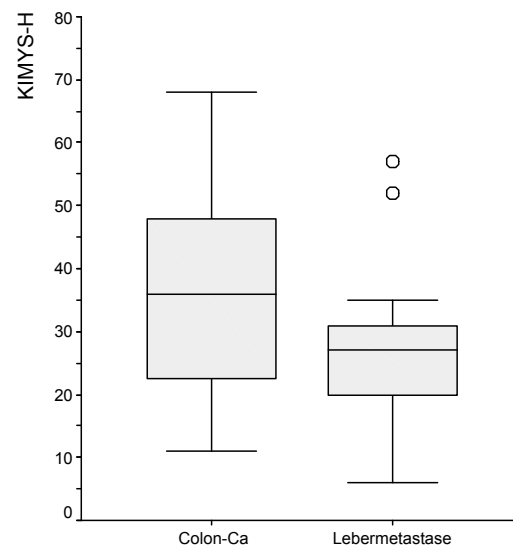


Abb. 41

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen N0 und N2 ließ sich nicht feststellen (Abb. 42 und 43):

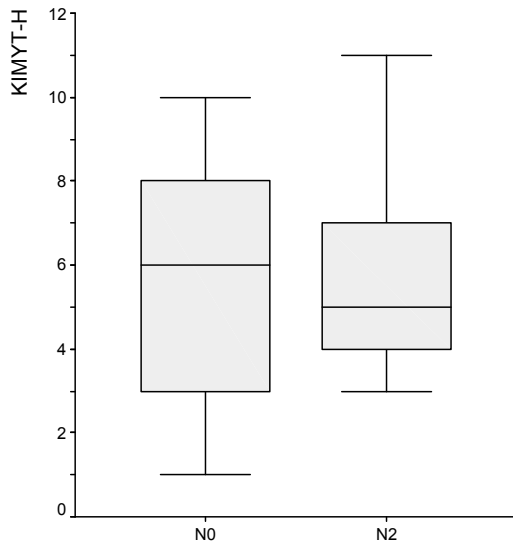


Abb. 42

Kein signifikanter Unterschied zwischen den kolorektalen Karzinomen des Stadiums N0 und N2.

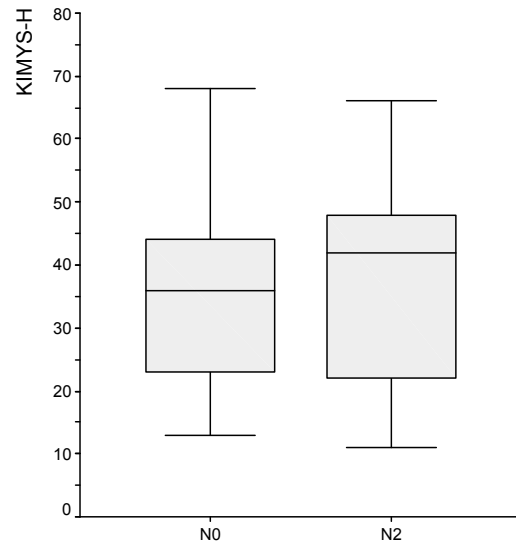


Abb. 43

4.2.8 Das Infiltrat dendritischer Zellen

Die Expression dendritischer Zellen wurde mit den Antikörpern CD 83 und KiM4 untersucht. Da diese Zellen nur sehr vereinzelt nachgewiesen werden konnten, wurde nur mit Hilfe des Scorings sowohl das Tumor- als auch das Tumorstromagewebe beurteilt.

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass sich mit CD 83 angefärbte dendritische Zellen nur vereinzelt zeigten (Abb. 44 und 45) und dabei kein signifikanter Unterschied in der Ausprägung hinsichtlich Tumor- und Tumorstromagewebe von fernmetastasenfreien Kolonkarzinomen und Lebermetastasen zu erkennen war.

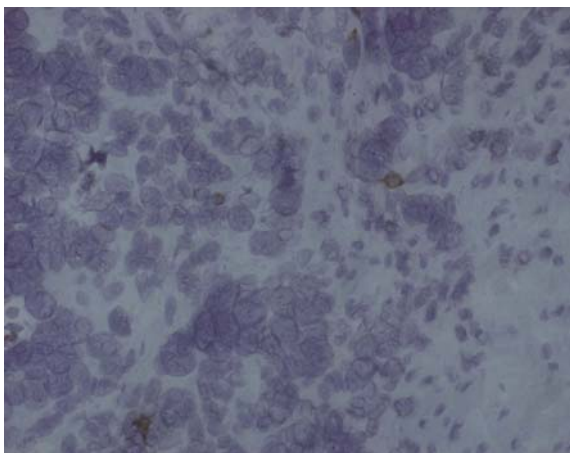


Abb.44: Kolon (Nr.: 27922), CD83, Obj. 40x0,75

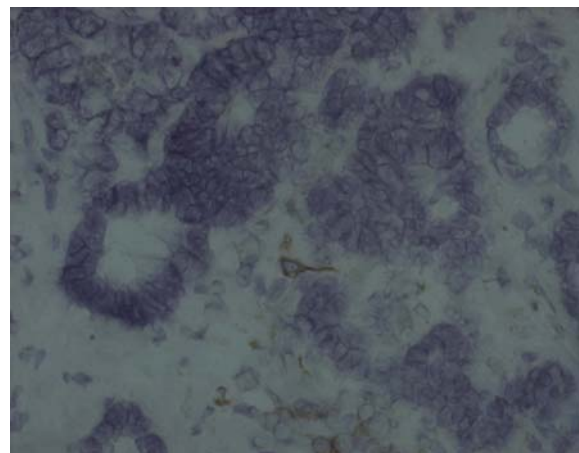


Abb.45: Leber (Nr.: 1704), CD83, Obj. 40x0,75

Vereinzelt konnten dendritische Zellen nachgewiesen werden, welche Tumorzellbereiche infiltrierten.

Mit KiM4 angefärbte follikuläre dendritische Zellen ließen sich vereinzelt im Tumorstroma nachweisen und zwar sowohl in den fernmetastasenfreien Kolonkarzinomen, als auch in den Lebermetastasen. Jedoch fand sich in unseren Präparaten keine einzige positiv angefärbte follikuläre dendritische Zelle, welche die Tumorzellen direkt infiltrierte (Abb. 46 und 47).

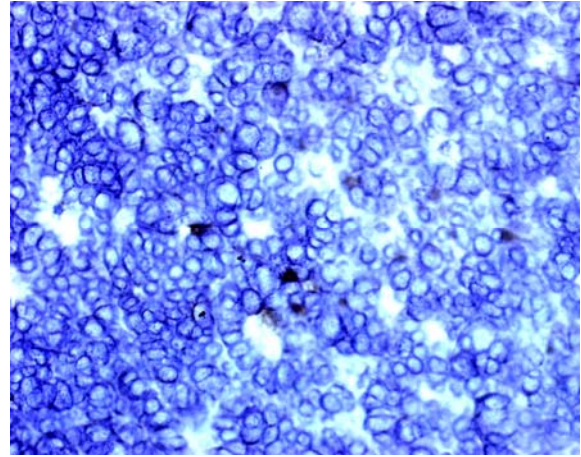
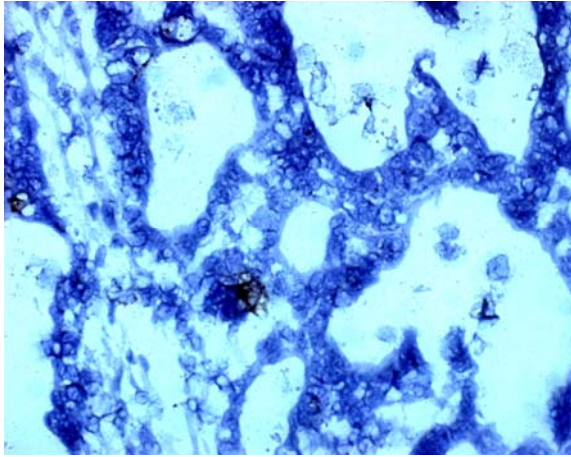


Abb.46: Kolon (Nr.19442), KiM4, Obj. 40x0,75

Abb.47: Leber (Nr.18466), KiM4,Obj. 40x0,75

Vereinzelte angefärbte follikuläre dendritische Zellen im Tumorstroma.

4.2.9 Das Makrophageninfiltrat

Das Infiltrat der Makrophagen wurde mit dem Antikörper KiM1 angefärbt und sowohl in den Tumorzellnestern als auch im Tumorstroma mittels des Scorings bewertet. Auffällig war das deutliche Vorkommen von Makrophagen im Tumorstroma, wo sich immerhin einige bis mäßig viele Makrophagen nachweisen ließen. Jedoch konnten nur vereinzelt Makrophagen gefunden werden, die direkt Kontakt zu den Tumorzellen hatten (Abb. 48 und 49).

Ein signifikanter Unterschied ($p=0,021$ und $p=0,044$) war in der geringer ausgeprägten Anzahl an Makrophagen in den Lebermetastasen im Gegensatz zu den metastasenfrenen Kolonkarzinomen zu erkennen. Das Infiltrat der Gruppen N0 und N2 unterschied sich nicht voneinander.

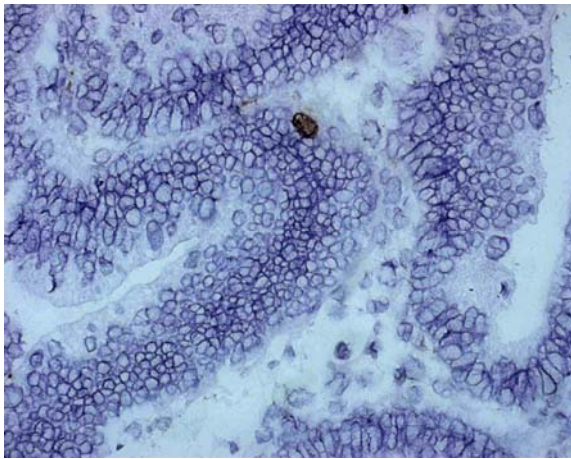


Abb.48: Kolon-CA (25521), KiM1, Obj. 40x0,75
vereinzelt angefärbte Makrophagen mit direktem Kontakt zu den Tumorzellen.

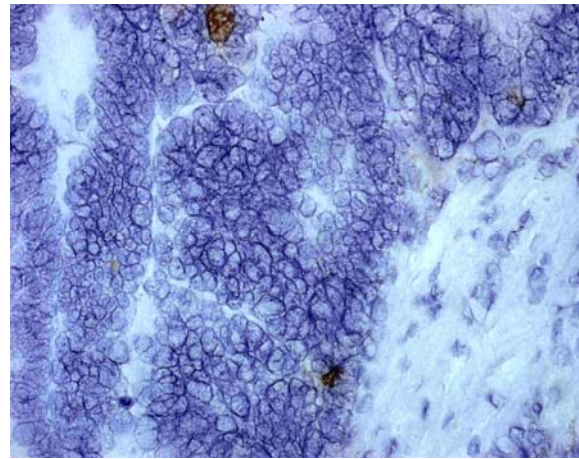


Abb.49: Lebermetastase (9982), KiM1, Obj. 40x0,75

4.2.10 Die Expression von löslichem Fas-Ligand

Wir beurteilten nur die Expression auf den Tumorzellen. Eine Auszählung sowohl einzelner Zellen als auch von Hotspots war nicht möglich. Daher wurden die Tumorzellnester mit Hilfe des Scorings beurteilt. Zusätzlich unterschied sich die Anfärbung innerhalb des Tumors hinsichtlich der Gleichmäßigkeit. So gab es Tumorpräparate in denen die Anfärbung völlig homogen war, es gab aber auch solche mit heterogener Färbung, also mit unterschiedlich intensiver Anfärbung innerhalb eines Präparates. Dies wurde ebenfalls bei der Auswertung mit berücksichtigt.

sFas-Ligand wurde in unterschiedlich starker Ausprägung exprimiert. In allen Präparaten der Lebermetastasen wurde Fas-Ligand überwiegend sehr stark exprimiert (Abb. 51 und 52). Dagegen war die Expression des Fas-Liganden in den Kolonkarzinomen ohne Fernmetastasen

in 50% der Fälle mäßig bis stark und in 50% der Fälle kaum vorhanden (Abb. 50). Das Scoring betrug im Mittel lediglich 3. Bei den Kolonkarzinomen ohne Lymphknotenmetastasen zeigte sich eine starke überwiegend heterogene Anfärbung. Signifikant ($p=0,001$) hob sich diese starke Expression in den N0-Präparaten von einer nur geringen Anfärbung in den Präparaten mit positivem Lymphknotenbefall ab.

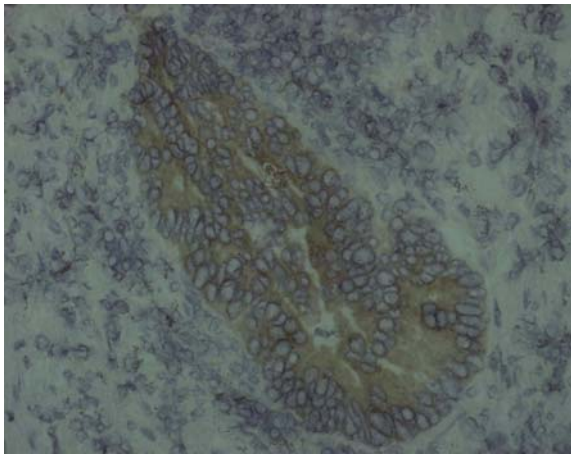


Abb.50: Kolon (27006), Fas-L homogen,
Obj. 40x0,75

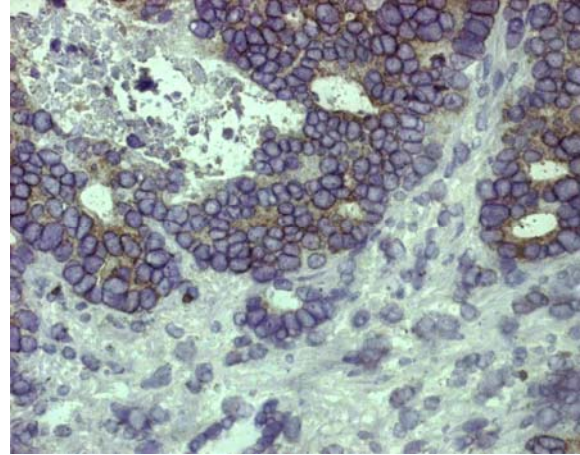


Abb.51: Lebermetastase (18466), Fas-L homogen,
Obj. 40x0,75

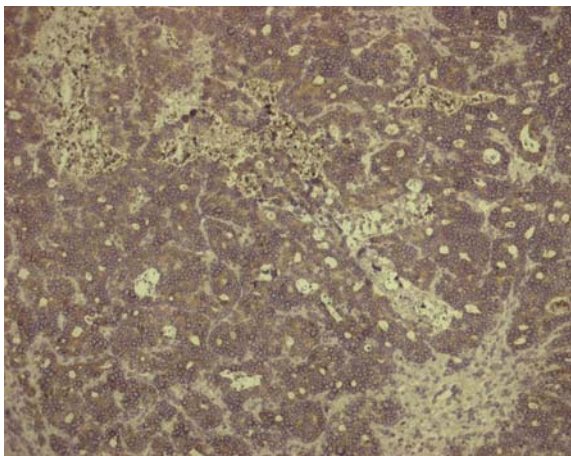


Abb.52: Lebermetastase (18466), Fas-L homogen,
Obj. 10x0,3

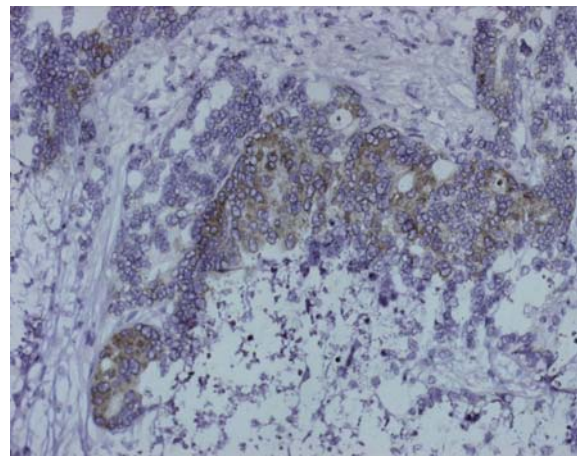


Abb.53: Lebermetastase (1328), Fas-L heterogen,
Obj. 20x0,5

4.2.11 Die Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle

Mit dem Antikörper W6/32 wurde die MHC-Klasse-I-Expression untersucht. In allen Gruppen, also sowohl in den Kolon-Karzinomen mit und ohne Lymphknotenmetastasen, als auch in den Lebermetastasen war die Expression stark bis sehr stark ausgeprägt und unterschied sich nicht signifikant voneinander. Ebenfalls konnte man eine gleichmäßige homogene von einer heterogenen Färbung unterscheiden (Abb. 54 bis 57).

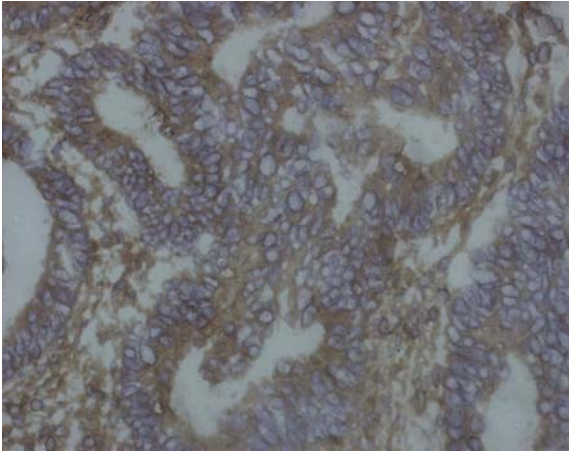


Abb.54: Kolon-Ca (9576), W6/32 **homogen**,
Obj.40x0,75

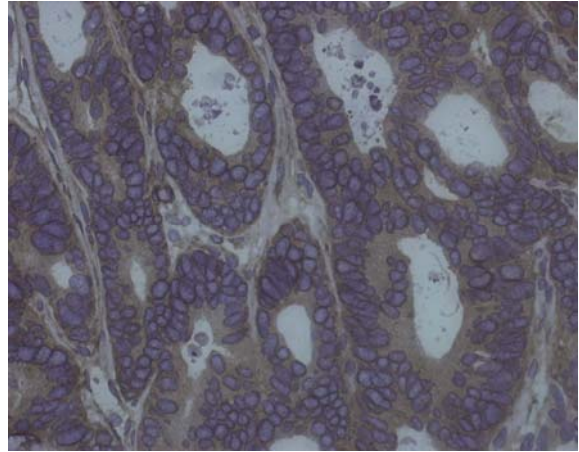


Abb.55: Lebermetastase (9574), W6/32 **homogen**,
Obj. 40x0,75

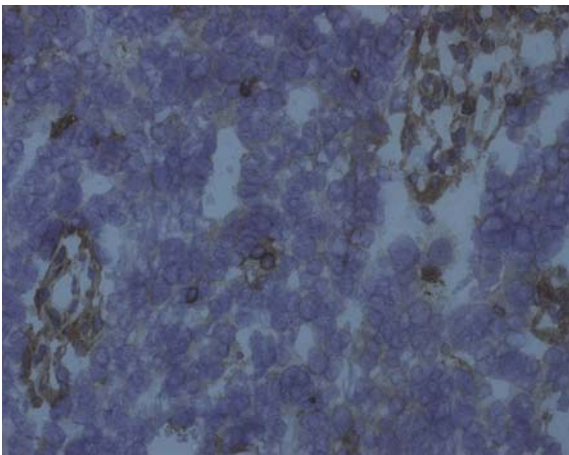


Abb.56: Kolon-Ca (4379), W6/32 **heterogen**,
Obj. 10x0,3

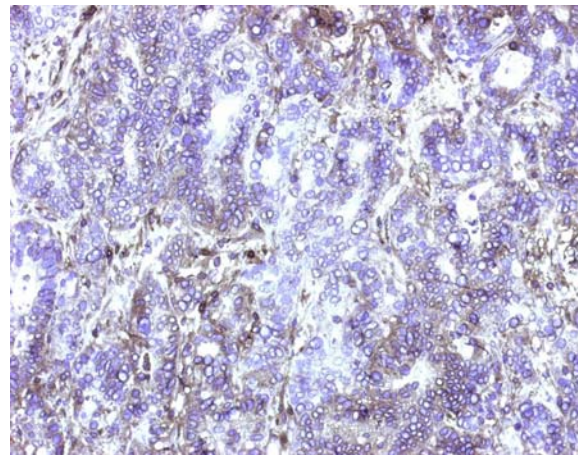


Abb.57: Leberm. (16186), W6/32 **heterogen**,
Obj. 20x0,5

4.3 Angewendete statistische Verfahren

Für die bereits in Kapitel 3.5 erwähnten angewendeten Testverfahren wurde das Programm „SPSS“ im Institut für Medizinische Informatik und Statistik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel verwendet.

Eine Übersicht der ermittelten statistischen Ergebnisse findet sich zur besseren Übersicht in Form von Tabellen (Nr. 8-14) im Anhang.

5 Diskussion

5.1 Ergebnisdiskussion der kolorektalen Karzinome und Lebermetastasen

Das immunzelluläre Infiltrat in malignen Tumoren ist Ausdruck der Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem Tumor und beeinflusst wesentlich den Krankheitsverlauf und damit die Prognose [27].

Lokale Expressionsmechanismen von Malignomen können dazu führen, dass sich Tumoren erfolgreich der Immunantwort entziehen. Dies kann durch Immunzelltrapping, eine Dysfunktion von Todesrezeptoren oder auch eine fehlende Aktivierung von Abwehrzellen geschehen [13, 17, 28].

In der vorliegenden Arbeit wurde das immunzelluläre Infiltrat in primären Kolonkarzinomen sowie in Lebermetastasen von Kolonkarzinomen untersucht.

Trotz meist zahlreicher infiltrierender Zellen waren die potentiellen Effektorzellen der Immunabwehr meist nur im tumorumgebenden Stroma und nicht in den Tumorzellbereichen lokalisiert. Zusätzlich lag bei den T-Zellen als wichtigste Tumoreffektorzellen häufig ein Funktionsverlust, gemessen anhand der CD3 ξ -Kette des T-Zell-Komplexes, vor. In der Regel korrelierte ein Verlust an Effektorzellen mit einer schlechteren Prognose, beziehungsweise dem Vorhandensein von Metastasen.

Dendritische Zellen als professionelle antigen-präsentierende Zellen waren nur vereinzelt zu finden. Makrophagen waren kräftig im tumorumgebenden Stroma zu finden, infiltrierten jedoch fast gar nicht die Tumorzellen. Die hohe Anzahl an Makrophagen im Tumorstroma korrelierte mit einem selteneren Auftreten von Lebermetastasen.

Die Expression des Fas-Liganden war deutlich stärker auf den Tumorzellen der Lebermetastasen zu finden als in metastasenfremen Kolonkarzinomen.

5.1.1 *Das T-Zell-Infiltrat*

In unserer Arbeit nahmen T-Zellen insgesamt unter den tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) den größten Anteil ein, gefolgt von Natürlichen-Killerzellen (NK-Zellen) und B-Lymphozyten. Diese Beobachtung wurde bereits von mehreren Autoren gemacht [29, 30, 31]. Die Subpopulationen der T-Lymphozyten wurden mit Hilfe spezifischer monoklonaler Antikörper in CD4⁺ T-Helfer-Zellen, CD8⁺ zytotoxische T-Zellen und Komponenten des T-Zellrezeptor-Komplexes (CD3zeta und CD3epsilon) unterschieden.

Nicht bestätigen konnten wir das Resultat einiger Arbeiten, nach denen T-Helferzellen häufiger im Tumor zu finden waren als zytotoxische T-Lymphozyten [18, 32, 33]. In unserer Arbeit ergab sich kein signifikanter Unterschied in der gesamten Zellzahl von CD4+ gegenüber CD8+ T-Lymphozyten.

Interessant war der signifikante Verlust an infiltrierenden T-Lymphozyten in den Lebermetastasen, wodurch die Überlegung aufkam, dass ein starkes Infiltrat an T-Lymphozyten mit einer besseren Prognose zusammenhängen könnte, oder dass ein ausreichendes Infiltrat an T-Lymphozyten eine Metastasenentstehung hinauszögern oder sogar verhindern könnte. Dies geht auch aus der Arbeit von Galon et al. hervor, welche die Assoziation zwischen einer hohen Dichte an T-Lymphozyten und Tumoren ohne Fern- und Lymphknotenmetastasen beschreiben [19].

Chiba et al. folgerten, dass das Vorkommen einer ausreichenden Menge an intraepithelialen CD8+ T-Zellen eventuell den Effekt einer Unterdrückung von Mikrometastasen vermitteln könnte [34].

Keinen signifikanten Unterschied konnten wir hinsichtlich des T-Zell-Infiltrates zwischen Kolonkarzinomen des Stadiums N0 und solchen mit Lymphknotenmetastasen des Stadiums N2 feststellen. Dies widerspricht Daten aus der Arbeit von Oshikiri et al., in der extrahepatische Gallengangs-Karzinome untersucht wurden und eine Beziehung zwischen dem Grad der intratumoralen CD8+ T-Zellen-Invasion und einem geringeren Vorkommen an Lymphknotenmetastasen postuliert wird [35].

Ein weiteres Phänomen, das für die Malignität eines Karzinoms verantwortlich sein könnte ist das so genannte „Immunzelltrapping“, welches wir in unserer Arbeit ebenfalls überprüften und auch nachweisen konnten. Dabei ist die Mehrheit der T-Lymphozyten im Tumorstroma lokalisiert, eine direkte Infiltration der Immunzellen in die malignen Zellen findet nur selten statt. Die Immunzellen siedeln sich besonders entlang einer „invasive margin“ [36, 37], einer Grenzzone außerhalb der Tumorzellnester an und gehen kaum über diese hinaus.

In unserer Arbeit konnten wir keinen signifikanten Zusammenhang zwischen T-Zell-Infiltrat und der Überlebenszeit der Patienten nachweisen. Beschrieben wurde dies aber von Galon et al. [37]. Auch Naito et al. beschreiben, dass das CD8+ T-Zell-Infiltrat in Tumorzellnestern als ein prognostischer Indikator in kolorektalen Karzinomen gelten könnte. Dabei korrelierte ein hohes Infiltrat an CD8+ T-Lymphozyten in den Tumorzellnestern mit einem niedrigen Stadium der Dukes-Klassifikation [36].

Auch Paget et al. [18] und von Bernstorff et al. [17] wiesen in ihren Arbeiten auf dieses Phänomen hin. Um nicht nur die Anwesenheit sondern auch die Funktion der T-Lymphozyten

beurteilen zu können, wurde die Expression der CD3 ζ -Kette untersucht. In dieser Arbeit war die Anzahl der CD3 ζ -exprimierenden Zellen zum Teil deutlich geringer als die der CD3 ϵ -exprimierenden Zellen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Mehrzahl der T-Lymphozyten inaktiv sein musste. Dies würde unsere These unterstützen, dass die Verminderung an aktiven T-Lymphozyten im Infiltrat ein Mechanismus des Tumors sein könnte, einer erfolgreichen Abwehr zu entkommen und bietet Erfolg versprechende Ansatzpunkte für immuntherapeutische Konzepte, die vor allem auf die Wiederherstellung der T-Zellfunktion und Aktivierung der Antigenpräsentation gerichtet sein müssen.

Diese Überlegung wurde auch dadurch bekräftigt, dass in unseren untersuchten Geweben eine signifikant niedrigere Anzahl an CD3 ζ + Zellen in den Lebermetastasen und ebenfalls in den Kolon-Karzinomen mit vorhandenen Lymphknotenmetastasen zu finden war.

Interessant war unser Nachweis eines signifikanten Zusammenhanges hinsichtlich eines Überlebensvorteils für Patienten mit einem hohen Anteil an tumorinfiltrierenden CD3 ζ + Lymphozyten gegenüber einer kürzeren Überlebensrate von Patienten mit einem reduzierten Infiltrat an aktivierten T-Lymphozyten in den Tumorzellnestern und umgebendem Tumorstroma. Der Verlust von CD3 ζ in tumorinfiltrierenden T-Zellen konnte damit als ein negativer Prognosefaktor für das Kolonkarzinom beschrieben werden [38].

Bereits 1997 untersuchten Mulder et al. ebenfalls kolorektale Karzinome und stellten fest, dass die Anzahl an CD3 ζ + T-Lymphozyten in normaler Kolonmukosa bis hin zum Karzinom Stadium Dukes D signifikant abnahm [39]. Bernstorff et al. lieferten ähnliche Ergebnisse für das duktales Pankreaskarzinom [17]. Im Einklang mit unseren Daten stehen Ergebnisse von Ishigami et al.: die CD3 ζ -Expression in TILs wurde von dieser Gruppe als ein Prognosemarker für Patienten mit Magen-Karzinomen postuliert, wobei ein reduziertes Infiltrat an CD3 ζ + T-Lymphozyten mit einer erhöhten Rate an Lymphknotenmetastasen und einer niedrigeren Überlebenswahrscheinlichkeit einherging [40].

Besonders interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Forschungsergebnisse der Gruppe um Whiteside, welche die Herabregulation der CD3 ζ -Expression in Ovarialkarzinomen als einen neuen Biomarker für die Prognose von Tumorpatienten postulieren. Als Ursache für die deutlich verminderte Expression der CD3 ζ -Kette bei Tumorpatienten nennen sie Fas-induzierte Apoptose [24, 41, 42]. Wir haben den direkten Zusammenhang zwischen der Expression des Fas-Liganden, welcher besonders stark in den Kolonkarzinomen mit Fernmetastasen in der Leber exprimiert wird, und der supprimierten Expression der CD3 ζ -Kette in metastasierten Karzinomen nicht untersucht. Der Verlust aktivierter T-Lymphozyten durch tumorinduzierte Apoptose ist jedoch denkbar und ein

Zusammenhang zwischen der niedrigen Anzahl CD3 ζ -exprimierender Lymphozyten und der hohen Fas-L-Expression in fortgeschrittenen Tumorstadien der untersuchten Kolonkarzinome liegt nahe.

5.1.2 Das Infiltrat der B-Lymphozyten

B-Lymphozyten machten unter den infiltrierenden Immunzellen in den von uns untersuchten Kolonkarzinomen und Lebermetastasen den geringsten Anteil aus. Beispiele für ein nur minimales Infiltrat an B-Lymphozyten sind auch Berichten von Hirota et al. für Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle [43], Horny et al. für duktale Mammakarzinome [44], Li et al. für Larynxkarzinome [45] und Bohme et al. für Endometriumkarzinome [46] zu entnehmen. Allgemein wird dieses Resultat als ein Mechanismus angesehen, mit welchem sich Tumoren einer erfolgreichen Immunantwort entziehen können.

Einen signifikanten Unterschied im B-Zell-Infiltrat zwischen nodal-positiven und nodal-negativen Patienten gab es bei uns nicht. Auffallend war die signifikant höhere Infiltration der B-Lymphozyten im Tumorstroma der Lebermetastasen, verglichen mit den fernmetastasenfreien Kolon-Karzinomen. Somit zeigte sich kein positiver Zusammenhang zwischen B-Zell-Infiltrat und besserer Prognose. Hinsichtlich der untersuchten Überlebenszeit konnte kein Zusammenhang mit dem B-Zell-Infiltrat erfasst werden. Diese Ergebnisse lassen uns vermuten, dass B-Lymphozyten eine nur geringe Bedeutung in der Immunabwehr von Kolon-Karzinomen spielen könnten.

Dagegen spricht das Ergebnis von Nzula et al., aus deren Untersuchungen ein starkes Vorkommen von B-Lymphozyten in medullären Mammakarzinomen hervorgeht, welches sie auf die bessere Prognose dieser Tumoren im Vergleich mit höher malignen Brustkrebserkrankungen, resultierend aus einer positiven humoralen Immunantwort, zurückführen [47]. Ob sich diese differenten Beobachtungen durch die völlig unterschiedliche Art der Karzinome erklären lassen, oder ob verschiedene Methoden zum Nachweis der B-Lymphozyten einen Grund liefern könnten, muss an dieser Stelle unbeantwortet bleiben.

5.1.3 Das Infiltrat Natürlicher Killerzellen

Die klinische Bedeutung einer Tumordinfiltration durch NK-Zellen ist Gegenstand der aktuellen Forschung, die Forschungsergebnisse in der Literatur sind kontrovers. Die Zytotoxizität dieser Zellen scheint eine wichtige Rolle in der Abwehr von Karzinomen zu spielen [48].

In unserer Arbeit waren die vorherrschenden Immunzellen zwar T-Lymphozyten, NK-Zellen waren aber immerhin in mäßiger Anzahl zu finden, womit wir die Untersuchungsergebnisse bereits vorhandener Arbeiten bestätigen konnten [29, 30, 31].

Das bereits bei den T-Lymphozyten beschriebene „Immunzelltrapping“ konnten wir ebenfalls bei den NK-Zellen finden. Die Anzahl der sich im Stroma befindlichen NK-Zellen war wiederum deutlich höher als die der tumorinfiltrierenden Zellen. Somit bestätigen wir die Beobachtungen von Hagens et al., die Lebertumoren von Ratten überprüften und entdeckten, dass NK-Zellen mehrheitlich im Tumorstroma und nur selten in direktem Kontakt mit den Tumorzellen zu finden waren [49]. In diesem Zusammenhang sind auch Sandel et al. und Koch et al. zu erwähnen, die diese Ergebnisse für kolorektale Karzinome zeigen konnten [50, 51].

Keinen signifikanten Unterschied konnten wir in der Infiltrationsstärke bei den Patienten mit bzw. ohne Lymphknotenmetastasen feststellen. Die Ergebnisse von Ishigami et al. weisen jedoch darauf hin, daß ein starkes NK-Zell-Infiltrat mit dem Vorkommen von weniger Lymphknotenmetastasen bei Patienten mit Magenkarzinomen korreliert [52].

Bemerkenswert ist der signifikant höhere Anteil sowohl tumor- als auch tumorstromainfiltrierender NK-Zellen bei unseren Patienten mit Lebermetastasen im Vergleich zu den metastasenfremen Kolon-Karzinomen. Außerdem zeigten Patienten mit einer kürzeren Überlebenszeit einen (allerdings nicht signifikant) höheren Anteil an NK-Zellen, als Patienten mit einer längeren Überlebensrate. Das könnte für unsere Ergebnisse bedeuten, dass mit steigender Malignität die Anzahl der NK-Zellen zunimmt. Norris et al. hoben hervor, dass die Zahl der NK-Zellen in maligne verändertem Lebergewebe im Gegensatz zu histologisch gesundem Lebergewebe ansteigt [53]. Zu erwähnen sind auch Freudenberg et al., die in Blut und Lebern von Mäusen untersuchten, ob eine Früherkennung von Metastasen aufgrund von Veränderungen im zellulären Immunsystem möglich sei. In metastasiertem Lebergewebe war ein Anstieg von NK-Zellen vorhanden [54].

Andererseits lieferten einige Arbeitsgruppen Beispiele dafür, dass ein Anstieg von Natürlichen Killerzellen eine signifikant bessere Prognose für die Patienten bedeutete, wie Untersuchungen am Ösophagus-Karzinom [55, 56], am Adenokarzinom der Lunge [57], am Magenkarzinom [52] und auch am kolorektalen Karzinom des Stadiums TNM III [58] zeigten.

Nakakubo et al. beschäftigten sich mit Patienten, die ein Gallenblasenkarzinom aufwiesen und sahen keinen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Natürlichen Killerzellen und klinisch-pathologischen Faktoren [59].

5.1.4 *Das Infiltrat Neutrophiler Granulozyten*

Die Aufgabe Neutrophiler Granulozyten in Tumoren ist unklar. Zum einen fungieren Neutrophile Granulozyten als nicht spezifische Effektorzellen gegen Tumoren [47], sie sind fähig Tumorzellen abzutöten [60] und verantwortlich für eine Tumorsuppression [61]. Zum anderen sind Neutrophile Granulozyten in der Lage, immunsuppressive Faktoren und Angiogenese-induzierende Substanzen frei zu setzen [60].

Das bereits erwähnte „Immunzelltrapping“ konnten wir in der deutlich überwiegenden Anzahl an Neutrophilen im Tumorstroma gegenüber dem Infiltrat in Tumorzellnestern wieder finden. In unseren untersuchten Präparaten der Patienten mit Kolon-Karzinomen der Stadien N0 und N2 kamen Neutrophile Granulozyten in einer hohen Anzahl vor, ein signifikant geringeres Infiltrat war in den Lebermetastasen vorhanden. Dies läßt uns vermuten, dass eine verminderte Anzahl an Neutrophilen eine prognostisch schlechtere Bedeutung hat, indem die Tumorabwehr geschwächt ist. Eine längere Überlebensrate konnten wir für Patienten mit einem hohen Neutrophilen-Infiltrat jedoch nicht nachweisen.

In diesem Zusammenhang ist eine Studie an Patienten mit fortgeschrittenem Magenkarzinom zu erwähnen, in der ein niedrigeres Mortalitätsrisiko bei weiblichen Patienten mit einer hohen Anzahl an Neutrophilen Granulozyten beschrieben wird [47].

Interessante Ergebnisse lieferte der Vergleich des Neutrophileninfiltrates in den Geschlechtern: Vergleicht man in unserer Arbeit die Neutrophilenzahl in den Geschlechtern, so fällt ein statistisch signifikanter Unterschied bei den Patienten mit Lebermetastasen auf, wobei das Infiltrat im Tumorstroma von weiblichen Patienten um ein fünffaches höher ist als das männlicher Patienten. Ähnliche Ergebnisse gehen auch aus der Arbeit von Caruso et al. hervor [47]. Einen Zusammenhang mit einem eventuellen Überlebensvorteil weiblicher Patienten konnten wir nicht feststellen, die Anzahl der vorliegenden Überlebensdaten von den Patienten mit Lebermetastasen war zu gering. Daß es geschlechtsspezifische Unterschiede in der humoralen und zellulären Immunantwort gibt, ist experimentell und klinisch belegt. Frauen haben im Mittel höhere Plasmaantiköpertiter als Männer und die zelluläre Immunantwort ist bei Frauen verstärkt. Der Krankheitsverlauf bei Sepsis, Schock und Trauma wird wesentlich von der akut eskalierenden Entzündungsreaktion des Organismus determiniert. Diese Immunantwort scheint bei den Geschlechtern unterschiedlich auszufallen, mit einem klaren Überlebensvorteil für das weibliche Geschlecht [62]. In der Liteartur findet man jedoch kaum Untersuchungen über den sexuellen Dimorphismus bei Tumorpatienten.

5.1.5 *Das Infiltrat dendritischer Zellen*

Dendritische Zellen sind die effizientesten Antigen-präsentierenden Zellen und spielen eine Schlüsselrolle in der zellulären Immunantwort gegenüber Tumoren [63].

Mit den monoklonalen Antikörpern CD83 und KiM4 untersuchten wir folliculäre, interdigitierende und zirkulierende Dendritische Zellen (DC). Folliculäre DC zeigen Phagozytose-Aktivität und sind für die Antigenpräsentation zuständig. Interdigitierende DC sind die potentesten Stimulatoren für naive T-Lymphozyten.

Zahlreiche Autoren beschrieben bereits einen positiven Zusammenhang zwischen dem quantitativen Tumordinfiltrat an DC und der Überlebensrate der untersuchten Patienten [64,65, 66,67].

Mit CD83 markierte DC waren insgesamt nur vereinzelt in unseren Präparaten zu finden und zwar sowohl in den Tumorzellenstern, als auch im Tumorstroma. Dabei gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Infiltrat in Kolon-Karzinomen ohne und mit Lymphknotenmetastasen und den untersuchten Lebermetastasen.

Mit KiM4 markierte folliculäre DC waren in den Tumorzellnestern überhaupt nicht vorhanden, wohingegen sie im Tumorstroma vereinzelt nachzuweisen waren.

Dallal et al. beschäftigten sich mit dem Infiltrat an DC in Pankreaskarzinomen, wobei sie nur in 2 von 47 untersuchten Patienten eine signifikante Anzahl beschrieben [68]. Ausserdem erwähnten sie die Lokalisation der DC, die vor allem außerhalb des Tumors angesiedelt waren. Diese Ergebnisse stimmen mit den in unserer Arbeit gemachten Beobachtungen für den Marker KiM4 in den Kolon-Karzinomen und den Lebermetastasen überein.

Ein Vorkommen der DC vor allem im Tumorstroma und seltener in den Tumorzellnestern wurde auch in Arbeiten für kolorektale Karzinome [63, 69, 70], Lebermetastasen [71], aber auch für Cholangiozelluläre Karzinome [72] hervorgehoben.

Aufgrund der insgesamt geringen Anzahl an DC in unseren Präparaten konnten wir keine Aussagen über einen möglichen Zusammenhang zwischen DC-Infiltrat und dem Auftreten von Lebermetastasen und somit über die Malignität machen. Ebenso war es nicht möglich, einen Bezug zu den Überlebensdaten herzustellen. Von mehreren Autoren wurde eine Korrelation zwischen dem Auftreten von DC und der Prognose oder der Malignität postuliert. So war die Anzahl CD83+ DC bei Patienten mit Hepatozellulären Karzinomen geringer als bei Patienten mit Leberzirrhose [73], ebenso war die Anzahl DC bei Patienten mit Kolon-Karzinomen gegenüber gesunder Kolon-Mukosa dreifach geringer und bei Patienten mit Metastasen sogar sechsfach niedriger [74].

Reichert et al. machten eine geringe Anzahl an DC bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle für eine kürzere Überlebensrate verantwortlich. Ausserdem korrelierte die Anzahl DC mit derjenigen CD3zeta+ Lymphozyten, wobei eine gänzlich schlechtere Prognose mit einem geringen Infiltrat an DC und wenigen CD3zeta+ Lymphozyten zusammenhing [65]. Dieser Vergleich mit CD3zeta+ T-Lymphozyten war in unserer Arbeit aufgrund der zu geringen Infiltration durch DC nicht möglich.

Einen Unterschied zwischen Kolon-Karzinomen der Stadien N0 gegenüber N2 konnten wir, wiederum aufgrund der geringen Anzahl der DC, nicht nachweisen. Ishigami et al. beschrieben jedoch ein selteneres Auftreten von Lymphknotenmetastasen bei Patienten mit Magenkarzinomen, die ein hohes Infiltrat an DC aufwiesen [75], dieselben Ergebnisse lieferten Takagi et al. für Cholangiozelluläre Karzinome [72] und Nakakubo et al. für das Gallenblasenkarzinom [59]. Nakayama et al. führten ein häufigeres Auftreten von LK-Metastasen auf ein nur geringes Infiltrat an DC zurück [76].

Die oben genannten Ergebnisse zeigen, dass ein geringes Infiltrat an Dendritischen Zellen häufig eine eingeschränkte zelluläre Immunantwort gegenüber malignen Zellen bedeuten kann und somit fortschreitendes Tumorwachstum, Metastasierung und kurze Überlebensraten begünstigt werden können. Aufgrund der geringen Anzahl an nachweisbaren DC in unseren Präparaten können wir hierzu keine Aussagen machen.

5.1.6 Das Makrophageninfiltrat

Den Makrophagen werden unterschiedliche Funktionen zugeschrieben. Zum einen dienen sie als Effektorzellen der Infektabwehr, die wichtigsten Funktionen hierbei sind Phagozytose, Zytotoxizität, Kooperation mit Lymphozyten und Sekretion verschiedenster biologisch aktiver Produkte [20]. Zum anderen wurde ihnen die Eigenschaft zugeschrieben, Einfluss auf das Tumorwachstum nehmen zu können, indem sie Angiogenesefaktoren produzieren [77, 78] und damit das Tumorwachstum fördern. Weiterhin wurde postuliert, dass Tumor-assoziierte Makrophagen eine komplexe Beziehung mit neoplastischen Zellen eingehen und auf der einen Seite Wachstumsfaktoren produzieren, auf der anderen Seite aber auch Tumorwachstum verhindern und neoplastische Zellen zerstören könnten [79].

Das Makrophageninfiltrat war in unseren Präparaten vor allem im Tumorstroma lokalisiert und zwar sowohl in den Kolon-Karzinomen der Stadien N0 und N2, als auch in den Fernmetastasen der Leber. Das Makrophageninfiltrat im Tumorstroma fand sich in ähnlich starker Ausprägung wie CD4+ und CD8+ T-Zellen.

Die Anzahl der Makrophagen im Tumor direkt war dagegen nur sehr gering ausgeprägt. Daraus folgern wir, dass infiltrierende Makrophagen keine direkte zytotoxische Wirkung auf die Tumorzellen haben und diese so einer Phagozytose geschickt entgehen könnten. Ähnliche Beobachtungen machten Horny et al. beim duktalem Mamakarzinom [33] und beim intestinalen Adenokarzinom [44], ebenso Oosterling et al. am Kolon-Karzinom-Modell [80]. Es gibt eine Arbeit, in der die Lokalisation der Makrophagen in Endometrium-Karzinomen histologisch untersucht wurde. Eine hohe Anzahl an Makrophagen innerhalb von Tumorzellnestern korrelierte dabei mit einer geringen Rezidivrate nach der Operation. Eine hohe Anzahl an Makrophagen im Tumorstroma dagegen begünstigte die Entstehung von Lymphknotenmetastasen [81]. Ohno et al. ordneten dem Vorkommen von Makrophagen in Tumorzellnestern eine bessere Prognose zu [82].

In unseren Untersuchungen ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten ohne und mit Lebermetastasen feststellen. Es zeigten sich höhere Makrophagen-Infiltrationen in Kolonkarzinomen ohne Fernmetastasen und weniger Makrophagen im Tumorstroma, vor allem aber auch in Tumorzellnestern bei Patienten mit Lebermetastasen. Somit scheint eine hohe Anzahl an infiltrierenden Makrophagen mit dem selteneren Auftreten von Lebermetastasen zu korrelieren.

Bezüglich der Überlebensrate der Patienten konnten wir keine Korrelation mit dem Makrophageninfiltrat feststellen.

Einen signifikanten Unterschied in der Anzahl an Makrophagen zwischen Kolon-Karzinomen des Stadiums N0 und N2 konnten wir nicht nachweisen, entgegen der Beobachtung von Funada et al., die ein hohes Makrophageninfiltrat in kolorektalen Karzinomen ohne Lymphknotenmetastasen fanden und ein nur geringes Infiltrat bei vorhandenen Lymphknotenmetastasen [83]. Ähnliche Ergebnisse lieferten auch Tan et al. in ihren Untersuchungen von Patienten mit kolorektalen Karzinomen [84]. Im Gegensatz dazu interpretierten Marcus et al. eine hohe Anzahl an Makrophagen als einen Anhalt für die Entstehung von Lymphknotenmetastasen und ein Maß für die Aggressivität in Plattenepithel-Karzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx [85]. All diese Ergebnisse unterstreichen, dass Makrophagen sowohl tumorfördernd als auch tumorhemmend wirken können.

5.1.7 Die Expression von MHC-I

Es gibt verschiedene Tumorescapemechanismen, durch die sich der Tumor einer erfolgreichen Immunüberwachung entziehen kann. Einer davon ist die Herunterregulierung

oder der vollständige Verlust von MHC-Klasse-I-Molekülen, wodurch eine Präsentation von MHC-Klasse-I-abhängigen tumorspezifischen Antigenen und damit die zytotoxische Immunantwort durch T-Lymphozyten erschwert oder verhindert wird [28].

In verschiedenen Arbeiten konnte eine Herabregulation oder der Verlust von MHC-Klasse-I-Molekülen in unterschiedlichen Tumoren beschrieben werden. So zum Beispiel in Mammakarzinomen [86], in kolorektalen Karzinomen [12, 87], in Zervixkarzinomen [88], in Plattenepithelkarzinomen des Kopf- Halsbereiches [89] oder in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen [90].

Andererseits können Tumorzellen mit herabregulierter oder verllorener MHC-Klasse-I-Expression von NK-Zellen erkannt und durch diese lysiert werden [91].

Daher bestehen teilweise deutliche Unterschiede in der Bedeutung der MHC-Klasse-I-Herabregulation für die Prognose der Patienten. So beschreiben Menon et al. in einer Untersuchung von kolorektalen Karzinomen eine Korrelation zwischen reduzierter MHC-Klasse-I-Expression und einem niedrigeren Tumorstadium und einer längeren rezidivfreien Überlebenszeit. Als Erklärung vermuten sie eine Eliminierung der MHC-I-negativen Zellen durch Natürliche Killerzellen oder eine abgeschwächte Tumoraggressivität [92].

Dagegen spricht das Ergebnis von Goepel et al., in deren Untersuchungen eine Herabregulation beziehungsweise ein Verlust von MHC-Klasse-I-Molekülen in Kolon- und Mamma-Karzinomen verbunden war mit einer erhöhten Metastasenbildung [93].

Auch in unseren untersuchten Präparaten war eine, allerdings nur gering ausgeprägte Herabregulation, in wenigen Fällen sogar ein Verlust der MHC-I-Moleküle, zu erkennen. Jedoch wurden diese auf der Oberfläche der meisten Tumorzellen teils homogen, teils heterogen eher stark exprimiert und zwar ohne signifikanten Unterschied zwischen kolorektalen Karzinomen ohne Fernmetastasen und den untersuchten Lebermetastasen. Die MHC-I-Expression korrelierte dabei nicht mit der Überlebenszeit der Patienten. Dies könnte bedeuten, dass dieser Escapemechanismus für das Kolorektale Karzinom nur eine geringe Rolle spielt. Eventuell war die Anzahl der von uns untersuchten Präparate auch zu gering, um einen Zusammenhang zwischen MHC-Klasse-I-Verlust und Überlebenszeit der Patienten nachzuweisen.

Ähnliche Ergebnisse existieren auch in einer Arbeit von Menon et al., die kolorektale Karzinome und Lebermetastasen untersucht haben und in den meisten Fällen keine Herabregulation oder einen Verlust von MHC-I vorfanden; einen signifikanten Unterschied in der Expression zwischen den Primärtumoren und den Lebermetastasen konnten sie ebenfalls nicht feststellen [94].

Ebenfalls werden unsere Beobachtungen in der Arbeit von Nijman et al. bestätigt. Sie analysierten die MHC-I-Expression von Patienten mit serösem Ovarialkarzinom und stellten nur bei einer Patientenminderheit Herabregulation fest. Sie führten ihre Ergebnisse auf eine untergeordnete Bedeutung dieses Escapemachanismus für diesen Tumor zurück [95]. Ein weiterer Bericht, der diese Erkenntnisse unterstützt, existiert von Scupoli et al., die in nahezu allen untersuchten Adenokarzinomen des Pankreas eine Expression von MHC-I-Molekülen nachweisen konnten [96]. Ähnliche Ergebnisse beschrieb Bayer in seinen Untersuchungen des Pankreaskarzinoms [25].

5.1.8 Die Expression des Fas-Liganden

Fas-Ligand (Fas-L) gehört zur Familie der Tumornekrosefaktor-Zelloberflächenrezeptoren. Das Fas/Fas-L-System ist an der Induktion der Apoptose, des programmierten Zelltodes, beteiligt.

Aus mehreren Arbeiten verschiedener Autoren geht hervor, dass Fas-L von den Tumorzellen unterschiedlicher Karzinome exprimiert wird. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass dieses ein Mechanismus maligner Zellen sein könnte, sich einer erfolgreichen Immunantwort durch Induktion von Apoptose immunkompetenter Zellen zu entziehen.

Unsere Ergebnisse weisen in dieselbe Richtung, wir untersuchten jedoch die deutlich seltener beschriebene Form des löslichen (s) Fas-L. In der Mehrheit der von uns untersuchten Kolon-Karzinom-Präparate wurde sFas-L sowohl heterogen als auch homogen von den Tumorzellen exprimiert, von der Hälfte der Präparate sogar mässig bis sehr stark. Besonders stark war die sFas-L-Expression in den Tumorzellbereichen der Lebermetastasen ausgeprägt, die signifikant höher war, als die Expression in den fernmetastatenfreien Kolon-Karzinomen. Es könnte ein Zusammenhang bestehen zwischen einer tumorinduzierten Apoptose immunkompetenter Zellen durch die Expression von Fas-L und der prognostischen Bedeutung für den Patienten hinsichtlich der Entstehung von Fernmetastasen.

Eine höhere sFas-L-Expression in den von uns untersuchten Kolon-Karzinomen mit positivem Lymphknotenbefall im Vergleich zu N0-Karzinomen konnten wir nicht finden. Ebenso sahen wir keinen Zusammenhang zwischen einer starken sFas-L-Expression und einer kürzeren Überlebenszeit der Patienten.

Mann et al. untersuchten kolorektale Karzinome und fanden Fas-L auf allen Tumorzellen in Lebermetastasen, aber nur auf 30-40% der Tumorzellen in Kolon-Karzinomen ohne Lebermetastasen. Zusätzlich fiel ihnen eine stärkere Herabregulation der TILs in den Kolon-Karzinomen mit Fernmetastasen auf. Sie interpretierten die Fas-L-Expression als einen

möglichen Faktor für die Entstehung von Fernmetastasen und zwar entweder durch die Elimination aktivierter TILs über Fas-induzierte Apoptose, oder über andere, bisher unbekannte Mechanismen [97].

O'Connell et al. lieferten bereits 1996 ein Beispiel dafür, dass Tumorzellen in Kolon-Karzinomen und in einer weiteren Arbeit in Ösophaguskarzinomen reichlich die membrangebundene Form des Fas-L exprimieren und ein signifikanter Zusammenhang mit der reduzierten Anzahl tumorinfiltrierender Lymphozyten besteht, „Fas-counterattack“ genannt [98, 99, 100]. Die Ergebnisse ihrer aktuellen Arbeit zeigen sogar, dass eine Herabregulation der Fas-L-Expression in Tumorzellen in einer verbesserten immunologischen Tumorabwehr resultiert [101]. Die Expression von membrangebundenem Fas-L durch Tumorzellen wurde auch bei Melanomen [102], nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen [103], Mammakarzinomen [104], Nierenzell-Karzinomen [105] und Pankreas-Karzinomen [106, 107, 108] bestätigt.

Erst kürzlich wurde eine Arbeit von Zhang et al veröffentlicht, die ähnliche, mit unseren Studien vergleichbare Ergebnisse lieferte, allerdings wurde hier die membrangebundene Form von Fas-L untersucht: Fas-L wurde in 62% der untersuchten Kolon-Karzinome und in 100% der Lebermetastasen exprimiert. Eine höhere Rate an Fas-L wurde auch in fortgeschrittenem Stadium und bei positivem Lymphknotenbefall entdeckt. Die Autoren vermuten einen Überlebensvorteil für die Fas-exprimierenden Tumorzellen dadurch, dass sie einer erfolgreichen Immunantwort entgehen könnten und so Tumorwachstum und Metastasierung begünstigt werden könnten [109].

Desweiteren beschäftigten wir uns mit der Frage nach einer möglichen Sezernierung des sFas-Liganden durch die Tumorzellen. In einigen Präparaten konnte man durchaus den Eindruck einer, wenn auch minimalen Sezernierung des Fas-L durch die Tumorzellen gewinnen, da zum Teil eine deutliche in einigen Präparaten auch diffuse, perimembranöse Färbung vorhanden war. Eine Sezernierung des Fas-L durch die Tumorzellen könnte der Hinweis auf einen weiteren immunsuppressiven Mechanismus beim kolorektalen Karzinom sein.

Die Ergebnisse von Song et al. weisen auf eine Sezernierung des löslichen Fas-L in Kolon-Karzinomen in vitro hin [110]. Abrahams et al. gelang der Nachweis einer Sezernierung von Fas-L durch Tumorzellen in Ovarial-Karzinomen in vivo und in vitro, wobei die beschriebene Form des sezernierten Fas-L von der löslichen Form sFas-L zu unterscheiden ist [111].

Im Zusammenhang mit unseren Untersuchungen sind die Forschungsergebnisse von Whiteside et al. interessant. Die Gruppe untersuchte die Expression der membrangebundenen Form des Fas-L bei Patienten mit Ovarialkarzinomen. Diese war deutlich erhöht bei den

Tumorpatienten im Gegensatz zu Kontrollseren gesunder Patienten und steht im Zusammenhang mit der Suppression von T-Lymphozyten und einem Verlust der CD3-zeta-Expression bei Patienten mit Ovarialkarzinomen. Als Ursache für die verminderte Expression immunkompetenter Zellen sehen sie die Fas-induzierte Apoptose bei Tumorpatienten und postulieren die Möglichkeit einer neuen Aussage zur Prognose der Patienten und die Bedeutung für die Wahl der Therapie in diesem Zusammenhang [24, 41, 42]. Diese Hypothese könnte an Hand unserer Ergebnisse ebenfalls zutreffen; jedoch können wir den Zusammenhang zwischen einer Suppression von T-Lymphozyten und deren Funktionsverlust durch Fas-induzierte Apoptose nicht beweisen.

5.2 Vergleich zwischen kolorektalem Karzinom und Pankreaskarzinom

Ausgehend von der deutlich unterschiedlichen Prognose von Pankreas- und Kolonkarzinom-Patienten und vor dem Hintergrund publizierter Daten, die jedoch keinen direkten Vergleich der Ergebnisse erlauben, sollte in diesem Projekt das immunzelluläre Infiltrat beider gastrointestinaler Tumore miteinander verglichen werden. Im Rahmen einer klinischen Peptidvakzinestudie, die parallel zu unseren Untersuchungen am Klinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel durchgeführt wurde, wurde mit einem synthetischen Muc-1 Polypeptid und dem Adjuvans SB-AS2 das immunzelluläre Infiltrat in Resektionspräparaten von Patienten mit einem Pankreaskarzinom untersucht. Die Zielparameter waren größtenteils mit denen unserer Arbeit identisch und wurden mit vergleichbaren Methoden und nach ähnlichem Protokoll durchgeführt. Aufgrund dieser Bedingungen waren die Untersuchungsergebnisse für einen Vergleich geeignet [25].

In den folgenden Kapiteln wird auf die wichtigsten Ergebnisse des Vergleiches eingegangen.

5.2.1 Das T-Zell-Infiltrat

In den untersuchten Pankreaskarzinomen bestand das immunzelluläre Infiltrat ebenso wie bei unseren Kolonkarzinom-Präparaten zum überwiegenden Teil aus T-Lymphozyten. In beiden Tumoren war die Zahl der tumorstroma-infiltrierenden T-Lymphozyten signifikant höher als die Zahl in den Tumorzellnestern. Dieses Phänomen des Immunzelltrappings war bei beiden gastrointestinalen Tumoren zu erkennen und wurde bei Pankreaskarzinomen von von Bernstorff et al. [17] und bei Kolonkarzinomen auch von Takemoto et al. [112] als ein entscheidender Einfluss auf die Prognose der Patienten interpretiert.

Sowohl in den Pankreaskarzinomen als auch in den Kolonkarzinomen war ein großer Anteil der infiltrierenden T-Lymphozyten funktionell inaktiv, wie dies auch für das Erstere von Finn et al. [113] und für das Kolonkarzinom von Mulder et al. [39] beschrieben wurde.

Der Anteil funktionell aktiver zytotoxischer T-Lymphozyten war bei den untersuchten Patienten mit Papillenkarzinomen doppelt so hoch wie der in duktalem Pankreaskarzinomen, was Bayer als eine Erklärung für die bessere Prognose von Patienten mit Karzinomen der Papilla von Vateri interpretierten. Auch unsere Arbeit lieferte das Ergebnis, dass ein Überlebensvorteil mit einem hohen Anteil CD3 ζ + Lymphozyten einherging, dagegen eine kürzere Überlebensrate von Patienten mit einem reduziertem Infiltrat an aktivierten T-Lymphozyten korrelierte. Dazu passte auch die signifikant niedrigere Anzahl CD3 ζ + Zellen in den Lebermetastasen und den Kolon-Karzinomen mit vorhandenen Lymph-

knotenmetastasen, die eine schlechtere Prognose darstellten. In diesem Zusammenhang ist die Arbeit von Koch et al. zu nennen, welche die tumorabhängige Aktivität von CD8+ und CD4+ TILs in kolorektalen Tumoren untersuchten [114].

5.2.2 Das Infiltrat Natürlicher Killerzellen

Die klinische Bedeutung der Tumordinfiltration durch NK-Zellen ist noch nicht ausreichend geklärt, so lassen sich in der Literatur unterschiedliche Angaben und zum Teil kontroverse Ergebnisse finden.

Auch bei uns wichen die Ergebnisse von Pankreas- und Kolonkarzinomen voneinander ab. In unseren Beobachtungen korrelierte ein Anstieg der NK-Zellen mit steigender Malignität, schlechterer Überlebensrate und dem Vorhandensein von Fernmetastasen; dagegen war eine hohe Anzahl Natürlicher Killerzellen bei Pankreaskarzinomen verbunden mit einem niedrigeren Tumorstadium, fehlenden LK-Metastasen und auch tendenziell mit einer besseren Prognose. Die Zytotoxizität dieser Zellen scheint eine wichtige Rolle in der Abwehr von diesen Karzinomen zu spielen.

5.2.3 *Das Infiltrat Neutrophiler Granulozyten*

Unsere Beobachtung eines geschlechtsspezifischen Unterschiedes in der Höhe des Infiltrates Neutrophiler Granulozyten deckt sich mit den Ergebnissen beim Pankreaskarzinom. Hier korrelierte ein hoher Anteil Neutrophiler Granulozyten bei weiblichen Patienten mit Pankreaskarzinom sogar mit einem Überlebensvorteil. Vergleicht man in unserer Arbeit die Neutrophilenzahl in den Geschlechtern, so fällt ein statistisch signifikanter Unterschied bei den Patienten mit Lebermetastasen auf, wobei das Infiltrat im Tumorstroma von weiblichen Patienten um ein fünffaches höher ist als bei männlichen Patienten. Ähnliche Ergebnisse gehen auch aus der Arbeit von Caruso et al. hervor [47]. Einen Zusammenhang mit einem eventuellen Überlebensvorteil weiblicher Patienten konnten wir nicht nachweisen, die Anzahl der vorliegenden Überlebensdaten von den Patienten mit Lebermetastasen war zu gering.

5.2.4 *Das Infiltrat dendritischer Zellen*

DC waren in den untersuchten Pankreaskarzinomen wie auch in den Kolonkarzinomen kaum vorhanden, womit unsere Vermutung, dass ein geringes Infiltrat an DC eine eingeschränkte zelluläre Immunantwort gegenüber malignen Zellen bedeuten könnte, bestätigt wird.

5.2.5 *Das Makrophageninfiltrat*

Hinsichtlich des Makrophageninfiltrates und der Interpretation der Ergebnisse unterschied sich die Aussage unserer Arbeit von derjenigen von Bayer [25], der ein starkes Makrophageninfiltrat bei fortgeschrittenem Tumorstadium fand.

Sowohl in den untersuchten Pankreas- als auch in den Kolonkarzinomen war die Infiltration von Makrophagen insgesamt sehr hoch und vor allem außerhalb der Tumorzellbereiche vorhanden.

In unserer Arbeit korrelierte eine hohe Anzahl von Makrophagen mit einem selteneren Auftreten von Lebermetastasen, was wir auf deren zytotoxische Wirkung zurückführten.

Wie aus der Arbeit von Bayer hervorgeht, stieg der relative Anteil der Makrophagen am Infiltrat in den duktalem Pankreaskarzinomen mit zunehmendem T- oder N-Stadium und ebenso bei Vorliegen einer Gefäßinvasion. In Anlehnung an Berichte von Mantovani et al. und Leek et al. [77, 79] wurde gefolgert, dass eine Förderung der Neoangiogenese von Tumoren und damit die Ernährung der Tumorzellen eine mögliche Erklärung dafür sein könnte.

Hier ließ sich also ein deutlicher Unterschied in der Immunbiologie beider gastrointestinaler Tumoren erkennen.

5.2.6 *Die Expression von MHC-I*

Unsere Untersuchungen ergaben, ebenso wie die Untersuchungen am Pankreaskarzinom eine gering ausgeprägte Herabregulation, in wenigen Fällen sogar ein Verlust der MHC-Klasse-I-Moleküle. Die Expression dieser Moleküle auf der Oberfläche der meisten Tumorzellen war teils homogen, teils heterogen eher stark. Die MHC-I-Expression korrelierte dabei nicht mit der Überlebenszeit der Patienten. Dies könnte bedeuten, dass dieser Escapemechanismus für das Kolorektale Karzinom, wie auch für das Pankreaskarzinom nur eine geringe Rolle spielt. Damit entsprachen diese Ergebnisse den Untersuchungen von Scupoli et al, die in nahezu allen untersuchten Adenokarzinomen des Pankreas eine MHC-I-Expression feststellen konnten [96].

5.2.7 *Die Expression des Fas-Liganden*

Die Untersuchungen von Bayer ergab eine heterogene Expression des sFas-L auf dem überwiegenden Anteil der Tumorzellen in duktalem Pankreaskarzinomen, wie es auch in unseren Präparaten von Kolorektalen Karzinomen der Fall war. Sie folgerten daraus, dass die Tumorzellen in der Lage sein könnten, attackierende Immunzellen zu lysieren, wobei sie auf einen Bericht von O'Connell [100] hinwiesen. Ein interessanter Unterschied fiel jedoch in den Papillenkarzinomen auf. Von nur 10-50% der Tumorzellen wurde sFas-L exprimiert. Bayer ging daher davon aus, dass ein „Counterattack“ der malignen Zellen durch diesen Mechanismus eine weniger bedeutende Rolle zu spielen schien. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die bessere Prognose von Papillenkarzinomen im Gegensatz zu duktalem Pankreasadenokarzinomen sein. Da in unseren Präparaten der Lebermetastasen eine höhere sFas-L-Expression zu finden war als in den fernmetastasenfreien Kolonkarzinomen, könnte auch hier die Überlegung zutreffen, dass ein „Counterattack“ in den Lebermetastasen für die schlechtere Prognose gegenüber der deutlich besseren Überlebensrate bei Kolonkarzinomen des Stadiums M0 verantwortlich sein könnte.

5.2.8 *Zusammenfassung*

Die Ergebnisse unserer Arbeit bestätigen, daß das Immunsystem der Patienten bezüglich der Abwehr des Tumors eingeschränkt war, ebenso wie dies die Untersuchungen am Pankreaskarzinom ergaben. Beide Tumoren scheinen Mechanismen zu benutzen, mit denen sie sich einer erfolgreichen Immunabwehr entziehen können. Tumorescapemechanismen scheinen in beiden Tumorarten eine bedeutende Rolle für die eingeschränkte Immunantwort von Tumorpatienten zu spielen. Dennoch war auch die deutlich unterschiedliche

Immunbiologie beider gastrointestinaler Tumoren, insbesondere hinsichtlich des Infiltrates an Makrophagen, der Expression Natürlicher Killerzellen und der Expression des löslichen Fas-Liganden zu erkennen.

6 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom ist der zweithäufigste bösartige Tumor in Deutschland und die zweithäufigste Todesursache maligner Erkrankungen. Die Kenntnis des immunzellulären Infiltrates sowie immunsuppressiver Moleküle und damit verbundener neuer Prognosemarker spielen für die Entwicklung immuntherapeutischer Ansätze sowie als zusätzliche Entscheidungshilfen für eine stadiengerechte Behandlung eine wesentliche Rolle.

Ziel dieser Promotionsarbeit war die Charakterisierung des Immunzellinfiltrates hinsichtlich der Suppression immunkompetenter Zellen und die biologische Auswirkung dieser Suppression in Abhängigkeit von klinisch-pathologischen Parametern beim kolorektalen Karzinom mit und ohne Lymphknotenmetastasen und in Lebermetastasen von Patienten mit primärem kolorektalem Karzinom. In der vorliegenden Arbeit wurden 47 Resektionspräparate von Patienten mit kolorektalem Karzinom (N0 und N2 Tumoren, 24 Frauen, 23 Männer, Alter 48 bis 86 Jahre, Durchschnittsalter 66,2 Jahre) sowie 21 Resektionspräparate von Patienten mit Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms (8 Frauen, 13 Männer, Alter 45 bis 79 Jahre, Durchschnittsalter 64 Jahre) histologisch untersucht. Dazu wurden die T-Zellen auf die Marker CD4, CD8, CD3- ϵ und CD3- ξ untersucht, weiterhin wurden B-Lymphozyten, Natürliche Killerzellen, Neutrophile Granulozyten, Dendritische Zellen und Makrophagen mit immunhistochemischen Methoden markiert. Zusätzlich wurde die Expression der löslichen Form des Fas-Liganden und der MHC-I-Moleküle im Hinblick auf mögliche Tumorescapemechanismen untersucht. Einen weiteren Aspekt dieser Promotionsarbeit stellte der Vergleich unserer Ergebnisse mit denjenigen des Pankreaskarzinoms dar, die von einer weiteren Arbeitsgruppe in unserem Labor parallel gewonnen wurden.

Die Ergebnisse unserer Arbeit bestätigen, daß das Immunsystem der Patienten bezüglich der Abwehr des Tumors eingeschränkt ist:

Das immunzelluläre Infiltrat der N0-Tumoren unterschied sich nicht signifikant von N2-Tumoren; am häufigsten fanden sich CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten, gefolgt von Neutrophilen Granulozyten und deutlich weniger NK-Zellen. Makrophagen und B-Lymphozyten waren selten, Dendritische Zellen nur ausnahmsweise vorhanden. Insgesamt waren die Immunzellen bevorzugt im Tumorstroma und weniger in den Tumorzellbereichen lokalisiert. Dendritische Zellen konnten vereinzelt im Tumorstroma und kaum in unmittelbarer Nähe von Tumorzellen nachgewiesen werden. Eine Infiltration von Makrophagen in die Tumorzellbereiche fehlte fast vollständig, war im umgebenden

Tumorstroma aber sehr viel stärker ausgeprägt. Dieses „Gefangen-sein“ der Immunzellen im Tumorstroma wird als „Trapping“ bezeichnet. Auch Lymphozyten, NK-Zellen und Neutrophile Granulozyten zeigten das Phänomen des „Immunzelltrappings“.

Ähnliche Ergebnisse lieferten die Untersuchungen am Pankreaskarzinom.

Die schlechtere Abwehrlage von Kolonkarzinompatienten mit Fernmetastasen spiegelte sich im immunzellulären Infiltrat wieder: In den Lebermetastasen zeigte sich ein signifikant niedrigeres Infiltrat an T-Zellen, NK-Zellen, Neutrophilen Granulozyten und Makrophagen im Vergleich zu den fernmetastasenfreien Kolonkarzinomen. Allerdings fanden sich B-Lymphozyten als Zellen der Th2-Antwort ebenso signifikant häufiger wie HLA-unabhängige NK-Zellen, die knapp ein Drittel der Zellpopulation stellten. Professionelle Zellen der Antigenpräsentation fehlten fast vollständig.

Die Anzahl an Makrophagen in den fernmetastasenfreien Kolonkarzinomen war im Vergleich zu den Lebermetastasen besonders hoch. In den duktalem Pankreaskarzinomen stieg dagegen der relative Anteil der Makrophagen am Gesamtinfiltrat mit zunehmendem Tumorstadium an. Interessante Ergebnisse lieferte der Vergleich des Neutrophileninfiltrates zwischen den Geschlechtern: Es fällt ein statistisch signifikantes fünffach höheres Neutrophilen-Infiltrat im Tumorstroma der Lebermetastasen weiblicher Patienten auf, verglichen mit dem männlicher Patienten. Ein sexueller Dimorphismus ist bei verschiedenen Krankheitsbildern bereits bekannt, für Tumorerkrankungen ist dieses Gebiet jedoch noch sehr unzureichend untersucht, könnte jedoch interessante Aufschlüsse hinsichtlich der Tumorimmunität liefern.

Es ist bekannt, dass durch so genannte Tumorescapemechanismen der Tumor in der Lage ist, sich einer erfolgreichen Immunantwort zu entziehen. Interessant war in diesem Zusammenhang ein genereller signifikanter Verlust aktivierter T-Lymphozyten (gemessen an der Expression der ξ -Kette des T-Zellrezeptors) in den Kolonkarzinomen. Ebenso war ein signifikant geringeres Infiltrat aktivierter T-Lymphozyten in den Lebermetastasen und den Kolonkarzinomen mit Lymphknotenmetastasen, verglichen mit den metastasenfrem Tumoren, festzustellen. Einen signifikanten Überlebensvorteil zeigten Patienten mit einem hohen Anteil aktivierter T-Lymphozyten, Patienten mit niedrigem Infiltrat zeigten eine signifikant kürzere Überlebenszeit. Damit konnte der Verlust der CD3 ξ -Kette als neuer negativer Prognosemarker für das Kolonkarzinom herausgearbeitet werden.

Bei den Patienten mit Papillenkarzinomen war der Anteil funktionell aktiver zytotoxischer T-Lymphozyten doppelt so hoch wie der in den prognostisch schlechteren duktalem Pankreaskarzinomen. Diese Ergebnisse bieten Erfolg versprechende Ansatzpunkte für

immuntherapeutische Konzepte, die vor allem auf eine Wiederherstellung der T-Zellfunktion gerichtet sein müssen.

Von der Mehrheit der Kolonkarzinome wurde die selten untersuchte Form des löslichen Fas-Liganden exprimiert. Die Expression in den Tumorzellbereichen der Lebermetastasen war signifikant stärker als in metastasenfremen Kolonkarzinomen. Dies könnte eine vermehrte Induktion von Fas-induzierter Apoptose immunkompetenter Zellen in den Lebermetastasen und damit eine vermehrte lokale Immunsuppression bedeuten. In einigen Präparaten konnte der Eindruck einer Sezernierung des sFas-Liganden durch die Tumorzellen gewonnen werden, was einen weiteren immunsuppressiven Mechanismus des Tumors darstellen könnte. Die Untersuchungen der duktafen Pankreaskarzinome zeigten ebenfalls eine Expression des sFas-Liganden auf dem überwiegenden Anteil der Tumorzellen. Jedoch exprimierten nur 10-50% der Tumorzellen in Papillenkarzinomen sFas-Ligand. Dies könnte eine Erklärung für die bessere Prognose von Papillenkarzinomen gegenüber duktafen Pankreaskarzinomen sein.

In der Literatur wird die Herabregulierung der MHC-I-Moleküle als ein weiterer Tumorescapemechanismus beschrieben. In den von uns untersuchten Präparaten war dieser Mechanismus gering ausgeprägt, in wenigen Fällen war ein Verlust der MHC-I-Moleküle zu erkennen. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen kolorektalen Karzinomen ohne Fernmetastasen und den untersuchten Lebermetastasen, ebenso korrelierte die MHC-I-Expression nicht mit der Überlebenszeit der Patienten. Vermutlich spielt dieser Escapemechanismus für das kolorektale Karzinom nur eine geringe Rolle.

Generell zeigen die Ergebnisse unserer Arbeit, sowie die Ergebnisse der untersuchten Pankreaskarzinome die enge Verknüpfung zwischen Immunitätslage des Patienten und der Tumorausprägung sowie dem Überleben: Die lokale Immunsuppression durch maligne Zellen ist signifikant mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Dies bietet Erfolg versprechende Ansatzpunkte für immuntherapeutische Konzepte, die vor allem auf eine Wiederherstellung der T-Zellfunktion und Aktivierung der Antigenpräsentation gerichtet sein müssen.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Baili P, Micheli A, De Angelis R, Weir HK, Francisci S, Santaquilani M, Hakulinen T, Quaresmas M, Coleman MP; CONCORD Working Group. Life tables for worldwide comparison of relative survival for cancer (CONCORD study). *Tumori*. 2008 Sep-Oct;94(5):658-68.
- [2] Bertz J, Giersiepen K, Haberland J, Hentschel S, Kaatsch P, Katalinic A, Stabenow R, Stegmaier C, Ziegler H: Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI. Saarbrücken, 2006.
- [3] Jehle E L, Bokemeyer C, Brand E, Budach W, Buntrock M, Burkart C, Eisold H, Greschmiok A, Grund KE, Günther E, Hartmann JT, Keller-Matschke K, Klump B, Nehls O, Ohmenhäuser A, Schäfer J, Steinebrunner P, Vetter S: Schriftenreihe „Therapieempfehlungen“ des ITZ Tübingen, ISSN 1438-8979, 2. überarbeitete Auflage 2003, Gulde-Druck GmbH, Tübingen.
- [4] Herold G und Mitarbeiter: Innere Medizin. Auflage 2004, Seite 413-417.
- [5] UICC (InternationalUnionAgainstCancer). TNM Classification of malignant tumours, 6th ed. eds: Sobin LH, Wittekind CH. Wiley-Liss, Inc., New York, 2002.
- [6] Dukes. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol* 1932;35:323.
- [7] Brenner H, Stegmaier C, Ziegler H. Verbesserte Langzeitüberlebensraten von Krebspatienten - Die unterschätzten Fortschritte der Onkologie. *Dt. Ärzteblatt* 2005; 102: A2628-2633.
- [8] Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Saarbrücken, 2006

- [9] Hauser H, Kornprat P, Mischinger HJ, Thalhammer M, Werkgartner G: Das kolorektale Karzinom. Teil II: Diagnose und chirurgische Therapie. *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen*. 2005; 3 (2), 36-40.
- [10] Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004 Aug;21(2):137-48.
- [11] Watson NF, Ramage JM, Madjd Z, Spendlove I, Ellis IO, Scholefield JH, Durrant LG: Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis. *Int J Cancer*. 2006 Jan 1;118(1):6-10.
- [12] Zia A, Schildberg FW, Funke I: MHC class I negative phenotype of disseminated tumor cells in bone marrow is associated with poor survival in ROM0 breast cancer patients. *I J Cancer*. 2001 Aug 15;93(4):566-70.
- [13] von Bernstorff W, Spanjaard RA, Chan AK, Lockhart DC, Sadanaga N, Wood I, Peiper M, Goedegebuure PS, Eberlein TJ: Pancreatic cancer cells can evade immune surveillance via nonfunctional Fas (APO-1/CD95) receptors and aberrant expression of functional Fas ligand. *Surgery*, 1999. 125(1): 73-84.
- [14] Bennett MW, O'connell J, O'sullivan GC, Roche D, Brady C, Kelly J, Collins JK, Shanahan F: Expression of Fas ligand by human gastric adenocarcinomas: a potential mechanism of immune escape in stomach cancer. *Gut*. 2000 May;46(5):738-40.
- [15] Igney FH, Behrens CK, Krammer PH: CD95L mediates tumor counterattack in vitro but induces neutrophil-independent tumor rejection in vivo. *Int J Cancer*. 2005 Jan 1;113(1):78-87.
- [16] Tong Q, Liu K, Wang G: FasL expression in colorectal carcinoma and its significance in immune escape of cancer. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2006;26(1):79-81.

-
- [17] von Bernstorff W, Voss M, Freichel S, Schmid A, Vogel I, Johnk C, Henne-Bruns D, Kremer B, Kalthoff H: Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2001 Mar;7:925s-932.
- [18] Pagès F, Galon J, Fridman WH. The essential role of the in situ immune reaction in human colorectal cancer. *J Leukoc Biol.* 2008 Oct;84(4):981-7.
- [19] Galon J, Fridman WH, Pagès F. The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: a novel perspective. *Cancer Res.* 2007 Mar 1;67(5):1883-6.
- [20] Gemsa D, Kalden JR, Resch K: *Immunologie*, 4. überarbeitete und erweiterte Auflage 1997, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- [21] Abbas AK, Lichtmann AH, Andrew H: *Cellular and Molecular Immunology* 2003. 5Rev ed 560 pp. Elsevier Health Sciences.
- [22] Schettini J, Mukherjee P.: Physiological role of plasmacytoid dendritic cells and their potential use in cancer immunity. *Clin Dev Immunol.* 2008.
- [23] Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, Squarcina P, Accornero P, Lozupone F, Lugini L, Stringaro A, Molinari A, Arancia G, Gentile M, Parmiani G, Fais S.: Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med.* 2002 May 20;195(10):1303-16.
- [24] Kim JW, Wieckowski E, Taylor DD, Reichert TE, Watkins S, Whiteside TL. Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin Cancer Res.* 2005 Feb 1;11(3):1010-20.
- [25] Bayer A :*Medizinische Dissertationsschrift* 2006, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel.

- [26] Weiß Ch: Basiswissen Medizinische Statistik, 3. Auflage 2005, Springer-Verlag Heidelberg.
- [27] Shunyakov L, Ryan CK, Sahasrabudhe DM, Khorana AA: The influence of host response on colorectal cancer prognosis. *Clin Colorectal Cancer*. 2004 May;4(1):38-45.
- [28] Stremmel Ch, Immuntoleranz und aktive Immunsuppression in der Onkologie; Immunologische Grundlagen und therapeutische Optionen. Homepage Uni-Erlangen, Chirurgie.
- [29] Viale M, Ferrini S, Serrano S, Serrano D, Ardizzoni A, Nicollin A: Peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in non-small cell lung cancer: Analysis at the population and clonal level. *Tumori*, 1990 76: 488 – 494.
- [30] Ortegál JW, Staren ED, Faber LP, Warren WH, Braun DP: Cytokine biosynthesis by tumor-infiltrating T lymphocytes from human non-small-cell lung carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2000 Feb;48(11):627-34
- [31] Eerola AK, Soini Y, Paakko P.: A high number of tumor-infiltrating lymphocytes are associated with small tumor size, low tumor stage and a favorable prognosis in operated small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2000; 6 1875 – 1881.
- [32] Balch CM, Riley LB, Bae YJ, Salmeron MA, Platsoucas CD, von Eschenbach A, Itoh K: Patterns of human tumor-infiltrating lymphocytes in 120 human cancers. *Arch Surg*. 1990 Feb;125(2):200-5.
- [33] Horny HP, Horst HA.: Lymphoreticular infiltrates in adenocarcinoma of the large intestine. *Pathol Res Pract*. 1987 Apr;182(2):222-7.

- [34] Chiba T, Ohtani H, Mizoi T, Naito Y, Sato E, Nagusa H, Ohuchi K, Ohuchi A, Shiiba K, Kurokawa Y, Satomi S: 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*. 2004 Nov 1;91(9):1711-7.
- [35] Oshikiri T, Miyamoto M, Shichinohe T, Suzuoki M, Hiraoka K, Nakakubo Y, Shinohara T, Itoh T, Kondo S, Katoh H: Prognostic value of intratumoral CD8+ T lymphocyte in extrahepatic bile duct carcinoma as essential immune response. *J Surg Oncol*. 2003 Dec;84(4):224-8.
- [36] Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, Ohtani H: CD8 T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998 Aug 15;58(16):3491-4.
- [37] Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F.: Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006 Sep 29;313(5795):1960-4.
- [38] von Bernstorff W, Mortazawi S, Röder C, Sipos B, Kalthoff H.: Der Verlust von CD3-zeta in Tumor-infiltrierenden T-Zellen ist ein negativer Prognosemarker für das Kolonkarinom. *Chirurgisches Forum* 2008; 37:5-7.
- [39] Mulder WM, Bloemena E, Stukart MJ, Kummer JA, Wagstaff J, Scheper RJ: T cell receptor-zeta and granzyme B expression in mononuclear cell infiltrates in normal colon mucosa and colon carcinoma. *Gut*. 1997 Jan;40(1):113-9.
- [40] Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Higashi H, Iwashige H, Aridome K, Hokita S, Aikou T: CD3-zetachain expression of intratumoral lymphocytes is closely related to survival in gastric carcinoma patients. *Cancer*. 2002 Mar 1;94(5):1437-42.

- [41] Taylor DD, Gerçel-Taylor C, Lyons KS, Stanson J, Whiteside TL. T-cell apoptosis and suppression of T-cell receptor/CD3-zeta by Fas ligand-containing membrane vesicles shed from ovarian tumors. *Clin Cancer Res*. 2003 Nov 1;9(14):5113-9.
- [42] Whiteside TL. Down-regulation of zeta-chain expression in T cells: a biomarker of prognosis in cancer? *Cancer Immunol Immunother*. 2004 Oct;53(10):865-78.
- [43] Hirota J, Ueta E, Osaki T, Ogawa Y: Immunohistologic study of mononuclear cell infiltrates in oral squamous cell carcinomas. *Head Neck*. 1990 Mar-Apr;12(2):118-25.
- [44] Horny HP, Horst HA: Lymphoreticular infiltrates in invasive ductal breast cancer. A histological and immunohistological study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1986;409(2):275-86.
- [45] Li Y, Zhang Q, Wang T: The relationship between the phenotype of tumor infiltrating cells and the prognosis in laryngeal cancer. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*. 1995;30(4):209-12.
- [46] Bohme M, Lottge M, Schmidt D, Rose I, Weise W, Morenz J: Lymphohistiocytic infiltration of endometrial adenocarcinoma. *Zentralbl Gynakol*. 1995;117(5):247-52.
- [47] Caruso RA, Bellocco R, Pagano M, Bertoli G, Rigoli L, Inferrera C: Prognostic value of intratumoral neutrophils in advanced gastric carcinoma in a high-risk area in northern Italy. *Mod Pathol*. 2002 Aug;15(8):831-7.
- [48] Menon AG, Janssen-van Rhijn CM, Morreau H, Putter H, Tollenaar RA, van de Velde CJ, Fleuren GJ, Kuppen PJ: Immune system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis. *Lab Invest*. 2004 Apr;84(4):493-501.

- [49] Hagens M, Zwaveling S, Kuppen PJ, Ensink NG, Eggermont AM, Hokland ME, Basse PH, van de Velde CJ, Fleuren GJ, Nannmark U: Characteristics of tumor infiltration by adoptively transferred and endogenous natural-killer cells in a syngeneic rat model: implications for the mechanism behind anti-tumor responses. *Int J Cancer*. 1998 Dec 9;78(6):783-9.
- [50] Sandel MH, Speetjens FM, Menon AG, Albertsson PA, Basse PH, Hokland M, Nagelkerke JF, Tollenaar RA, van de Velde CJ, Kuppen PJ: Natural killer cells infiltrating colorectal cancer and MHC class I expression. *Mol Immunol*. 2005 Feb;42(4):541-6.
- [51] Koch B, Giedl J, Hermanek P, Kalden JR: The analysis of mononuclear cell infiltrations in colorectal adenocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1985;109(2):142-51.
- [52] Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, Aridome K, Hokita S, Aikou T: Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer*. 2000 Feb 1;88(3):577-83.
- [53] Norris S, Doherty DG, Curry M, McEntee G, Traynor O, Hegarty JE, O'Farrelly C: Selective reduction of natural killer cells and T cells expressing inhibitory receptors for MHC class I in the livers of patients with hepatic malignancy. *Cancer Immunol Immunother*. 2003 Jan;52(1):53-8.
- [54] Freudenberg N, Rahner P, Darda C, Kiss A, Veres G, Nees T, Lamers R, Riede UN, Kortsik C, Schubert M, Frenzer-Welle K: Early detection of metastasis by alterations in the cellular immune system in the murine liver and blood. *Virchows Arch*. 1996 Jun;428(3):187-94.
- [55] Hsia JY, Chen JT, Chen CY, Hsu CP, Miaw J, Huang YS, Yang CY: Prognostic significance of intratumoral natural killer cells in primary resected esophageal squamous cell carcinoma. *Chang Gung Med J*. 2005 May;28(5):335-40.

- [56] Cao FM, Zhang XH, Yan X, Wang JL, Wang XL, Zhang ZG, Shen HT, Wang FR: Prognostic significances of natural killer cells and dendritic cells infiltrations in esophageal squamous cell carcinoma. *Ai Zheng*. 2005 Feb;24(2):232-6.
- [57] Takanami I, Takeuchi K, Giga M: The prognostic value of natural killer cell infiltration in resected pulmonary adenocarcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001 Jun;121(6):1058-63.
- [58] Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, Martos JA, Moreno M: The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*. 1997 Jun 15;79(12):2320-8.
- [59] Nakakubo Y, Miyamoto M, Cho Y, Hida Y, Oshikiri T, Suzuoki M, Hiraoka K, Itoh T, Kondo S, Katoh H: Clinical significance of immune cell infiltration within gallbladder cancer. *Br J Cancer*. 2003 Nov 3;89(9):1736-42.
- [60] Jakobisiak M, Lasek W, Golab J: Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunol Lett*. 2003 Dec 15;90(2-3):103-22.
- [61] Noffz G, Qin Z, Kopf M, Blankenstein T: Neutrophils but not eosinophils are involved in growth suppression of IL-4-secreting tumors. *J Immunol*. 1998 Jan 1;160(1):345-50.
- [62] Werdan K, Schuster HP und Müller-Werdan U: Sepsis und MODS, 4. vollständig überarbeitete und aktualisierte Auflage 2005.
- [63] Dadabayev AR, Sandel MH, Menon AG, Morreau H, Melief CJ, Offringa R, van der Burg SH, Janssen-van Rhijn C, Ensink NG, Tollenaar RA, van de Velde CJ, Kuppen PJ: Dendritic cells in colorectal cancer correlate with other tumor-infiltrating immune cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2004 Nov;53(11):978-86.
- [64] Ambe K, Mori M, Enjoji M: S-100 protein-positive dendritic cells in colorectal adenocarcinomas. Distribution and relation to the clinical prognosis. *Cancer*. 1989 Feb 1;63(3):496-503.

- [65] Reichert TE, Scheuer C, Day R, Wagner W, Whiteside TL: The number of intratumoral dendritic cells and zeta-chain expression in T cells as prognostic and survival biomarkers in patients with oral carcinoma. *Cancer*. 2001 Jun 1;91(11):2136-47.
- [66] Johnson SK, Kerr KM, Chapman AD, Kennedy MM, King G, Cockburn JS, Jeffrey RR: Immune cell infiltrates and prognosis in primary carcinoma of the lung. *Lung Cancer*. 2000 Jan;27(1):27-35.
- [67] Takahashi A, Kono K, Itakura J, Amemiya H, Feng Tang R, Iizuka H, Fujii H, Matsumoto Y: Correlation of vascular endothelial growth factor-C expression with tumor-infiltrating dendritic cells in gastric cancer. *Oncology*. 2002;62(2):121-7.
- [68] Dallal RM, Christakos P, Lee K, Egawa S, Son YI, Lotze MT: Paucity of dendritic cells in pancreatic cancer. *Surgery*. 2002 Feb;131(2):135-8.
- [69] Suzuki A, Masuda A, Nagata H, Kameoka S, Kikawada Y, Yamakawa M, Kasajima T: Mature dendritic cells make clusters with T cells in the invasive margin of colorectal carcinoma. *J Pathol*. 2002 Jan;196(1):37-43.
- [70] Sandel MH, Dadabayev AR, Menon AG, Morreau H, Melief CJ, Offringa R, van der Burg SH, Janssen-van Rhijn CM, Ensink NG, Tollenaar RA, van de Velde CJ, Kuppen PJ: Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells in colorectal cancer: role of maturation status and intratumoral localization. *Clin Cancer Res*. 2005 Apr 1;11(7):2576-82.
- [71] Miyagawa S, Soeda J, Takagi S, Miwa S, Ichikawa E, Noike T: Prognostic significance of mature dendritic cells and factors associated with their accumulation in metastatic liver tumors from colorectal cancer. *Hum Pathol*. 2004 Nov;35(11):1392-6.
- [72] Takagi S, Miyagawa S, Ichikawa E, Soeda J, Miwa S, Miyagawa Y, Iijima S, Noike T, Kobayashi A, Kawasaki S: Dendritic cells, T-cell infiltration, and Grp94 expression in cholangiocellular carcinoma. *Hum Pathol*. 2004 Jul;35(7):881-6.

- [73] Chen S, Akbar SM, Tanimoto K, Ninomiya T, Iuchi H, Michitaka K, Horiike N, Onji M: Absence of CD83-positive mature and activated dendritic cells at cancer nodules from patients with hepatocellular carcinoma: relevance to hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett.* 2000 Jan 1;148(1):49-57.
- [74] Schwaab T, Weiss JE, Schned AR, Barth Jr RK: Dendritic cell infiltration in colon cancer. *J Immunother.* 2001 Mar;24(2):130-137.
- [75] Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Xiangming C, Iwashige H, Aridome K, Hokita S, Aikou T: Clinical impact of intratumoral natural killer cell and dendritic cell infiltration in gastric cancer. *Cancer Lett.* 2000 Oct 16;159(1):103-8.
- [76] Nakayama Y, Inoue Y, Minagawa N, Katsuki T, Nagashima N, Onitsuka K, Tsurudome Y, Sako T, Hirata K, Nagata N, Itoh H: Relationships between S-100 protein-positive cells and clinicopathological factors in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2003 Nov-Dec;23(6a):4423-6.
- [77] Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL: Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res.* 1996 Oct 15;56(20):4625-9.
- [78] Ladanyi A: Function and prognostic significance of immune cells infiltrating human tumors. *Magy Onkol.* 2004;48(1):49-56.
- [79] Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L: The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today.* 1992 Jul;13(7):265-70.
- [80] Oosterling SJ, van der Bij GJ, Meijer GA, Tuk CW, van Garderen E, van Rooijen N, Meijer S, van der Sijp JR, Beelen RH, van Egmond M: Macrophages direct tumour histology and clinical outcome in a colon cancer model. *J Pathol.* 2005 Aug 16;207(2):147-155.

- [81] Ohno S, Ohno Y, Suzuki N, Kamei T, Koike K, Inagawa H, Kohchi C, Soma G, Inoue M: Correlation of histological localization of tumor-associated macrophages with clinicopathological features in endometrial cancer. *Anticancer Res.* 2004 Sep-Oct;24(5C):3335-42.
- [82] Ohno S, Inagawa H, Dhar DK, Fujii T, Ueda S, Tachibana M, Suzuki N, Inoue M, Soma G, Nagasue N: The degree of macrophage infiltration into the cancer cell nest is a significant predictor of survival in gastric cancer patients. *Anticancer Res.* 2003 Nov-Dec;23(6D):5015-22.
- [83] Funada Y, Noguchi T, Kikuchi R, Takeno S, Uchida Y, Gabbert HE: Prognostic significance of CD8+ T cell and macrophage peritumoral infiltration in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2003 Mar-Apr;10(2):309-13.
- [84] Tan SY, Fan Y, Luo HS, Shen ZX, Guo Y, Zhao LJ: Prognostic significance of cell infiltrations of immunosurveillance in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2005 Feb 28;11(8):1210-4.
- [85] Marcus B, Arenberg D, Lee J, Kleer C, Chepeha DB, Schmalbach CE, Islam M, Paul S, Pan Q, Hanash S, Kuick R, Merajver SD, Teknos TN: Prognostic factors in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2004 Dec 15;101(12):2779-87.
- [86] Madjd Z, Spendlove I, Pinder SE, Ellis IO, Durrant LG: Total loss of MHC class I is an independent indicator of good prognosis in breast cancer. *Int J Cancer.* 2005 Nov 1;117(2):248-55.
- [87] Soong TW, Hui KM: Regulation of the expression of major histocompatibility complex class I genes in human colorectal cancer. *Cancer Detect Prev.* 1991;15(3):231-9.

- [88] Chil A, Sikorski M, Bobek M, Jakiel G, Marcinkiewicz J: Alterations in the expression of selected MHC antigens in premalignant lesions and squamous carcinomas of the uterine cervix. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003 Dec;82(12):1146-52.
- [89] Andratschke M, Pauli C, Stein M, Chaubal S, Wollenberg B: MHC-class I antigen expression on micrometastases in bone marrow of patients with head and neck squamous cell cancer. *Anticancer Res.* 2003 Mar-Apr;23(2B):1467-71.
- [90] Korkolopoulou P, Kaklamanis L, Pezzella F, Harris AL, Gatter KC: Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. *Br J Cancer.* 1996 Jan;73(2):148-53.
- [91] Algarra I, Garcia-Lora A, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F: The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol Immunother.* 2004 Oct;53(10):904-10.
- [92] Menon AG, Morreau H, Tollenaar RA, Alphenaar E, Van Puijenbroek M, Putter H, Janssen-Van Rhijn CM, Van De Velde CJ, Fleuren GJ, Kuppen PJ: Down-regulation of HLA-A expression correlates with a better prognosis in colorectal cancer patients. *Lab Invest.* 2002 Dec;82(12):1725-33.
- [93] Goepel JR, Rees RC, Rogers K, Stoddard CJ, Thomas WE, Shepherd L: Loss of monomorphic and polymorphic HLA antigens in metastatic breast and colon carcinoma. *Br J Cancer.* 1991 Nov;64(5):880-3.
- [94] Menon AG, Tollenaar RA, van de Velde CJ, Putter H, Janssen-van Rhijn CM, Keijzer R, Fleuren GJ, Kuppen PJ: p53 and HLA class-I expression are not down-regulated in colorectal cancer liver metastases. *Clin Exp Metastasis.* 2004;21(1):79-85.

-
- [95] Nijman HW, van Diest PJ, Poort-Keesom RJ, von Mensdorff-Pouilly S, Verstraeten RA, Kummer A, Meijer CJ, Melief CJ, Hilgers J, Kenemans P: T cell infiltration and MHC I and II expression in the presence of tumor antigens: An immunohistochemical study in patients with serous epithelial ovarian cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001 Jan;94(1):114-20.
- [96] Scupoli MT, Sartoris S, Tosi G, Ennas MG, Nicolis M, Cestari T, Zamboni G, Martignoni G, Lemoine NR, Scarpa A, Accolla RS: Expression of MHC class I and class II antigens in pancreatic adenocarcinomas. *Tissue Antigens.* 1996 Oct;48(4 Pt 1):301-11.
- [97] Mann B, Gratchev A, Bohm C, Hanski ML, Foss HD, Demel G, Trojanek B, Schmidt-Wolf I, Stein H, Riecken EO, Buhr HJ, Hanski C: FasL is more frequently expressed in liver metastases of colorectal cancer than in matched primary carcinomas. *Br J Cancer.* 1999 Mar;79(7-8):1262-9.
- [98] O'Connell J, Bennett MW, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F: Resistance to Fas (APO-1/CD95)-mediated apoptosis and expression of Fas ligand in esophageal cancer: the Fas counterattack. *Dis Esophagus.* 1999;12(2):83-9.
- [99] O'Connell J, Bennett MW, O'Sullivan GC, Roche D, Kelly J, Collins JK, Shanahan F: 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.* 1998 Nov;186(3):240-6.
- [100] O'Connell, J., et al., The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med*, 1996. 184(3): p. 1075-82.
- [101] Ryan AE, Shanahan F, O'Connell J, Houston AM. Addressing the "Fas counterattack" controversy: blocking fas ligand expression suppresses tumor immune evasion of colon cancer in vivo. *Cancer Res.* 2005 Nov 1;65(21):9817-23.

- [102] Shukuwa T, Katayama I, Koji T: Fas-mediated apoptosis of melanoma cells and infiltrating lymphocytes in human malignant melanomas. *Mod Pathol.* 2002 Apr;15(4):387-96.
- [103] Koomagi R, Volm M: Expression of Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand in lung cancer, its prognostic and predictive relevance. *Int J Cancer.* 1999 Jun 21;84(3):239-43.
- [104] Ben-Hur H, Mordechay E, Halperin R, Gurevich P, Zandbank J, Herper M, Zusman I: Apoptosis-related proteins (Fas, Fas ligand, bcl-2 and p53) in different types of human breast tumors. *Oncol Rep.* 2002 Sep-Oct;9(5):977-80.
- [105] Zheng J, Sun X, Chen J, Jiang F, Li W, Xie S: Mechanism of immune escape in renal cell carcinoma. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2002 Jan;24(1):24-6.
- [106] Ungefroren H, Voss M, Jansen M, Roeder C, Henne-Bruns D, Kremer B, Kalthoff H: Human pancreatic adenocarcinomas express Fas and Fas ligand yet are resistant to Fas-mediated apoptosis. *Cancer Res.* 1998 Apr 15;58(8):1741-9.
- [107] von Bernstorff W, Voss M, Freichel S, Schmid A, Vogel I, Johnk C, Henne-Bruns D, Kremer B, Kalthoff H: Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2001 Mar;7(3 Suppl):925s-932s.
- [108] Bernstorff WV, Glickman JN, Odze RD, Farraye FA, Joo HG, Goedegebuure PS, Eberlein TJ: Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand expression in normal pancreas and pancreatic tumors. Implications for immune privilege and immune escape. *Cancer.* 2002 May 15;94(10):2552-60.
- [109] Zhang W, Ding EX, Wang Q, Zhu DQ, He J, Li YL, Wang YH: Fas ligand expression in colon cancer: a possible mechanism of tumor immune privilege. *World J Gastroenterol.* 2005 Jun 21;11(23):3632-5.

- [110] Song E, Chen J, Ouyang N, Su F, Wang M, Heemann UÖ: Soluble Fas ligand released by colon adenocarcinoma cells induces host lymphocyte apoptosis: an active mode of immune evasion in colon cancer. *Br J Cancer*. 2001 Sep 28;85(7):1047-54.
- [111] Abrahams VM, Straszewski SL, Kamsteeg M, Hanczaruk B, Schwartz PE, Rutherford TJ, Mor G: Epithelial ovarian cancer cells secrete functional Fas ligand. *Cancer Res*. 2003 Sep 1;63(17):5573-81.
- [112] Takemoto N, Konishi F, Yamashita K, Kojima M, Furukawa T, Miyakura Y, Shitoh K, Nagai H: The correlation of microsatellite instability and tumor-infiltrating lymphocytes in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) and sporadic colorectal cancers: the significance of different types of lymphocyte infiltration. *Jpn J Clin Oncol*. 2004 Feb;34(2):90-8.
- [113] Schmielau, J., M.A. Nalesnik, and O.J. Finn, Suppressed T-cell receptor zeta chain expression and cytokine production in pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res.*, 2001. 7(3 Suppl): p. 933s-939s.
- [114] Koch M, Beckhove P, Op den Winkel J, Autenrieth D, Wagner P, Nummer D, Specht S, Antolovic D, Galindo L, Schmitz-Winnenthal FH, Schirmacher V, Buchler MW, Weitz J. Tumor infiltrating T lymphocytes in colorectal cancer: Tumor-selective activation and cytotoxic activity in situ. *Ann Surg*. 2006 Dec; 244(6):986-92; discussion 992-3.

Anhang

Allgemeine Erläuterungen zu den folgenden Tabellen:

p-Wert = Irrtumswahrscheinlichkeit

$p \leq 0,1$ = schwach signifikant, $p \leq 0,05$ = signifikant, $p \leq 0,01$ = hoch-signifikant,

$p \leq 0,001$ = höchst-signifikant

Gruppe 1 = Kolonkarzinom, Gruppe 2 = Lebermetastasen

Ü-Zeit = Überlebenszeit in Monaten

Th1 = Patienten vorbehandelt, Th2 = Patienten nachbehandelt

T-H = Tumorhotspots, S-H = Stromahotspots, SC T-H = Scoring Tumorhotspots,

SC S-H = Scoring Stromahotspots, SC T = Scoring Tumor, SC S = Scoring Stroma.

h1 = heterogen, h2 = homogen

Status = Überlebensstatus: 3 = lebte noch zum Zeitpunkt der Datenanalyse, 1 = Todesursache

war nicht der Tumor, 0 = Todesursache war der Tumor

Tabelle 7: Gesamtdaten

Nr.	Präparat	Gruppe	Ü-zeit	Status.	Th 1	Th 2	Geschl.	G	T	N	M	R	OP-Datum
1	8086/01	1	50	3			w	2	3	0	0	0	17.04.2001
2	27006/99	1	68				m	2	3	0	0	0	13.10.1999
3	11430/01	1	48	3			w	2	3	0	0	0	01.06.2001
4	24565/99	1	75	3			m	2	3	0	0	0	17.09.1999
5	22354/99	1	12	0			w	2	2	2	0	0	18.07.2000
6	22355/99	1					w	2	3	0	0	0	
7	26826/99	1	68	3			m	2	3	0	0	0	12.10.1999
8	28339/00	1	12	0		5FU/FA	m	2	3	2	0	0	13.10.2000
9	13436/00	1					w	2	2	0	0	0	
10	18492/02	1	18	0			m	2	3	2	0	0	26.08.2002
11	33081/99	1	19	0			w	2	3	2	0	0	
12	20756/02	1	30	0		Ch	m	2	2	2	0	0	25.09.2002
13	34318/00	1	54	3			m	2	3	0	0	0	11.12.2000
14	27922/00	1					w	2	3	0	0	0	
15	18939/99	1					w	2	3	0	0	0	
16	24962/02	1	5	0			w	2	2	2	0	0	20.11.2002
17	12432/02	1	36	3		5FU/FA	w	2	3	2	X	0	06.06.2002
18	34216/00	1	4	0			w	2	2	2	0	0	11.12.2000
19	8298/00	1	23	0		5FU/FA	m	2	3	2	0	0	17.03.2000
20	18312/99	1	77	3			m	2	3	0	0	0	12.07.1999
21	10287/00	1				Ra	m	2	3	0	0	0	
22	28924/00	1	31	1		Ra/Ch	m	2	3	2	1	0	19.10.2000
23	4379/01	1	13	0			m	2	3	2	0	0	26.02.2001
24	9576/00	1	30	0		5FU/FA	w	2	3	0	0	0	31.03.2000
25	20066/00	1	59	3			w	2	3	0	0	0	19.07.2000
26	7734/00	1	63	3			w	2	3	0	0	0	13.03.2000
27	17077/99	1	6	0			w	2	3	0	0	0	30.06.1999
28	19442/99	1	4	0			w	2	2	0	0	0	22.07.1999
29	25909/99	1					w	2	2	0	0	0	01.10.1999
30	25521/99	1	73	3			m	2	3	0	0	0	28.09.1999
31	20822/00	1	28	1			m	2	3	0	0	0	26.07.2000
32	14515/99	1	78	3		Ch	m	2	3	2	0	0	03.06.1999
33	29903/00	1					m	2	3	0	0	0	13.10.2000
34	17054/01	1	46	3		Ch	w	2	2	2	0	0	16.08.2001
35	12599/01	1	48				m	2	3	0	0	0	18.06.2001
36	26190/00	1					m	2	3	2	0	0	
37	2465/02	1					w	2	3	2	0	0	
38	4543/00	1	4	0		5FU/FA	m	2	3	0	0	0	14.02.2000
39	19487/02	1	26	0		Ch	w	2	3	2	0	0	09.09.2002
40	32709/99	1	72	3		Ra/Ch	m	2	2	2	0	0	08.12.1999
41	13045/01	1					w	2	3	0	0	0	25.06.2001
42	18117/99	1					m	2	3	2	0	0	
43	21521/01	1	1	0			m	2	3	2	0	0	18.10.2001
44	2923/00	1	64	3			w	2	2	0	X	0	28.01.2000
45	20101/99	1	77	3			w	2	3	0	0	0	29.07.1999
46	14875/00	1					m	2	3	2	0	0	
47	32327/99	1	50	0			w	2	4	0	X	0	03.12.1999
48	6888/02	2					m						
49	16050/02	2					w						
50	14656/02	2				C	w						
51	16186/02	2					m						
52	23984/02	2				Ra	w						
53	12695/02	2					w						
54	17106/02	2					m						
55	1328/02	2					m						
56	1647/02	2					m	2					
57	9574/02	2					w						
58	18466/02	2					m						
59	15931/01	2	17	0		Ch	w	2					01.08.2001
60	3631/02	2					m						
61	22519/01	2	103	3			m						25.10.1996
62	11235/02	2		3		Ch	m						
63	19493/01	2		3			m						
64	3451/01	2					m	2					
65	15899/02	2	35	3		Chh	w						22.07.2002
66	9879/02	2					w						
67	9982/01	2	18	0		5FU/FA	m	2					14.05.2001
68	1704/02	2	30	0		Ch	m						23.01.2002

Tabelle 8: Test auf Normalverteilung,
Kolon-CA

Merkmal	p-Wert	Signifikanz
CD4 T-H	0,241	nicht-signifikant
CD4 S-H	0,428	nicht-signifikant
CD4 SC T	0,001	höchst-signifikant
CD4 SC S	0,002	hoch-signifikant
CD4 SC T-H	0,001	höchst-signifikant
CD4 SC S-H	0,001	höchst-signifikant
CD8 T-H	0,222	nicht-signifikant
CD8 S-H	0,666	nicht-signifikant
CD8 SC T	0,001	höchst-signifikant
CD8 SC S	0,001	höchst-signifikant
CD8 SC T-H	0,002	hoch-signifikant
CD8 SC S-H	0,001	höchst-signifikant
CD16 T-H	0,06	schwachsignifikant
CD16 S-H	0,023	signifikant
CD16 SC T	0,053	schwachsignifikant
CD16 SC S	0,062	schwachsignifikant
CD16 SC T-H	0,029	signifikant
CD16 SC S-H	0,023	signifikant
CD79 T-H	0,017	signifikant
CD79 S-H	0,001	
CD79 SC T	0,001	höchst-signifikant
CD79 SC S	0,004	hoch-signifikant
CD79 SC T-H	0,001	höchst-signifikant
CD79 SC S-H	0,011	hoch-signifikant
CD3 ϵ T-H	0,151	nicht-signifikant
CD3 ϵ S-H	0,883	nicht-signifikant
CD3 ϵ SC T	0,003	hoch-signifikant
CD3 ϵ SC S	0,001	höchst-signifikant
CD3 ϵ SC T-H	0,004	hoch-signifikant
CD3 ϵ SC S-H	0,007	hoch-signifikant
CD3zeta T-H	0,296	nicht-signifikant
CD3zeta S-H	0,47	nicht-signifikant
CD3zeta SC T	0,001	höchst-signifikant
CD3zeta SC S	0,001	höchst-signifikant
CD3zeta SC T-H	0,001	höchst-signifikant
CD3zeta SC S-H	0,001	höchst-signifikant
KIMY2 T-H	0,4	nicht-signifikant
KIMY2 S-H	0,284	nicht-signifikant
KIMY2 SC T	0,05	signifikant
KIMY2 SC S	0,028	signifikant
KIMY2 SC T-H	0,055	schwachsignifikant
KIMY2 SC S-H	0,007	hoch-signifikant
CD83 SC T		
CD83 SC S		
KIM4 SC T		
KIM4 SC S		
KIM1 SC T	0,001	höchst-signifikant
KIM1 SC S	0,006	hoch-signifikant
W6/32 SC T h1	0,001	höchst-signifikant
W6/32 SC S h2	0,001	höchst-signifikant
FAS-L SC T h1	0,02	signifikant
FAS-L SC T h2	0,064	schwachsignifikant
KL1 SC T h1	0,001	höchst-signifikant
KL1 SC T h2		

Tabelle 9: Test auf Normalverteilung,
Lebermetastasen

Merkmal	p-Wert	Signifikanz
CD4 T-H	0,078	schwachsignifikant
CD4 S-H	0,565	nicht-signifikant
CD4 SC T	0,002	hoch-signifikant
CD4 SC S	0,037	signifikant
CD4 SC T-H	0,003	hoch-signifikant
CD4 SC S-H	0,001	höchst-signifikant
CD8 T-H	0,073	schwachsignifikant
CD8 S-H	0,966	nicht-signifikant
CD8 SC T	0,009	hoch-signifikant
CD8 SC S	0,327	nicht-signifikant
CD8 SC T-H	0,051	schwachsignifikant
CD8 SC S-H	0,149	nicht-signifikant
CD16 T-H	0,885	nicht-signifikant
CD16 S-H	0,69	nicht-signifikant
CD16 SC T	0,179	nicht-signifikant
CD16 SC S	0,315	nicht-signifikant
CD16 SC T-H	0,1	schwachsignifikant
CD16 SC S-H	0,079	schwachsignifikant
CD79 T-H	0,111	nicht-signifikant
CD79 S-H	0,711	nicht-signifikant
CD79 SC T	0,209	nicht-signifikant
CD79 SC S	0,29	nicht-signifikant
CD79 SC T-H	0,236	nicht-signifikant
CD79 SC S-H	0,19	nicht-signifikant
CD3 ϵ T-H	0,124	nicht-signifikant
CD3 ϵ S-H	0,978	nicht-signifikant
CD3 ϵ SC T	0,106	nicht-signifikant
CD3 ϵ SC S	0,052	schwachsignifikant
CD3 ϵ SC T-H	0,055	schwachsignifikant
CD3 ϵ SC S-H	0,052	schwachsignifikant
CD3zeta T-H	0,29	nicht-signifikant
CD3zeta S-H	0,92	nicht-signifikant
CD3zeta SC T	0,025	signifikant
CD3zeta SC S	0,105	nicht-signifikant
CD3zeta SC T-H	0,025	signifikant
CD3zeta SC S-H	0,105	nicht-signifikant
KIMY2 T-H	0,135	nicht-signifikant
KIMY2 S-H	0,493	nicht-signifikant
KIMY2 SC T	0,298	nicht-signifikant
KIMY2 SC S	0,146	nicht-signifikant
KIMY2 SC T-H	0,49	nicht-signifikant
KIMY2 SC S-H	0,009	hoch-signifikant
CD83 SC T		
CD83 SC S		
KIM4 SC T		
KIM4 SC S		
KIM1 SC T	0,001	hoch-signifikant
KIM1 SC S	0,166	nicht-signifikant
W6/32 SC T h1	0,766	nicht-signifikant
W6/32 SC S h2	0,001	hoch-signifikant
FAS-L SC T h1		
FAS-L SC T h2		
KL1 SC T h1		
KL1 SC T h2		

Tabelle 10: Test auf Normalverteilung
Kolon-CA, N0

Merkmal	p-Wert	Signifikanz
CD4 T-H	0,57	nicht-signifikant
CD4 S-H	0,871	nicht-signifikant
CD4 SC T	0,022	signifikant
CD4 SC S	0,012	signifikant
CD4 SC T-H	0,033	signifikant
CD4 SC S-H	0,006	hoch-signifikant
CD8 T-H	0,314	nicht-signifikant
CD8 S-H	0,754	nicht-signifikant
CD8 SC T	0,005	hoch-signifikant
CD8 SC S	0,006	hoch-signifikant
CD8 SC T-H	0,018	signifikant
CD8 SC S-H	0,01	hoch-signifikant
CD16 T-H	0,097	schwach-signifikant
CD16 S-H	0,24	nicht-signifikant
CD16 SC T	0,148	nicht-signifikant
CD16 SC S	0,073	schwach-signifikant
CD16 SC T-H	0,171	nicht-signifikant
CD16 SC S-H	0,037	signifikant
CD79 T-H	0,016	signifikant
CD79 S-H	0,006	hoch-signifikant
CD79 SC T	0,046	signifikant
CD79 SC S	0,08	schwach-signifikant
CD79 SC T-H	0,046	signifikant
CD79 SC S-H	0,121	nicht-signifikant
CD3 ϵ T-H	0,216	nicht-signifikant
CD3 ϵ S-H	0,96	nicht-signifikant
CD3 ϵ SC T	0,021	signifikant
CD3 ϵ SC S	0,017	signifikant
CD3 ϵ SC T-H	0,057	schwach-signifikant
CD3 ϵ SC S-H	0,038	signifikant
CD3 ξ T-H	0,733	nicht-signifikant
CD3 ξ S-H	0,727	nicht-signifikant
CD3 ξ SC T	0,041	signifikant
CD3 ξ SC S	0,053	schwachs signifikant
CD3 ξ SC T-H	0,041	signifikant
CD3 ξ SC S-H	0,053	schwachs signifikant
KIMY2 T-H	0,612	nicht-signifikant
KIMY2 S-H	0,56	nicht-signifikant
KIMY2 SC T	0,151	nicht-signifikant
KIMY2 SC S	0,211	nicht-signifikant
KIMY2 SC T-H	0,219	nicht-signifikant
KIMY2 SC S-H	0,068	schwach-signifikant
CD83 SC T		
CD83 SC S		
KIM4 SC T		
KIM4 SC S		
KIM1 SC T	0,094	schwach-signifikant
KIM1 SC S	0,059	schwach-signifikant
W6/32 SC T h1	0,003	hoch-signifikant
W6/32 SC S h2	0,006	hoch-signifikant
FAS-L SC T h1	0,049	signifikant
FAS-L SC T h2	0,11	nicht-signifikant
KL1 SC T h1		
KL1 SC T h2		

Tabelle 11: Test auf Normalverteilung
Kolon-CA, N2

Merkmal	p-Wert	Signifikanz
CD4 T-H	0,45	nicht-signifikant
CD4 S-H	0,385	nicht-signifikant
CD4 SC T	0,021	signifikant
CD4 SC S	0,249	nicht-signifikant
CD4 SC T-H	0,118	nicht-signifikant
CD4 SC S-H	0,151	nicht-signifikant
CD8 T-H	0,79	nicht-signifikant
CD8 S-H	0,834	nicht-signifikant
CD8 SC T	0,136	nicht-signifikant
CD8 SC S	0,252	nicht-signifikant
CD8 SC T-H	0,226	nicht-signifikant
CD8 SC S-H	0,104	nicht signifikant
CD16 T-H	0,504	nicht-signifikant
CD16 S-H	0,19	nicht-signifikant
CD16 SC T	0,317	nicht-signifikant
CD16 SC S	0,27	nicht-signifikant
CD16 SC T-H	0,345	nicht-signifikant
CD16 SC S-H	0,416	nicht-signifikant
CD79 T-H	0,104	nicht-signifikant
CD79 S-H	0,037	signifikant
CD79 SC T	0,013	signifikant
CD79 SC S	0,212	nicht-signifikant
CD79 SC T-H	0,009	hoch-signifikant
CD79 SC S-H	0,116	nicht-signifikant
CD3 ϵ T-H	0,763	nicht-signifikant
CD3 ϵ S-H	0,989	nicht-signifikant
CD3 ϵ SC T	0,233	nicht-signifikant
CD3 ϵ SC S	0,12	nicht-signifikant
CD3 ϵ SC T-H	0,085	schwach-signifikant
CD3 ϵ SC S-H	0,314	nicht-signifikant
CD3 ξ T-H	0,727	nicht-signifikant
CD3 ξ S-H	0,592	nicht-signifikant
CD3 ξ SC T	0,064	schwach-signifikant
CD3 ξ SC S	0,011	hoch-signifikant
CD3 ξ SC T-H	0,064	schwach-signifikant
CD3 ξ SC S-H	0,011	hoch-signifikant
KIMY2 T-H	0,591	nicht-signifikant
KIMY2 S-H	0,373	nicht-signifikant
KIMY2 SC T	0,594	nicht-signifikant
KIMY2 SC S	0,143	nicht-signifikant
KIMY2 SC T-H	0,515	nicht-signifikant
KIMY2 SC S-H	0,159	nicht-signifikant
CD83 SC T		
CD83 SC S		
KIM4 SC T		
KIM4 SC S		
KIM1 SC T	0,016	signifikant
KIM1 SC S	0,166	nicht-signifikant
W6/32 SC T h1	0,02	signifikant
W6/32 SC S h2		
FAS-L SC T h1	0,792	nicht-signifikant
FAS-L SC T h2	0,019	signifikant
KL1 SC T h1	0,004	hoch-signifikant
KL1 SC T h2		

Tabelle 12: U-Test Kolon-CA/Lebermetastasen

Merkmale	p-Werte	Signifikanz
CD4 T-H	0,001	höchst-signifikant
CD4 S-H	0,001	höchst-signifikant
CD4 SC T	0,761	nicht-signifikant
CD4 SC S	0,51	nicht-signifikant
CD4 SC T-H	0,809	nicht-signifikant
CD4 SC S-H	0,312	nicht-signifikant
CD8 T-H	0,001	höchst-signifikant
CD8 S-H	0,001	höchst-signifikant
CD8 SC T	0,033	signifikant
CD8 SC S	0,325	nicht-signifikant
CD8 SC T-H	0,057	schwach-signifikant
CD8 SC S-H	0,279	nicht-signifikant
CD16 T-H	0,001	höchst-signifikant
CD16 S-H	0,001	höchst-signifikant
CD16 SC T	0,185	nicht-signifikant
CD16 SC S	0,161	nicht-signifikant
CD16 SC T-H	0,107	nicht-signifikant
CD16 SC S-H	0,118	nicht-signifikant
CD79 T-H	0,077	schwach-signifikant
CD79 S-H	0,006	hoch-signifikant
CD79 SC T	0,108	nicht-signifikant
CD79 SC S	0,242	nicht-signifikant
CD79 SC T-H	0,192	nicht-signifikant
CD79 SC S-H	0,309	nicht-signifikant
CD3 ϵ T-H	0,001	höchst-signifikant
CD3 ϵ S-H	0,605	nicht-signifikant
CD3 ϵ SC T	0,776	nicht-signifikant
CD3 ϵ SC S	0,06	schwach-signifikant
CD3 ϵ SC T-H	0,795	nicht-signifikant
CD3 ϵ SC S-H	0,024	signifikant
CD3 ξ T-H	0,001	höchst-signifikant
CD3 ξ S-H	0,821	nicht-signifikant
CD3 ξ SC T	0,001	höchst-signifikant
CD3 ξ SC S	0,015	signifikant
CD3 ξ SC T-H	0,001	höchst-signifikant
CD3 ξ SC S-H	0,015	signifikant
KIMY2 T-H	0,001	höchst-signifikant
KIMY2 S-H	0,044	signifikant
KIMY2 SC T	0,008	hoch-signifikant
KIMY2 SC S	0,03	signifikant
KIMY2 SC T-H	0,015	signifikant
KIMY2 SC S-H	0,006	hoch-signifikant
CD83 SC T	1,001	nicht-signifikant
CD83 SC S	1,001	nicht-signifikant
KIM4 SC T	1,001	nicht-signifikant
KIM4 SC S	1,001	nicht-signifikant
KIM1 SC T	0,021	signifikant
KIM1 SC S	0,044	signifikant
W6/32 SC T h1	0,709	nicht-signifikant
W6/32 SC S h2	0,242	nicht-signifikant
FAS-L SC T h1	0,244	nicht-signifikant
FAS-L SC T h2	0,001	höchst-signifikant
KL1 SC T h1	0,001	höchst-signifikant
KL1 SC T h2	1,001	nicht-signifikant

Tabelle 13: U-Test N0/N2

Merkmale	p-Werte	Signifikanz
CD4 T-H	0,145	nicht-signifikant
CD4 S-H	0,677	nicht-signifikant
CD4 SC T	0,126	nicht-signifikant
CD4 SC S	0,482	nicht-signifikant
CD4 SC T-H	0,205	nicht-signifikant
CD4 SC S-H	0,37	nicht-signifikant
CD8 T-H	0,615	nicht-signifikant
CD8 S-H	0,757	nicht-signifikant
CD8 SC T	0,191	nicht-signifikant
CD8 SC S	0,241	nicht-signifikant
CD8 SC T-H	0,14	nicht-signifikant
CD8 SC S-H	0,202	nicht-signifikant
CD16 T-H	0,945	nicht-signifikant
CD16 S-H	0,681	nicht-signifikant
CD16 SC T	0,396	nicht-signifikant
CD16 SC S	0,737	nicht-signifikant
CD16 SC T-H	0,462	nicht-signifikant
CD16 SC S-H	0,834	nicht-signifikant
CD79 T-H	0,55	nicht-signifikant
CD79 S-H	1,001	nicht-signifikant
CD79 SC T	0,288	nicht-signifikant
CD79 SC S	0,426	nicht-signifikant
CD79 SC T-H	0,148	nicht-signifikant
CD79 SC S-H	0,32	nicht-signifikant
CD3 ϵ T-H	0,691	nicht-signifikant
CD3 ϵ S-H	0,475	nicht-signifikant
CD3 ϵ SC T	0,885	nicht-signifikant
CD3 ϵ SC S	0,482	nicht-signifikant
CD3 ϵ SC T-H	0,901	nicht-signifikant
CD3 ϵ SC S-H	0,602	nicht-signifikant
CD3 ξ T-H	0,032	signifikant
CD3 ξ S-H	0,188	nicht-signifikant
CD ξ SC T	0,121	nicht-signifikant
CD3 ξ SC S	0,029	signifikant
CD3 ξ SC T-H	0,121	nicht-signifikant
CD3 ξ SC S-H	0,029	signifikant
KIMY2 T-H	0,666	nicht-signifikant
KIMY2 S-H	0,572	nicht-signifikant
KIMY2 SC T	0,851	nicht-signifikant
KIMY2 SC S	0,762	nicht-signifikant
KIMY2 SC T-H	0,912	nicht-signifikant
KIMY2 SC S-H	0,469	nicht-signifikant
CD83 SC T	1,001	nicht-signifikant
CD83 SC S	1,001	nicht-signifikant
KIM4 SC T	1,001	nicht-signifikant
KIM4 SC S	1,001	nicht-signifikant
KIM1 SC T	0,881	nicht-signifikant
KIM1 SC S	0,709	nicht-signifikant
W6/32 SC T h1	0,386	nicht-signifikant
W6/32 SC S h2	0,236	nicht-signifikant
FAS-L SC T h1	0,854	nicht-signifikant
FAS-L SC T h2	0,001	höchst-signifikant
KL1 SC T h1	0,201	nicht-signifikant
KL1 SC T h2	1,001	nicht-signifikant

Tabelle 14: Überlebensdatenstatistik, Log-Rank-Test, Kolonkarzinom

	n	Mittelwert	s	Median	25.Perzentile	75.Perzentile	low	high	Log Rank p
CD4 T-H	31	5,68	1,87	6	5	7	21	10	0,361
CD4 S-H	31	49,65	13,7	51	44	58	16	15	0,607
CD4 SC T	31	2,35	1,23	2	1	4	22	9	0,684
CD4 SC S	31	3,52	1,26	4	2	5	23	8	0,9
CD8 T-H	31	7,77	2,77	8	5	11	21	10	0,972
CD8 S-H	31	47,16	15,9	49	32	59	16	15	0,329
CD8 SC T	31	3,55	1,46	4	2	5	21	10	0,451
CD8 SC S	31	3,81	1,14	4	3	5	21	10	0,280
CD3z T-H	31	7,26	4,24	7	4	9	19	12	0,001
CD3z S-H	31	27,1	12	31	21	38	16	15	0,724
CD3z SC T	31	3,42	1,41	4	2	4	25	6	0,085
CD3z SC S	31	3,74	1,48	4	3	5	21	10	0,031
CD3e T-H	31	11,58	4,19	11	9	14	19	12	0,185
CD3e S-H	31	60,13	18,5	58	45	72	16	15	0,569
CD3e SC T	31	3,48	1,21	4	2	4	24	7	0,744
CD3e SC S	31	4,03	1,05	4	4	5	21	10	0,924
CD16 T-H	29	4,1	2,59	4	2	6	19	10	0,887
CD16 S-H	29	13,79	10,9	12	6	16	18	11	0,777
CD16 SC T	29	3,52	1,62	4	2	5	20	9	0,754
CD16 SC S	29	3,86	1,77	4	2	5	16	13	0,792
CD79 T-H	30	1,9	1,35	2	1	2,25	23	7	0,492
CD79 S-H	30	5	7,01	2,5	1,75	5	15	15	0,131
CD79 SC T	30	1,43	0,77	1	1	2	18	12	0,838
CD79 SC S	30	1,7	1,06	2	1	2	26	4	0,331
KIM4 SC T	31	0,16	0,37	0	0	0	26	5	
KIM4 SC S	31	1	0	1	1	1	31	0	
CD83 SC T	31	0,9	0,3	1	1	1	31	0	
CD83 SC S	31	1	0	1	1	1	31	0	
KIMY2 T-H	31	5,84	2,42	6	3	8	18	13	0,639
KIMY2 S-H	31	38,13	15,7	39	23	28	16	15	0,915
KIMY2 SC T	31	3,97	1,35	4	3	5	21	10	0,259
KIMY2 SC S	31	5,03	0,98	5	4	6	19	12	0,386
KIM1 SC T	31	1,39	1,17	1	1	2	21	10	0,553
KIM1 SC S	31	4,06	1,79	5	2	6	23	8	0,837
W6/32 SC T h1	11	5,18	1,33	6	4	6			
W6/32 SC T h2	20	5,6	0,82	6	6	6			
FasL SC T h1	15	1,27	0,79	1	1	1			
FasL SC T h2	14	4,14	2,41	5	3	6			

Tabelle 15a : CD4, Kolonkarzinom

Nummer	Präparat	Gruppe	T-H	S-H	SC T	SC S	SC T-H	SC S-H
1	8086/01	1	1	58	4	5	4	4
2	27006/99	1	5	74	4	5	4	5
3	11430/01	1	5	72	4	5	4	5
4	24565/99	1	8	54	5	5	5	5
5	22354/99	1	6	60	2	5	2	4
6	22355/99	1	4	48	2	2	2	2
7	26826/99	1	8	52	2	4	4	4
8	28339/00	1	6	48	2	4	2	4
9	13436/00	1	5	47	2	4	2	4
10	18492/02	1	4	60	2	5	1	5
11	33081/99	1	5	36	2	2	1	2
12	20756/02	1	4	44	2	5	1	5
13	34318/00	1	6	60	2	5	2	5
14	27922/00	1	6	52	2	4	2	4
15	18939/99	1	5	56	2	5	2	5
16	24962/02	1	8	47	2	2	2	2
17	12432/02	1	6	57	2	2	2	2
18	34216/00	1	7	76	2	5	4	5
19	8298/00	1	5	53	2	3	2	3
20	18312/99	1	8	42	2	4	4	4
21	10287/00	1	6	33	2	2	2	2
22	28924/00	1	3	26	2	1	1	1
23	4379/01	1	9	52	2	4	4	4
24	9576/00	1	7	49	2	4	4	4
25	20066/00	1	5	48	2	2	2	2
26	7734/00	1	7	23	2	1	1	1
27	17077/99	1	5	40	2	4	1	4
28	19442/99	1	7	30	2	2	1	2
29	25909/99	1	8	44	2	5	1	4
30	25521/99	1	4	31	2	2	1	2
31	20822/00	1	4	33	2	4	1	4
32	14515/99	1	5	52	2	4	1	4
33	29903/00	1	2	48	2	4	1	4
34	17054/01	1	4	49	2	4	1	4
35	12599/01	1	7	52	2	4	2	4
36	26190/00	1	6	54	2	4	3	4
37	2465/02	1	5	48	2	3	2	3
38	4543/00	1	8	63	2	4	4	4
39	19487/02	1	5	45	2	2	2	2
40	32709/99	1	5	72	2	2	3	5
41	13045/01	1	13	64	2	4	5	4
42	18117/99	1	4	60	2	5	2	5
43	21521/01	1	1	12	2	4	1	2
44	2923/00	1	5	48	2	4	2	2
45	20101/99	1	6	51	2	2	2	3
46	14875/00	1	5	46	2	3	3	2
47	32327/99	1	6	55	2	3	1	2

Tabelle 15b: CD4, Lebermetastasen

Nummer	Präparat	Gruppe	T-H	S-H	SC T	SC S	SC T-H	SC S-H
48	6888/02	2	1	24	2	2	1	2
49	16050/02	2	2	17	2	2	2	2
50	14656/02	2	1	21	2	4	2	4
51	16186/02	2	8	44	2	4	2	4
52	23984/02	2	2	14	2	4	1	4
53	12695/02	2	5	10	2	4	2	4
54	17106/02	2	3	42	2	5	2	4
55	1328/02	2	2	23	2	4	2	4
56	1647/02	2	1	31	1	5	1	5
57	9574/02	2	3	40	2	4	2	4
58	18466/02	2	5	24	4	5	4	4
59	15931/01	2	10	38	6	6	5	5
60	3631/02	2	1	25	1	2	1	2
61	22519/01	2	2	38	2	4	2	4
62	11235/02	2	3	28	2	4	2	4
63	19493/01	2	3	18	2	4	2	4
64	3451/01	2	2	48	4	6	2	4
65	15899/02	2	6	12	2	2	2	4
66	9879/02	2	3	40	1	4	1	4
67	9982/01	2	5	43	2	4	4	5
68	1704/02	2	3	13	2	2	2	4

Tabelle 16a: CD8, Kolonkarzinom

Nummer	Präparat	Gruppe	T-H	S-H	SC T	SC S	SC T-H	SC S-H
1	8086/01	1	8	31	5	4	4	4
2	27006/99	1	9	65	5	5	5	5
3	11430/01	1	8	55	4	5	4	5
4	24565/99	1	11	77	5	5	5	5
5	22354/99	1	5	49	1	4	1	4
6	22355/99	1	5	23	2	2	2	2
7	26826/99	1	7	32	2	2	2	2
8	28339/00	1	11	64	5	5	5	5
9	13436/00	1	4	34	1	4	1	4
10	18492/02	1	11	38	4	3	4	3
11	33081/99	1	7	32	2	2	1	1
12	20756/02	1	11	54	5	5	4	4
13	34318/00	1	8	52	4	4	3	3
14	27922/00	1	6	46	4	4	4	4
15	18939/99	1	8	41	4	4	4	4
16	24962/02	1	2	27	1	2	1	2
17	12432/02	1	7	48	5	4	5	4
18	34216/00	1	10	70	5	5	5	5
19	8298/00	1	8	69	2	4	2	4
20	18312/99	1	11	35	5	4	5	4
21	10287/00	1	8	62	4	4	4	4
22	28924/00	1	5	46	2	2	2	2
23	4379/01	1	4	59	2	4	2	4
24	9576/00	1	7	29	4	4	4	4
25	20066/00	1	14	33	5	4	5	2

Fortsetzung Tabelle 16a

Nummer	Präparat	Gruppe	T-H	S-H	SC T	SC S	SC T-H	SC S-H
26	7734/00	1	8	28	2	2	2	2
27	17077/99	1	5	41	4	3	4	3
28	19442/99	1	11	52	5	5	5	5
29	25909/99	1	5	57	4	4	4	4
30	25521/99	1	5	54	4	5	4	5
31	20822/00	1	7	35	3	4	3	4
32	14515/99	1	8	56	4	4	4	4
33	29903/00	1	7	45	4	4	3	4
34	17054/01	1	9	37	4	4	4	4
35	12599/01	1	5	76	2	5	2	5
36	26190/00	1	17	39	6	5	5	4
37	2465/02	1	6	38	1	3	1	3
38	4543/00	1	7	64	4	5	4	4
39	19487/02	1	4	20	2	2	1	1
40	32709/99	1	4	27	1	2	1	2
41	13045/01	1	9	50	4	4	4	4
42	18117/99	1	5	36	2	2	2	2
43	21521/01	1	7	61	4	5	4	5
44	2923/00	1	11	77	5	5	5	5
45	20101/99	1	7	40	4	4	4	4
46	14875/00	1						
47	32327/99	1	5	51	1	2	1	2
48	6888/02	2	1	18	2	2	4	4
49	16050/02	2	1	8	1	2	1	2
50	14656/02	2	7	18	2	4	2	4
51	16186/02	2	2	34	2	6	2	6
52	23984/02	2	1	5	2	2	2	2
53	12695/02	2	3	11	2	4	2	4

Tabelle 16b: CD8, Lebermetastasen

Nummer	Präparat	Gruppe	T-H	S-H	SC T	SC S	SC T-H	SC S-H
54	17106/02	2	6	33	4	6	4	6
55	1328/02	2	4	31	4	6	4	6
56	1647/02	2	0	41	0	6	0	6
57	9574/02	2	1	22	2	4	2	4
58	18466/02	2	6	25	6	6	4	4
59	15931/01	2	6	22	6	6	4	4
60	3631/02	2	5	25	4	6	4	6
61	22519/01	2	1	12	2	4	2	4
62	11235/02	2	2	22	2	4	2	4
63	19493/01	2	2	19	4	4	4	4
64	3451/01	2	1	27	2	4	2	4
65	15899/02	2	1	8	1	2	1	2
66	9879/02	2	2	18	2	2	4	2
67	9982/01	2	2	32	2	5	2	5
68	1704/02	2	1	11	2	2	2	2

Tabelle 17a: CD3 epsilon, Gruppe 1, Kolonkarzinom

Nummer	Präparat	Gruppe	T-H	S-H	SC T	SC S	SC T-H	SC S-H
1	8086/01	1	11	69	4	4	4	4
2	27006/99	1	10	88	2	5	2	5
3	11430/01	1	9	61	2	5	2	5
4	24565/99	1	15	73	5	5	5	5
5	22354/99	1	4	72	4	6	4	6
6	22355/99	1	9	31	4	3	2	3
7	26826/99	1	23	91	5	5	4	5
8	28339/00	1	19	90	5	5	4	5
9	13436/00	1	5	38	1	2	1	2
10	18492/02	1	7	72	2	4	2	4
11	33081/99	1	10	65	2	4	2	4
12	20756/02	1	10	57	4	4	2	3
13	34318/00	1	12	72	4	4	4	4
14	27922/00	1	12	60	2	4	2	2
15	18939/99	1	11	64	4	4	4	4
16	24962/02	1	13	45	3	4	2	4
17	12432/02	1	14	84	5	5	5	5
18	34216/00	1	9	55	2	4	2	3
19	8298/00	1	8	46	2	4	1	4
20	18312/99	1	9	37	2	2	2	2
21	10287/00	1	16	79	4	4	4	4
22	28924/00	1	16	39	4	3	4	3
23	4379/01	1	12	89	5	5	4	5
24	9576/00	1	9	54	4	4	2	2
25	20066/00	1	17	84	5	5	4	5
26	7734/00	1	17	49	4	4	5	4
27	17077/99	1	7	32	2	4	2	1
28	19442/99	1	19	89	5	5	5	5
29	25909/99	1	9	87	4	5	3	5
30	25521/99	1	10	41	3	4	3	4
31	20822/00	1	9	51	4	4	4	4
32	14515/99	1	12	50	4	4	4	4
33	29903/00	1	6	70	1	2	1	2
34	17054/01	1	11	42	3	2	3	2
35	12599/01	1	10	71	2	6	2	6
36	26190/00	1	17	73	5	5	4	4
37	2465/02	1	8	42	2	2	2	2
38	4543/00	1	11	58	4	4	4	4
39	19487/02	1	7	30	1	2	1	2
40	32709/99	1	9	32	2	2	2	2
41	13045/01	1	12	44	2	4	2	4
42	18117/99	1	8	35	2	2	2	2
43	21521/01	1	11	51	3	2	3	2
44	2923/00	1	16	70	4	4	4	4
45	20101/99	1	9	43	4	4	2	4
46	14875/00	1	10	55	4	5	4	5
47	32327/99	1	9	61	4	5	4	5

Tabelle 17b: CD3 epsilon, Lebermetastasen

Nummer	Präparat	Gruppe	T-H	T-S	SC T	SC S	SC T-H	SC S-H
48	6888/02	2	1	46	2	4	2	4
49	16050/02	2	1	30	1	2	1	2
50	14656/02	2	1	72	2	6	2	6
51	16186/02	2	1	71	2	6	2	6
52	23984/02	2	1	19	2	2	2	2
53	12695/02	2	3	15	4	2	4	2
54	17106/02	2	5	102	4	6	4	6
55	1328/02	2	7	45	4	4	4	4
56	1647/02	2	1	79	2	6	2	6
57	9574/02	2	2	57	4	4	4	4
58	18466/02	2	9	51	6	6	6	6
59	15931/01	2	14	56	6	6	6	6
60	3631/02	2	2	75	2	6	2	6
61	22519/01	2	1	40	1	4	1	4
62	11235/02	2	2	23	2	2	2	2
63	19493/01	2	7	46	4	6	2	6
64	3451/01	2	13	99	5	6	5	6
65	15899/02	2	1	77	2	6	2	6
66	9879/02	2	3	86	5	4	5	4
67	9982/01	2	3	60	4	4	4	4
68	1704/02	2	4	25	4	4	4	4

Tabelle 18a: CD3 zeta, Kolonkarzinom

Nummer	Präparat	Gruppe	T-H	S-H	SC T	SC S	SC T-H	SC S-H
1	8086/01	1	15	40	5	5	5	5
2	27006/99	1	8	44	4	5	4	5
3	11430/01	1	3	40	2	5	2	5
4	24565/99	1	15	41	5	6	5	6
5	22354/99	1	7	38	4	4	4	4
6	22355/99	1	7	10	2	2	2	2
7	26826/99	1	11	22	5	5	5	5
8	28339/00	1	6	23	3	4	3	4
9	13436/00	1	5	24	2	4	2	4
10	18492/02	1	0	0	0	0	0	0
11	33081/99	1	4	5	4	2	4	2
12	20756/02	1	6	22	4	4	4	4
13	34318/00	1	9	39	4	5	4	5
14	27922/00	1	12	39	5	5	5	5
15	18939/99	1	5	22	2	2	2	2
16	24962/02	1	7	34	4	4	4	4
17	12432/02	1	3	29	2	2	2	2
18	34216/00	1	7	39	4	5	4	5
19	8298/00	1	7	38	3	3	3	3
20	18312/99	1	17	32	5	5	5	5
21	10287/00	1	11	38	5	5	5	5
22	28924/00	1	8	39	4	4	4	4
23	4379/01	1	16	41	5	5	5	5
24	9576/00	1	7	23	4	4	4	4
25	20066/00	1	8	34	3	4	3	4

Fortsetzung Tabelle 18a

Nummer	Präparat	Gruppe	T-H	S-H	SC T	SC S	SC T-H	SC S-H
26	7734/00	1	9	21	4	4	4	4
27	17077/99	1	2	12	1	1	1	1
28	19442/99	1	6	32	2	3	2	3
29	25909/99	1	6	33	4	5	4	5
30	25521/99	1	8	34	5	5	5	5
31	20822/00	1	11	22	4	4	4	4
32	14515/99	1	8	18	4	4	4	4
33	29903/00	1	3	24	2	2	2	2
34	17054/01	1	4	14	2	2	2	2
35	12599/01	1	5	41	4	5	4	5
36	26190/00	1	10	25	5	5	5	5
37	2465/02	1	8	36	3	4	3	4
38	4543/00	1	7	31	4	4	4	4
39	19487/02	1	5	39	4	4	4	4
40	32709/99	1	10	22	4	4	4	4
41	13045/01	1	11	29	5	5	5	5
42	18117/99	1	3	22	2	4	2	4
43	21521/01	1	0	0	0	0	0	0
44	2923/00	1	7	34	4	5	4	5
45	20101/99	1	8	22	4	4	4	4
46	14875/00	1	0	0	0	0	0	0
47	32327/99	1	3	21	2	4	2	4

Tabelle 18b: CD3 zeta, Lebermetastasen

Nummer	Präparat	Gruppe	T-H	T-S	SC T	SC S	SC T-H	SC S-H
48	6888/02	2	1	31	1	4	1	4
49	16050/02	2	2	15	1	1	1	1
50	14656/02	2	2	29	2	4	2	4
51	16186/02	2	2	42	2	5	2	5
52	23984/02	2	1	11	1	1	1	1
53	12695/02	2	1	19	2	2	2	2
54	17106/02	2	1	19	1	2	1	2
55	1328/02	2	1	12	1	1	1	1
56	1647/02	2	1	21	1	2	1	2
57	9574/02	2	3	39	2	2	2	2
58	18466/02	2	5	62	4	5	4	5
59	15931/01	2	11	34	6	6	6	6
60	3631/02	2	2	28	2	4	2	4
61	22519/01	2	5	30	2	4	2	4
62	11235/02	2	3	28	2	2	2	2
63	19493/01	2	0	0	0	0	0	0
64	3451/01	2	4	45	2	2	2	2
65	15899/02	2	3	19	2	2	2	2
66	9879/02	2	5	48	4	4	4	4
67	9982/01	2	9	41	4	4	4	4
68	1704/02	2	1	21	1	2	1	2

Tabelle 19a: CD 79a, Kolonkarzinom

Nummer	Präparat	Gruppe	T-H	S-H	SC T	SC S	SC T-H	SC S-H
1	8086/01	1	0	0	0	0	0	0
2	27006/99	1	1	1	1	1	1	1
3	11430/01	1	1	2	1	1	1	1
4	24565/99	1	1	4	1	4	1	4
5	22354/99	1	1	1	1	1	1	1
6	22355/99	1	3	1	2	1	2	1
7	26826/99	1	6	30	2	4	2	4
8	28339/00	1	2	2	2	2	2	2
9	13436/00	1	1	2	1	2	1	2
10	18492/02	1	0	2	0	1	0	1
11	33081/99	1	4	10	1	2	1	2
12	20756/02	1	1	2	2	2	2	2
13	34318/00	1	3	12	3	3	3	3
14	27922/00	1	2	4	3	3	3	3
15	18939/99	1	2	2	2	2	2	2
16	24962/02	1	1	5	1	2	1	2
17	12432/02	1	3	3	1	1	1	1
18	34216/00	1	2	4	2	2	1	1
19	8298/00	1	1	2	1	1	1	1
20	18312/99	1	1	0	1	0	1	0
21	10287/00	1	2	1	1	1	1	1
22	28924/00	1	1	1	1	1	1	1
23	4379/01	1	3	26	2	4	2	4
24	9576/00	1	1	1	1	1	1	1
25	20066/00	1	1	2	1	2	1	2
26	7734/00	1	2	2	1	1	1	1
27	17077/99	1	2	7	1	2	1	2
28	19442/99	1	2	12	1	2	1	2
29	25909/99	1	2	2	2	1	2	1
30	25521/99	1	2	3	2	2	2	2
31	20822/00	1	2	2	2	2	2	2
32	14515/99	1	2	2	2	2	2	2
33	29903/00	1	0	0	0	0	0	0
34	17054/01	1	1	1	1	1	1	1
35	12599/01	1	5	38	4	6	4	5
36	26190/00	1	3	3	1	2	1	2
37	2465/02	1	3	13	1	1	1	1
38	4543/00	1	5	3	2	1	2	1
39	19487/02	1	2	5	1	2	1	2
40	32709/99	1	0	3	0	1	0	1
41	13045/01	1	2	13	1	2	1	2
42	18117/99	1	1	0	1	0	1	0
43	21521/01	1	3	3	3	2	2	2
44	2923/00	1	1	1	1	1	1	1
45	20101/99	1	2	3	2	2	2	2
46	14875/00	1	1	1	1	0	1	0
47	32327/99	1						

Tabelle 19b: CD79a, Lebermetastasen

Nummer	Präparat	Gruppe	T-H	S-H	SC T	SC S	SC T-H	SC S-H
48	6888/02	2	0		0	0	0	0
49	16050/02	2	1	2	1	1	1	1
50	14656/02	2	4	10	1	2	1	2
51	16186/02	2	6	18	4	4	3	3
52	23984/02	2	0	0	0	0	0	0
53	12695/02	2	2	9	2	2	2	2
54	17106/02	2	2	12	1	2	1	2
55	1328/02	2	4	3	2	1	1	1
56	1647/02	2	1	15	1	3	1	3
57	9574/02	2	1	1	1	1	1	1
58	18466/02	2	3	12	4	4	3	3
59	15931/01	2	16	31	4	4	3	4
60	3631/02	2	2	9	2	2	2	2
61	22519/01	2	1	3	1	1	1	1
62	11235/02	2	3	9	2	2	2	2
63	19493/01	2	1	0	1	0	1	0
64	3451/01	2	5	12	2	2	2	2
65	15899/02	2	4	15	2	2	2	2
66	9879/02	2	4	11	2	2	2	2
67	9982/01	2	4	11	4	4	3	3
68	1704/02	2	3	13	3	3	2	2

Tabelle 20a: CD16, Kolonkarzinom

Nummer	Präparat	Gruppe	T-H	S-H	SC T	SC S	SC T-H	SC S-H
1	8086/01	1	5	9	5	5	4	4
2	27006/99	1	2	4	4	4	4	4
3	11430/01	1	9	38	6	6	5	6
4	24565/99	1	1	3	1	1	1	1
5	22354/99	1	10	40	5	6	5	6
6	22355/99	1	2	2	2	2	1	1
7	26826/99	1	5	12	2	2	2	2
8	28339/00	1	7	16	5	5	5	5
9	13436/00	1	3	8	3	3	3	3
10	18492/02	1	7	12	6	6	5	5
11	33081/99	1	4	11	1	1	1	1
12	20756/02	1	9	21	4	5	4	5
13	34318/00	1	3	16	2	4	2	4
14	27922/00	1	3	11	2	5	2	4
15	18939/99	1	5	33	5	5	5	5
16	24962/02	1	3	8	2	2	2	2
17	12432/02	1	4	7	4	4	4	4
18	34216/00	1	1	1	1	1	1	1
19	8298/00	1	4	15	5	5	4	4
20	18312/99	1	3	10	4	4	4	4
21	10287/00	1	2	3	2	2	2	2
22	28924/00	1	1	4	1	1	1	1
23	4379/01	1	2	6	3	3	3	3
24	9576/00	1	3	14	4	4	4	4
25	20066/00	1	4	18	4	4	4	4

Fortsetzung Tabelle 20a, Kolonkarzinom

Nummer	Präparat	Gruppe	T-H	S-H	SC T	SC S	SC T-H	SC S-H
26	7734/00	1	3	9	5	5	5	5
27	17077/99	1	1	3	2	2	2	2
28	19442/99	1	2	5	4	4	4	4
29	25909/99	1	1	5	2	2	2	2
30	25521/99	1	7	34	6	6	5	5
31	20822/00	1	1	8	1	4	1	4
32	14515/99	1	1	3	1	1	1	1
33	29903/00	1	3	17	4	4	4	4
34	17054/01	1	6	12	5	5	5	5
35	12599/01	1	6	9	4	4	3	3
36	26190/00	1	1	7	1	1	1	1
37	2465/02	1	2	8	1	4	1	3
38	4543/00	1						
39	19487/02	1	1	5	2	2	2	2
40	32709/99	1	2	15	3	6	2	4
41	13045/01	1	7	12	5	4	5	4
42	18117/99	1	3	10	4	6	4	6
43	21521/01	1	6	39	4	6	4	5
44	2923/00	1	4	12	4	5	3	5
45	20101/99	1	2	6	2	2	1	1
46	14875/00	1	1	12	1	3	1	3
47	32327/99	1						

Tabelle 20b: CD16, Lebermetastasen

Nummer	Präparat	Gruppe	T-H	S-H	SC T	SC S	SC T-H	SC S-H
48	6888/02	2	1	5	1	1	1	1
49	16050/02	2	4	12	2	2	2	2
50	14656/02	2	5	31	4	4	4	4
51	16186/02	2	10	36	4	4	4	4
52	23984/02	2	5	16	2	3	2	3
53	12695/02	2	7	30	5	5	5	5
54	17106/02	2	9	34	5	5	5	5
55	1328/02	2	8	31	5	5	4	4
56	1647/02	2	1	20	1	4	1	4
57	9574/02	2	9	19	5	4	5	4
58	18466/02	2	8	26	5	5	5	4
59	15931/01	2	8	28	5	6	4	5
60	3631/02	2	7	40	4	6	4	5
61	22519/01	2	6	20	4	4	4	4
62	11235/02	2	3	35	2	5	2	4
63	19493/01	2	4	19	2	3	2	3
64	3451/01	2	12	21	5	5	5	5
65	15899/02	2	11	30	6	6	6	6
66	9879/02	2	4	20	2	4	2	4
67	9982/01	2	7	20	4	4	4	4
68	1704/02	2	9	36	5	6	5	6

Tabelle 21a: KiMy2, Kolonkarzinom

Nummer	Präparat	Gruppe	T-H	S-H	SC T	SC S	SC T-H	SC S-H
1	8086/01	1	6	44	4	5	2	4
2	27006/99	1	6	13	3	4	2	2
3	11430/01	1	9	68	5	6	4	5
4	24565/99	1	3	26	4	4	4	4
5	22354/99	1	6	66	4	6	4	6
6	22355/99	1	3	23	4	5	3	5
7	26826/99	1	3	23	2	4	2	3
8	28339/00	1	10	24	6	5	5	4
9	13436/00	1	6	54	4	6	4	5
10	18492/02	1	9	56	6	6	5	5
11	33081/99	1	7	48	4	6	2	4
12	20756/02	1	3	58	3	6	2	6
13	34318/00	1	7	36	4	6	4	5
14	27922/00	1	7	40	4	4	4	4
15	18939/99	1	10	36	6	6	5	5
16	24962/02	1	3	47	2	5	2	4
17	12432/02	1	11	12	5	4	4	3
18	34216/00	1	3	20	4	4	4	4
19	8298/00	1	6	22	4	5	4	4
20	18312/99	1	4	21	4	5	4	4
21	10287/00	1	9	15	6	4	5	3
22	28924/00	1	5	11	3	3	3	3
23	4379/01	1	5	18	5	4	5	4
24	9576/00	1	7	51	4	5	3	4
25	20066/00	1	7	43	4	5	4	4
26	7734/00	1	3	25	2	6	2	4
27	17077/99	1	8	21	5	4	4	4
28	19442/99	1	9	39	6	5	5	5
29	25909/99	1	5	55	4	6	3	4
30	25521/99	1	3	61	2	6	1	5
31	20822/00	1	1	19	2	4	2	3
32	14515/99	1	7	38	3	4	3	4
33	29903/00	1	8	39	3	5	3	4
34	17054/01	1	4	35	2	5	2	4
35	12599/01	1	6	29	4	5	3	4
36	26190/00	1	5	21	3	3	3	3
37	2465/02	1	6	29	5	5	4	4
38	4543/00	1	3	18	2	2	2	2
39	19487/02	1	5	25	4	5	3	5
40	32709/99	1	8	48	6	6	5	6
41	13045/01	1	4	23	2	5	2	3
42	18117/99	1	4	57	4	6	3	4
43	21521/01	1	6	46	5	6	4	5
44	2923/00	1	5	47	4	6	3	5
45	20101/99	1	8	50	6	6	5	5
46	14875/00	1	3	53	2	6	2	5
47	32327/99	1	3	46	2	4	1	1

Tabelle 21b: KiMy2, Lebermetastasen

Nummer	Präparat	Gruppe	T-H	S-H	SC T	SC S	SC T-H	SC S-H
48	6888/02	2	1	9	1	2	1	1
49	16050/02	2	4	15	2	4	2	4
50	14656/02	2	1	6	1	2	1	2
51	16186/02	2	1	20	2	4	2	4
52	23984/02	2	1	21	1	3	1	2
53	12695/02	2	3	52	4	5	3	4
54	17106/02	2	4	31	3	5	3	4
55	1328/02	2	6	32	5	6	4	5
56	1647/02	2	1	18	1	2	1	1
57	9574/02	2	3	29	4	5	3	2
58	18466/02	2	4	26	5	5	4	4
59	15931/01	2	5	35	5	5	4	4
60	3631/02	2	3	26	4	5	4	2
61	22519/01	2	2	27	3	4	3	4
62	11235/02	2	1	57	1	5	1	4
63	19493/01	2	1	11	1	4	1	2
64	3451/01	2	3	29	4	5	4	4
65	15899/02	2	2	29	2	4	2	3
66	9879/02	2	1	24	2	4	2	4
67	9982/01	2	5	27	5	5	4	4
68	1704/02	2	1	31	2	6	2	4

Tabelle 22a: CD83,Kolon-CA

Nr.	Präparat	Gruppe	SC T	SC S
1	8086/01	1	1	1
2	27006/99	1	1	1
3	11430/01	1	1	1
4	24565/99	1	1	1
5	22354/99	1	1	1
6	22355/99	1	1	1
10	18492/02	1	1	1
11	33081/99	1	0	1
12	20756/02	1	1	1
13	34318/00	1	1	1
14	27922/00	1	1	1
15	18939/99	1	1	1
16	24962/02	1	1	1
17	12432/02	1	1	1
18	34216/00	1	1	1
19	8298/00	1	1	1
20	18312/99	1	0	1
21	10287/00	1	1	1
22	28924/00	1	1	1
23	4379/01	1	1	1
24	9576/00	1	1	1
25	20066/00	1	1	1
26	7734/00	1	1	1
27	17077/99	1	1	1
28	19442/99	1	1	1
29	25909/99	1	1	1
30	25521/99	1	0	1
31	20822/00	1	1	1
32	14515/99	1	1	1
33	29903/00	1	1	1
34	17054/01	1	1	1
35	12599/01	1	1	1
36	26190/00	1	1	1
37	2465/02	1	1	1
38	4543/00	1	1	1
39	19487/02	1	1	1
40	32709/99	1	1	1
41	13045/01	1	1	1
42	18117/99	1	1	1
43	21521/01	1	1	1
44	2923/00	1	1	1
45	20101/99	1	1	1
46	14874/00	1	1	1
47	32327/	1	1	1

Tabelle 22b: CD83, Lebermetastasen

Nr.	Präparat	Gruppe	SC T	SC S
48	6888/02	2	1	1
49	16050/02	2	1	1
50	14656/02	2	1	1
51	16186/02	2	1	1
52	23984/02	2	0	1
53	12695/02	2	1	1
54	17106/02	2	1	1
55	1328/02	2	0	1
56	1647/02	2	1	1
57	9574/02	2	1	1
58	18466/02	2	1	1
59	15931/01	2	1	1
60	3631/02	2	0	1
61	22519/01	2	1	1
62	11235/02	2	1	1
63	19493/01	2	1	1
64	3451/01	2	1	1
65	15899/02	2	1	1
66	9879/02	2	0	1
67	9982/01	2	1	1
68	1704/02	2	1	1

Tabelle 23a: KiM4, Kolon-CA

Nr.	Präparat	Gruppe	SC T	SC S
1	8086/01	1	0	1
2	27006/99	1	0	1
3	11430/01	1	0	1
4	24565/99	1	1	1
5	22354/99	1	0	1
6	22355/99	1	0	1
10	18492/02	1	0	1
11	33081/99	1	0	1
12	20756/02	1	1	1
13	34318/00	1	0	1
14	27922/00	1	0	1
15	18939/99	1	0	1
16	24962/02	1	0	1
17	12432/02	1	0	1
18	34216/00	1	1	1
19	8298/00	1	0	1
20	18312/99	1	0	1
21	10287/00	1	0	1
22	28924/00	1	1	1
23	4379/01	1	0	1
24	9576/00	1	0	1
25	20066/00	1	0	1
26	7734/00	1	0	1
27	17077/99	1	0	1
28	19442/99	1	1	1
29	25909/99	1	0	1
30	25521/99	1	0	1
31	20822/00	1	0	1
32	14515/99	1	0	1
33	29903/00	1	0	1
34	17054/01	1	0	1
35	12599/01	1	1	1
36	26190/00	1	0	1
37	2465/02	1	0	1
38	4543/00	1	0	1
39	19487/02	1	0	1
40	32709/99	1	0	1
41	13045/01	1	0	1
42	18117/99	1	1	1
43	21521/01	1	0	1
44	2923/00	1	0	1
45	20101/99	1	0	1
46	14874/00	1	0	1
47	32327/99	1	1	1

Tabelle 23b: KiM4, Lebermetastasen

Nr.	Präparat	Gruppe	SC T	SC S
48	6888/02	2	0	1
49	16050/02	2	0	1
50	14656/02	2	0	1
51	16186/02	2	0	1
52	23984/02	2	0	1
53	12695/02	2	0	1
54	17106/02	2	0	1
55	1328/02	2	0	1
56	1647/02	2	0	1
57	9574/02	2	0	1
58	18466/02	2	1	1
59	15931/01	2	0	1
60	3631/02	2	0	1
61	22519/01	2	1	1
62	11235/02	2	0	1
63	19493/01	2	0	1
64	3451/01	2	1	1
65	15899/02	2	0	1
66	9879/02	2	0	1
67	9982/01	2	0	1
68	1704/02	2	0	1

Tabelle 24a: KiM1, Kolon-CA

Nr.	Präparat	Gruppe	SC T	SC S
1	8086/01	1	1	6
2	27006/99	1	2	4
3	11430/01	1	1	6
4	24565/99	1	2	6
5	22354/99	1	2	6
6	22355/99	1	1	2
10	18492/02	1	0	1
11	33081/99	1	1	2
12	20756/02	1	0	3
13	34318/00	1	2	6
14	27922/00	1	1	5
15	18939/99	1	0	2
16	24962/02	1	2	6
17	12432/02	1	4	4
18	34216/00	1	1	5
19	8298/00	1	1	5
20	18312/99	1	1	5
21	10287/00	1	1	5
22	28924/00	1	1	5
23	4379/01	1	1	5
24	9576/00	1	1	2
25	20066/00	1	4	4
26	7734/00	1	1	5
27	17077/99	1	1	3
28	19442/99	1	2	6
29	25909/99	1	2	5
30	25521/99	1	2	5
31	20822/00	1	2	6
32	14515/99	1	1	4
33	29903/00	1	1	5
34	17054/01	1	1	5
35	12599/01	1	0	5
36	26190/00	1	1	5
37	2465/02	1	0	4
38	4543/00	1	0	2
39	19487/02	1	0	0
40	32709/99	1	2	5
41	13045/01	1	0	2
42	18117/99	1	2	5
43	21521/01	1	1	2
44	2923/00	1	1	4
45	20101/99	1	1	2
46	14874/00	1	1	1
47	32327/99	1	1	4

Tabelle 24b: KiM1, Lebermetastasen

Nr.	Präparat	Gruppe	SC T	SC S
48	6888/02	2	0	0
49	16050/02	2	1	4
50	14656/02	2	1	6
51	16186/02	2	1	2
52	23984/02	2	0	2
53	12695/02	2	1	6
54	17106/02	2	0	5
55	1328/02	2	0	2
56	1647/02	2	1	4
57	9574/02	2	1	2
58	18466/02	2	1	2
59	15931/01	2	1	5
60	3631/02	2	1	2
61	22519/01	2	0	2
62	11235/02	2	1	4
63	19493/01	2	0	0
64	3451/01	2	1	5
65	15899/02	2	0	2
66	9879/02	2	1	1
67	9982/01	2	1	4
68	1704/02	2	1	4

Tabelle 25a: W6/32, Kolon-CA

Nr.	Präparat	Gruppe	SC T h1	SC T h2
1	8086/01	1		4
2	27006/99	1		6
3	11430/01	1		6
4	24565/99	1		6
5	22354/99	1		6
6	22355/99	1		2
10	18492/02	1	6	
11	33081/99	1		6
12	20756/02	1		6
13	34318/00	1		6
14	27922/00	1	6	
15	18939/99	1	6	
16	24962/02	1		6
17	12432/02	1		4
18	34216/00	1	6	
19	8298/00	1	6	
20	18312/99	1		6
21	10287/00	1		6
22	28924/00	1		4
23	4379/01	1	2	
24	9576/00	1	4	
25	20066/00	1	6	
26	7734/00	1		4
27	17077/99	1	6	
28	19442/99	1		6
29	25909/99	1		6
30	25521/99	1		6
31	20822/00	1		3
32	14515/99	1		6
33	29903/00	1		6
34	17054/01	1		6
35	12599/01	1		6
36	26190/00	1		6
37	2465/02	1	4	
38	4543/00	1		6
39	19487/02	1	6	
40	32709/99	1	5	
41	13045/01	1		4
42	18117/99	1		6
43	21521/01	1		4
44	2923/00	1	4	
45	20101/99	1		6
46	14875/00	1	6	
47	32327/99	1		6

Tabelle 25b: W6/32, Lebermetastasen

Nr.	Präparat	Gruppe	SC T h1	SC T h2
48	6888/02	2		6
49	16050/02	2		6
50	14656/02	2		4
51	16186/02	2	4	
52	23984/02	2	6	
53	12695/02	2		6
54	17106/02	2		4
55	1328/02	2		6
56	1647/02	2		6
57	9574/02	2		6
58	18466/02	2		6
59	15931/01	2		6
60	3631/02	2		6
61	22519/01	2		4
62	11235/02	2		4
63	19493/01	2		4
64	3451/01	2		6
65	15899/02	2		6
66	9879/02	2		6
67	9982/01	2		6
68	1704/02	2	6	

Tabelle 26a: FasL, Kolon-CA

Nr.	Präparat	Gruppe	SC T h1	SC T h2
1	8086/01	1		6
2	27006/99	1		6
3	11430/01	1		6
4	24565/99	1		4
5	22354/99	1		0
6	22355/99	1		4
10	18492/02	1		6
11	33081/99	1		
12	20756/02	1	1	
13	34318/00	1	1	
14	27922/00	1	6	
15	18939/99	1	1	
16	24962/02	1	2	
17	12432/02	1		0
18	34216/00	1	1	
19	8298/00	1		0
20	18312/99	1		6
21	10287/00	1	1	
22	28924/00	1		1
23	4379/01	1	1	
24	9576/00	1	1	
25	20066/00	1	1	
26	7734/00	1		6
27	17077/99	1	1	
28	19442/99	1		4
29	25909/99	1	6	
30	25521/99	1	1	
31	20822/00	1		6
32	14515/99	1		6
33	29903/00	1	6	
34	17054/01	1	1	
35	12599/01	1	1	
36	26190/00	1		4
37	2465/02	1	1	
38	4543/00	1		4
39	19487/02	1	1	
40	32709/99	1	1	
41	13045/01	1		6
42	18117/99	1	4	
43	21521/01	1	1	
44	2923/00	1	1	
45	20101/99	1	4	
46	14875/00	1		0
47	32327/99	1		4

Tabelle 26b: FasL, Lebermetastasen

Nr.	Präparat	Gruppe	SC T h1	SC T h2
48	6888/02	2		6
49	16050/02	2	4	
50	14656/02	2		6
51	16186/02	2		6
52	23984/02	2		6
53	12695/02	2	4	
54	17106/02	2		6
55	1328/02	2	4	
56	1647/02	2		6
57	9574/02	2		6
58	18466/02	2		6
59	15931/01	2		6
60	3631/02	2		6
61	22519/01	2		6
62	11235/02	2		6
63	19493/01	2	4	
64	3451/01	2		6
65	15899/02	2		6
66	9879/02	2		6
67	9982/01	2	4	
68	1704/02	2	4	

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff für die freundliche Überlassung des Themas.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn PD Dr. med. Wolfram von Bernstorff für die überaus nette und hilfreiche Zusammenarbeit.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Bence Sipos vom Pathologischen Institut der Universität Kiel für die Unterstützung vor allem in der Anfangsphase dieser Arbeit.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Christian Röder, Sonja Vollbehr und Bianca Körtge für die Hilfe während der oft mühsamen Laborarbeiten.

Herzlich gedankt sei auch Herrn Dipl. Inform. Jürgen Hedderich vom Institut für Medizinische Informatik und Statistik in Kiel für die statistische Hilfestellung.

Eine große Hilfe bei der äußeren Gestaltung dieser Arbeit war meine Schwester Anne Schmidt-Redemann zusammen mit Tilo Bischoff.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meiner Mutter bedanken, die mir stets hilfreich zur Seite steht.

Schließlich bedanke ich mich bei meinem lieben Ehemann, der immer für mich da ist, mich unterstützt und mir die beste Tochter der Welt geschenkt hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Mortazawi, Sophie; geb. Schmidt-Redemann
Geburtsdatum und -ort:	7.6.1978 in Freiburg i.Br.
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet, ein Kind geb. 2.6.2008
Eltern:	Prof. Dr. med. Burkhard Schmidt-Redemann, Facharzt für Kinderheilkunde, verstorben 1986 Dr. med. Winnie Schmidt-Redemann, Fachärztin für Kinderheilkunde
Geschwister	Anne Schmidt-Redemann, Sportwissenschaftlerin Lisa Schmidt-Redemann, Architektin (M.A.) Lena Schmidt-Redemann, Studentin der Medizin

Schulbildung:

1984-1986	Grundschule Norderney
1986-1989	Weierhof-Grundschule Freiburg
1989-1998	Friedrich-Gymnasium Freiburg, Abitur 1998 in Freiburg

Medizinstudium:

1998-2000	Vorklinik Carl-Gustav-Carus-Universität Dresden Physikum am 1.9.2000 in Dresden
2000-2005	Klinik Christian-Albrechts-Universität zu Kiel 1.Staatsexamen am 28.8.2001 in Kiel 2.Staatsexamen am 23.3.2004 in Kiel 3.Staatsexamen am 14.6.2005 in Kiel

Famulaturen:

Unfallchirurgie	Universitätsklinikum Freiburg, März-April 2001
Pädiatrie	Kinderarztpraxis, Freiburg, September -Oktober 2001
Gynäkologie	Städtisches Krankenhaus Kiel, Februar-März 2002
HNO	Universitätsklinik, Inselspital Bern, Juli-August 2002

Praktisches Jahr:

Kinderchirurgie	Universitätsklinikum Kiel, April 2004-Mai 2004
Herzchirurgie	Universitätsklinikum Kiel, Juni 2004-Juli 2004
Innere Medizin	St. Claraspital Basel, August 2004-November 2004
Pädiatrie	Universitätsspital Zürich, Dezember 2004-März 2005

Veröffentlichungen:

von Bernstorff W, Mortazawi S, Röder C, Sipos B, Kalthoff H. Der Verlust von CD3-zeta in Tumorinfiltrierenden T-Zellen ist ein negativer Prognosemarker für das Kolonkarzinom. Chirurgisches Forum 2008; 37:5-7. Erster Preisträger des Fritz- Linder-Forumpreises

Assistenzarztstellen:

Innere Medizin	Hohenloher Krankenhaus GmbH, Öhringen, November 2005 bis März 2006
Pädiatrie	SLK-Klinikum Heilbronn, Klinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, März 2006 bis März 2009
Pädiatrie	St. Josefskrankenhaus Freiburg, Abteilung für Kinder- und Jugendmedizin St. Hedwig, seit März 2009