

# **TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

Chirurgische Klinik und Poliklinik  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Helmut Friess)

## **Die klinische Bedeutung des costimulatorischen Liganden B7-H3 (CD 276) beim Pankreaskarzinom**

Dennis Martin Hedderich

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. J. H. Kleeff
2. Univ.-Prof. Dr. F. R. Greten

Die Dissertation wurde am 05.01.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 24.10.2012 angenommen.

Meinen Eltern.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen .....	5
Einleitung.....	8
Das Pankreaskarzinom .....	8
Die Rolle costimulatorischer Signalwege in der T-Zell-Aktivierung.....	16
Der B7-1/B7-2 – CD28/CTLA-4-Signalweg .....	17
Der induzierbare Costimulator (ICOS) und sein Ligand (LICOS) .....	20
Der PD-1L/PD-1-Signalweg .....	21
Weitere costimulatorische und coinhibitorische Moleküle: B7-H4 und BTLA-4.....	23
B7-H3 .....	24
B7-H3 – ein Costimulator der T-Zell-Antwort.....	26
B7-H3 – ein Coinhibitor der T-Zell-Antwort .....	27
B7-H3 und Antitumorimmunität .....	28
Costimulation and Cancer – From bench to bedside .....	29
Problemstellung .....	33
Materialien und Methoden.....	34
Patientengut.....	34
Gewebeaufbereitung .....	35
Zellkultur.....	35
Quantitative Real-Time PCR .....	36
Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	36
Analyse .....	37
Immunhistochemie .....	39
Semiquantitative Analyse und Evaluation der B7-H3-Expression im Pankreaskarzinomgewebe und deren Korrelation mit dem postoperativen Überleben .....	42
Semiquantitative Analyse der Prävalenz von tumorinfiltrierenden CD4+- und CD8+-T-Zellen in Pankreaskarzinomgewebe und deren Korrelation mit der B7-H3-Expression.....	43
Die Induktion von B7-H3 in Pankreaskarzinomzelllinien.....	44
Durchflusszytometrie .....	44
Statistische Analyse .....	46
Ergebnisse .....	48
Die Expression von B7-H3 im Pankreaskarzinom des Menschen.....	48

Die Expression von B7-H3 korreliert mit besserem postoperativen Überleben der Pankreaskarzinompatienten .....	50
IFN- $\gamma$ ist im Pankreaskarzinom in vivo hochreguliert und korreliert signifikant mit der B7-H3-Expression im Tumor .....	52
Die Pankreaskarzinomzelllinien Panc-1, MiaPaCa-2 und SU86.86 exprimieren B7-H3 in vitro .....	54
IL-4 und INF- $\gamma$ können die B7-H3-Expression der Zelllinie SU86.86 hochregulieren .....	54
Die B7-H3-Expression korreliert mit der Anzahl der tumorinfiltrierenden CD8+-T-Zellen im Pankreaskarzinom .....	56
Diskussion .....	59
Schlussfolgerung.....	81
Zusammenfassung.....	82
Abstract .....	82
Literaturverzeichnis.....	83
Danksagung .....	86

## Abkürzungen

### A:

- (m)Ab: (monoclonal) Antibody
- AP-1: Activator protein 1
- APC: Antigen presenting cell

### B:

- BSA: Bovine serum albumine
- BTLA: B- and T-lymphocyte attenuator

### C:

- ccRCC: Clear cell renal cell carcinoma
- CD: Cluster of differentiation
- CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4

### D:

- (c)DNA: (complementary) Desoxyribonucleic acid
- DPC4: Deleted in pancreatic carcinoma locus 4

### E:

- EAE: Experimental autoimmune encephalomyelitis
- EGFR: Epidermal growth factor receptor

### F:

- FACS: Fluorescence activated cell sorting
- FAMMM: Familial atypical multiple mole melanoma
- FBS: Fetal bovine serum
- FITC: Fluoresceinisothiocyanat
- FOXP3: Forkhead box P3

### G:

- GM-CSF: Granulocyte monocyte colony stimulating factor
- GFP: Green fluorescent protein

### H:

- HCC: Hepatocellular carcinoma
- HPRT1: Hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transferase 1
- HNPCC: Hereditary non-polyposis colorectal cancer

I:

- ICOS(L): Inducible costimulator (ligand)
- IFN: Interferon
- Ig: Immunglobulin
- IL: Interleukin
- IPMN: Intraductal papillary mucinous neoplasia
- ITAM: Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
- ITIM: Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif

K:

- KO: Knock out

L:

- LPS: Lipopolysaccharid
- LKB1: Liver kinase B1

M:

- MD-CT: Multidetector Computertomographie
- MHC: Major histocompatibility complex
- MRCP: Magnetresonanzcholangiopankreatikographie
- MRT: Magnetresonanztomographie

N:

- NFAT: Nuclear factor of activated T-cells
- NFκB: Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells
- NK: Natural killer
- NP: Normal pancreas

P:

- PanIN: Pancreatic intraepithelial neoplasia
- PBS: Phosphate buffered saline
- PC: Pancreatic cancer
- (qRT)-PCR: (quantitative real time) Polymerase chain reaction
- PD-1: Programmed death 1
- PDAC: Pancreatic ductal adenocarcinoma
- PD-L1: Programmed death ligand 1

R:

- (m)RNA: (messenger) Ribonucleic acid

S:

- SD: Standard deviation
- STAT-3: Signal transducers and activators of transcription 3

- STK11: Serine-threonine kinase 11

T:

- Taq: *Thermus aquaticus*
- TBS: TRIS buffered saline
- TCR: T-cell receptor
- TGF- $\beta$ : Transforming growth factor  $\beta$
- Th1/2: T-helper cell 1/2
- TLR: Toll-like receptor
- TLT-2: TREM like transcript 2
- Tregs: regulatory T-cells
- TREM: Triggering receptor expressed on myeloid cells

U:

- UICC: Union internationale contre le cancer

V:

- VEGF: Vascular endothelial growth factor

## Einleitung

### Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom (PC) ist eine der aggressivsten Tumorerkrankungen des Menschen und stellt aktuell die vierthäufigste Todesursache durch Krebs in den Vereinigten Staaten von Amerika dar. Bei jährlich 42.470 Neuerkrankungen besteht ein nahezu ausgeglichenes Geschlechterverhältnis (Jemal et al., 2009). In Deutschland erkranken rund 13.000 Patienten pro Jahr an einem Pankreaskarzinom. Der Altersgipfel für Männer liegt bei 67, der für Frauen bei 74 Jahren (Seufferlein and Adler, 2009).

Bei resezierbaren Tumorstadien ( $T_1$ - $T_3$ ,  $N_0$ - $N_1$ ,  $M_0$ ) können durch eine chirurgische Resektion Fünf-Jahres-Überlebensraten von 20 bis 25 Prozent erreicht werden. Insgesamt überleben trotz intensiver Bemühungen auf dem Gebiet der Pankreasforschung und moderner Therapiekonzepte nur weniger als fünf Prozent aller am Pankreaskarzinom Erkrankten einen Zeitraum von fünf Jahren nach Diagnose (Jemal et al., 2009).

Einer der Hauptgründe hierfür ist die späte Diagnosestellung: Nur etwa sieben Prozent aller Pankreaskarzinome werden in einem lokal begrenzten Stadium diagnostiziert. In über der Hälfte aller Fälle befindet sich die Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose bereits in einem fortgeschrittenen Stadium und nur zehn Prozent aller Patienten kommen für eine chirurgische Resektion, den einzigen kurativen Therapieansatz, in Frage (Neoptolemos et al., 2004; Jemal et al., 2009).

Ätiologisch wird die familiäre von der sporadischen Form unterschieden. Anhand amerikanischer Studien konnte gezeigt werden, dass fünf bis zehn Prozent aller Patienten mit Pankreaskarzinom von einer positiven Familienanamnese mit einem ebenfalls an Bauchspeicheldrüsenkrebs erkrankten nahen Verwandten berichten können (Shi et al., 2009). In Deutschland hingegen wird lediglich von einem Anteil der familiären Form des Pankreaskarzinoms von ca. 3,5 Prozent ausgegangen (Bartsch et al., 2004).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch einige bereits bekannte genetische Syndrome, wie das Peutz-Jeghers-Syndrom, das hereditäre Mammakarzinom, die hereditäre chronische Pankreatitis, das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC) und das FAMMM-Syndrom (familial atypical multiple mole melanoma syndrome) mit einem erhöhten Risiko für das Pankreaskarzinom vergesellschaftet sind (Shi et al., 2009). Durch diese Syndrome lässt sich aber nur in einem Teil der Fälle das gehäufte Auftreten von Pankreaskrebs in einzelnen Familien erklären, weshalb nach weiteren Genen, die eine Prädisposition zur Entwicklung eines Pankreaskarzinoms bedingen können, geforscht werden muss (Shi et al., 2009).

Spezielle histologische Subtypen des Pankreaskarzinoms sind mit der familiären Form assoziiert. Deshalb kann neben der gründlichen Anamneseerhebung auch die histologische Untersuchung den Verdacht auf ein familiäres Pankreaskarzinom lenken (Shi et al., 2009).

Verwandte ersten Grades eines am Pankreaskarzinom Erkrankten weisen ein nahezu zweifach erhöhtes Risiko für Bauchspeicheldrüsenkrebs auf. Das Risiko ist sogar dreifach erhöht, wenn bei einem Verwandten ersten Grades ein

Pankreaskarzinom vor dem sechzigsten Lebensjahr diagnostiziert wurde (McWilliams et al., 2005).

Klinisch tritt das familiäre Pankreaskarzinom verglichen mit dem sporadischen in der Regel etwas früher auf und ist häufiger mit dem Rauchen von Zigaretten assoziiert (James et al., 2004). Als anamnestische Risikofaktoren für das Pankreaskarzinom gelten weiterhin die chronische Pankreatitis (Lowenfels et al., 1993) und der Diabetes mellitus (Huxley et al., 2005).

Risikosteigernde Lebensstilfaktoren sind Zigarettenrauchen (Fuchs et al., 1996), Adipositas und mangelnde körperliche Aktivität (Michaud et al., 2001). Weitere, die Ernährung betreffende Risikofaktoren konnten bisher nicht ausreichend belegt werden (Seufferlein and Adler, 2009).

Das duktales Pankreaskarzinom – welches auch dieser Studie zu Grunde lag – ist der weitaus häufigste Tumor der Bauchspeicheldrüse. Auf molekularer Ebene ist das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) das Karzinom mit der höchsten Rate an Mutationen des Onkogens K-ras. Außerdem können oft Veränderungen in den Tumorsuppressorgenen p16, p53 und DPC4 sowie mit wesentlich geringerer Häufigkeit Alterationen des TGF- $\beta$ -Rezeptor-II-Gens, des BRCA-2-Gens und des LKB1/STK11-Gens gefunden werden (Luttges and Kloppel, 2005).

Etwa 70 Prozent der Pankreaskarzinome sind im Pankreaskopf lokalisiert sind, wobei sie sich hier am häufigsten zwischen Gallen- und Pankreasgang befinden. Die übrigen Tumorlokalisationen betreffen Pankreaskörper und Pankreasschwanz. Durch die hochgradige desmoplastische Stromareaktion besitzt das PDAC typischerweise eine derbe Konsistenz (Luttges and Kloppel, 2005).

Mikroskopisch zeigt das duktale Adenokarzinom des Pankreas gangartige, adenoide Strukturen, die in desmoplastisches Stroma eingebettet sind. Die Tumoren wachsen häufig in das peripankreatische Fettgewebe ein und zeigen eine perineurale Invasion (Luttges and Kloppel, 2005).

Als Varianten des duktales Adenokarzinoms gelten das adenosquamöse, das undifferenziert pleomorphe und das gemischt duktal-endokrine Pankreaskarzinom (Luttges and Kloppel, 2005).

Bei der Differenzialdiagnose zu reaktiven Läsionen sowie zu anderen Neoplasien des Pankreas sind eine Reihe immunhistochemischer Färbungen wie z.B. die Darstellung der Glykoproteine MUC1 und MUC4 hilfreich. Diese Methode kann auch dabei helfen, schlecht differenzierte von gut differenzierten Karzinomen zu unterscheiden: Gut differenzierte zeigen ein apikales, membranöses Signal, während schlecht differenzierte Karzinome MUC1 und MUC4 auch zytoplasmatisch exprimieren (Luttges and Kloppel, 2005).

Für das PDAC wurden eine Reihe von nichtinvasiven Vorläuferläsionen identifiziert. Es handelt sich hierbei um die sogenannten pankreatischen intraepithelialen Neoplasien, abgekürzt PanINs (Luttges and Kloppel, 2005).

Ausgehend von der PanIN IA, die durch muzinöse Zellhypertrophie gekennzeichnet ist, nimmt man ein Tumorprogressionsmodell bis hin zur PanIN III an, welche bereits eine schwere duktale Dysplasie aufweist. Bei den Zwischenstufen PanIN IB und PanIN II lässt sich eine duktale, papilläre Hyperplasie bzw. eine flache und papilläre Hyperplasie mit Polaritätsverlust und Kernatypien nachweisen (Luttges and Kloppel, 2005).

Die PanIN III-Läsionen sind als Hochrisikoläsionen anzusehen, da sie zum Teil ähnliche Mutationen aufweisen wie das PDAC. Aus diesem Grund sollte bei einer R1-Resektion einer PanIN III-Läsion, d.h. bei positivem Resektionsrand, eine Nachresektion erfolgen (Luttges and Kloppel, 2005).

Wichtig ist die histologische Abgrenzung des duktales Adenokarzinoms zu den intraduktalen papillär-muzinösen Neoplasien, den IPMNs. Sie gehören zu den häufigsten zystischen Neoplasien des Pankreas und zeichnen sich durch eine im Vergleich niedrigere Malignität und bessere Prognose aus. (Kloppel et al., 2005) Obwohl jede potentiell karzinomverdächtige Raumforderung im Pankreas primär reseziert werden sollte, können IPMNs in Seitenästen des Pankreasgangs mit Zysten <3cm aufgrund der niedrigen Aggressivität primär beobachtet werden (Seufferlein and Adler, 2009).

Aktuell existiert kein valides Screeningverfahren für Tumoren des Pankreas. Die Bestimmung des Tumormarkers CA-19-9 ist erst nach Diagnose einer Raumforderung in der Bildgebung indiziert und kann dann zur Einschätzung von Therapieerfolg und Prognose hilfreich sein (Seufferlein and Adler, 2009).

In selteneren Fällen kann das Pankreaskarzinom auch durch einen atypischen, neu aufgetretenen Diabetes mellitus klinisch manifest werden. In einer aktuellen Studie wurden Patienten mit einem Alter über 50 Lebensjahren untersucht, die neu an Diabetes mellitus erkrankt waren. Es konnte gezeigt werden, dass ein Prozent dieser Patienten in den folgenden drei Jahren ein Pankreaskarzinom entwickelte (Chari et al., 2005).

Wie bereits erwähnt, besteht eines der Hauptprobleme beim Pankreaskarzinom darin, dass die Diagnose in der Regel erst sehr spät gestellt wird. Hierfür ist unter

anderem das Fehlen eindeutiger Frühsymptome verantwortlich. Insgesamt klagt die Mehrzahl der Patienten mit einem Pankreaskarzinom über unklare abdominelle oder im Rücken lokalisierte Schmerzen, Gewichtsverlust oder einen neu aufgetretenen Ikterus, der oft von Pruritus, acholischen Stühlen und dunklem Urin begleitet wird. Hierbei ist bemerkenswert, dass 80-85 Prozent der Patienten mit einem (lokal) fortgeschrittenen Erkrankungsstadium über Schmerzen berichten, während Patienten bei denen ein potentiell resektabler Tumor vorliegt, sich in der Hälfte der Fälle mit einem schmerzlosen Ikterus vorstellen (Kalser et al., 1985).

Diese Symptomkonstellationen lassen auch Rückschlüsse auf die Tumorlokalisation zu: Tumoren im Pankreaskörper und im Pankreasschwanz führen gewöhnlich zu Schmerzen und Gewichtsverlust. Patienten, die an einem Pankreaskopfkarzinom erkranken, entwickeln häufig einen Ikterus, was sich durch die anatomischen Gegebenheiten erklären lässt.

In der körperlichen Untersuchung zeigt sich beim Pankreaskopfkarzinom mit Ikterus klassischerweise das Courvoisier-Zeichen: eine prall gefüllte, schmerzlos tastbare Gallenblase (Freitas et al., 2009). Seltener klinische Zeichen wie ein positiver Virchow-Lymphknoten und pankreatische Pannikulitis sind mit einem fortgeschrittenen, metastasierten Krankheitsgeschehen assoziiert. Außerdem ist jede Thrombophlebitis ungeklärter Ursache, als mögliche Ausprägung eines Trousseau-Syndroms, verdächtig für ein zu Grunde liegendes Malignom (Freitas et al., 2009).

Einer der wichtigsten prognostischen Faktoren beim Pankreaskarzinom ist die frühe Diagnosestellung. Da derzeit keine verlässlichen Screeningverfahren existieren, sollte gemäß der aktuellen Leitlinien insbesondere bei neu aufgetretenen Oberbauch- oder Rückenschmerzen oder schmerzlosem Ikterus eine diagnostische Abklärung eingeleitet werden. Diese beinhaltet zunächst eine

Oberbauchsonographie. Bei Karzinomverdacht sollte als weiterführende Diagnostik entweder eine Multidetector-Computertomographie (MD-CT) mit biphasischem Kontrastmittelprotokoll oder eine Magnetresonanztomographie (MRT) mit Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie (MRCP) angeschlossen werden. Ein entscheidender Vorteil der MD-CT und MRT ist die Möglichkeit der Beurteilung der lokalen Tumorausdehnung und der potentiellen Infiltration von umgebenden Strukturen. Hierbei geht es vor allem um das Einwachsen des Tumors in umgebende Gefäße und um den Ausschluss von Fernmetastasen (Seufferlein and Adler, 2009).

Als nicht-resektabel gelten im Allgemeinen Tumoren, die den Truncus coeliacus oder die Arteria mesenterica superior bereits infiltriert haben. Bei einer Infiltration von Nachbarorganen und auch der Vena portae oder Vena mesenterica superior kann unter Umständen noch eine R0-Resektion erreicht werden.

Bei Karzinomverdacht sollten potentiell resektable Raumforderungen im Pankreas primär chirurgisch entfernt werden. Eine endosonographisch-gesteuerte Biopsie ist nur dann sinnvoll, wenn sich dadurch das therapeutische Vorgehen ändern könnte. Vor Beginn einer palliativen Therapie ist die Diagnosesicherung durch Biopsie obligat (Seufferlein and Adler, 2009).

Die primäre R0-Resektion ist bis heute der einzige kurative Therapieansatz und der wichtigste Prognosefaktor. Bei Patienten ohne Lymphknotenbefall konnten nach R0-Resektion Fünf-Jahres-Überlebensraten von über 30 Prozent erreicht werden (Wagner et al., 2004).

Für die korrekte Bestätigung der R0-Resektion ist eine genaue histologische Untersuchung des Absetzungsrandes unter Verwendung eines standardisierten Protokolls notwendig (Esposito et al., 2008).

Hinsichtlich der Komplikationen, der Letalität und der onkologischen Langzeitergebnisse sind die Pylorus-erhaltende und die klassische Duodenopankreatektomie (die sogenannte Operation nach Kausch-Whipple) vergleichbar. Nach Durchführung einer R0-Resektion, aber auch nach R1-Resektionen ist besonders bei Patienten in gutem Allgemeinzustand die Indikation zur adjuvanten bzw. additiven Chemotherapie mit Gemcitabin über sechs Monate gegeben. Adjuvante Radiochemotherapien werden aktuell nur im Rahmen von Studien durchgeführt (Seufferlein and Adler, 2009).

Liegt bereits ein metastasiertes Stadium vor, bringt die Resektion keine Verbesserung der Prognose. In diesem Fall sowie bei primär nicht resektablen Tumoren ist - unter Berücksichtigung des Allgemeinzustandes des Patienten - die Indikation zum sofortigen Beginn einer palliativen Therapie gegeben. Die Standardtherapie besteht aktuell aus Gemcitabin  $1000\text{mg}/\text{m}^2$  über 30min. Die unter dieser Therapie erreichten Ein-Jahres-Überlebensraten liegen bei 18-20 Prozent. Kombinationen von Chemotherapeutika sind in der Erstlinientherapie des metastasierten Pankreaskarzinoms im Allgemeinen nicht vorgesehen (Seufferlein and Adler, 2009).

Ein neuer Therapieansatz besteht in der zielgerichteten Inhibition der EGFR-Tyrosinkinase durch Erlotinib. In Kombination mit Gemcitabin konnte in der Gesamtpopulation ein um zwei Wochen verlängertes Überleben festgestellt werden, was per se keine klinische Relevanz hat. Allerdings konnten vor allem diejenigen Patienten von der Kombinationstherapie profitieren, die unter Therapie mit Erlotinib eine deutliche Hautreaktion entwickelten (Moore et al., 2007).

Versagt die Erstlinientherapie mit Gemcitabin, besteht bei gutem Allgemeinzustand des Patienten die Möglichkeit einer Zweitlinientherapie mit 5-FU/Oxaliplatin.

Die Radiochemotherapie wird beim nicht-kurativ operablen Pankreaskarzinom nicht empfohlen, birgt aber die Möglichkeit, bei initial fraglicher Resektabilität ein „Downstaging“ und in der Folge eventuell Resektabilität zu erreichen. Allgemein kann eine neoadjuvante Therapie beim Pankreaskarzinom aufgrund der unzureichenden Studienlage jedoch nicht empfohlen werden (Seufferlein and Adler, 2009).

### **Die Rolle costimulatorischer Signalwege in der T-Zell-Aktivierung**

Reife aber noch naive T-Lymphozyten wandern vom Thymus in periphere Lymphorgane wie die Milz oder die Lymphknoten. Dort erkennen T-Zellen über ihren TCR Antigene, die auf MHC-I/II-Komplexen präsentiert werden. Für eine optimale T-Zell-Aktivierung wird jedoch neben dem ersten Antigenkontakt ein zweites, sogenanntes costimulatorisches Signal benötigt. Diese „Zwei-Signal-Theorie“ wurde bereits 1970 von Bretscher und Cohn formuliert. Sie postulierten, dass durch diesen zweiten Signalweg eine feinere Differenzierung von körpereigenen von körperfremden Antigenen vorgenommen werden kann (Bretscher and Cohn, 1970; Sharpe and Freeman, 2002).

Das Fehlen dieses zweiten, costimulatorischen Signals führt dazu, dass keine effektive T-Zell-Antwort zustande kommt und die T-Zellen in den Zustand der „Anergie“ übergehen (Sharpe, 2009). Weiterführende Untersuchungen zeigten jedoch, dass die oben genannte „Zwei-Signal-Theorie“ die Wirklichkeit zu vereinfacht darstellt: Zum einen spielt auch die Stärke des Signals am TCR (= „Signal 1“) eine Rolle und kann bei ausreichender Bindungsstärke auch ohne costimulatorisches „zweites“ Signal zu einer T-Zell-Aktivität führen. Zum anderen wurden neben

costimulatorischen auch coinhibitorische Signalwege identifiziert, die hemmende Signale an die T-Zellen weitergeben. Die Balance zwischen diesen stimulatorischen und inhibitorischen Einflüssen scheint essentiell für eine effektive Immunantwort zu sein (Sharpe and Freeman, 2002).

### **Der B7-1/B7-2 – CD28/CTLA-4-Signalweg**

Der B7-1/B7-2 – CD28/CTLA-4-Signalweg ist der am besten charakterisierte costimulatorische/coinhibitorische Signalweg und hat der CD28-B7-Superfamilie, in der eine Reihe costimulatorischer Moleküle zusammengefasst sind, ihren Namen gegeben. In letzter Zeit wurden eine Reihe weiterer B7-Homologe – darunter auch das B7-Homolog 3 („B7-H3“), das Gegenstand dieser Arbeit ist – entdeckt (Sharpe and Freeman, 2002).

Der B7-1/B7-2 – CD28/CTLA-4-Signalweg besteht aus zwei Mitgliedern der B7-Familie: B7-1 (=CD80) und B7-2 (=CD86), die sowohl an den stimulatorischen Rezeptor CD28 als auch an den inhibitorischen Rezeptor CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) spezifisch binden können. CD28 und CTLA-4 sind Mitglieder der CD28-Superfamilie, die sich in ihrer Bindungsaffinität zu B7-1 und B7-2 unterscheiden: B7-1 und B7-2 binden mit 500- bis 2500-fach höherer Affinität an CTLA-4. Außerdem weisen sie unterschiedliche Expressionsmuster auf: CD28 wird konstitutiv auf T-Zellen exprimiert, wobei die CTLA-4-Expression nach erfolgter T-Zell-Aktivierung schnell hochreguliert wird (Sharpe and Freeman, 2002; Wolchok and Saenger, 2008).

Auf den meisten antigenpräsentierenden Zellen konnte eine geringe konstitutive Expression von B7-2 nachgewiesen werden, die allerdings nach Aktivierung schnell hochreguliert wird. Im Gegensatz dazu ist die Expression von B7-1 nicht konstitutiv, sondern nur induzierbar. Aufgrund der - im Ablauf der T-Zell-Aktivierung - früheren Expression vermutet man, dass B7-2 die bedeutenderen costimulatorischen Signale für den Beginn der T-Zell-Antwort liefert (Sharpe and Freeman, 2002). Bestätigt wurde dies durch Untersuchungen am Mausmodell. Transfiziertes B7-2 war in der Lage die Immunogenität von Melanomzelllinien in größerem Ausmaße zu steigern als B7-1 (Martin-Fontecha et al., 1996). Für B7-1 und B7-2 werden weitgehend überlappende Funktionen beschrieben. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass B7-1 vor allem zur T-Zell-Differenzierung hin zu Th1-Zellen führt, während B7-2 die IL-4-Produktion und generell Th2-Zell-Antworten fördert (Bhatia et al., 2006).

Wie bereits erwähnt, stellt die Interaktion von B7-1 und B7-2 mit CD28 ein positives Signal für die T-Zell-Aktivierung dar: Die Schwelle für das zur T-Zell-Aktivierung benötigte TCR-Signal sinkt. Bei Ausbleiben einer Bindung am TCR konnte jedoch keine weitere physiologische Funktion von CD28 nachgewiesen werden. Im Einzelnen stimuliert CD28 das Überleben der T-Zellen und die Produktion von IL-2, wodurch die klonale Expansion und die T-Zell-Differenzierung gefördert werden (Sharpe and Freeman, 2002).

Die Bindung von CTLA-4 stellt ein negatives Signal dar, indem es die TCR- und CD28-vermittelte Signaltransduktion inhibiert. CTLA-4 inhibiert außerdem die Produktion von IL-2 sowie die Progression durch den Zell-Zyklus und kann so die T-Zell-Antwort terminieren (Sharpe and Freeman, 2002). Die antagonistischen Rollen von CTLA-4 und CD28 sind für ein ordentlich funktionierendes Immunsystem essenziell, und sie entscheiden darüber ob eine T-Zelle aktiviert oder anergisch wird.

Präklinische Studien haben gezeigt, dass in CTLA-4-Knockout-Mäusen das fehlende Gegengewicht zur CD28-vermittelten T-Zell-Aktivierung zu schweren lymphoproliferativen Erkrankungen mit massiven Infiltraten von Lymphozyten in verschiedenen Organen und zum Tode der Versuchstiere im Alter von 3-4 Wochen führt. Diese Beobachtung unterstreicht die Bedeutung von CTLA-4 für die Abschwächung autoreaktiver und potentiell schädlicher peripherer T-Zell-Aktivierung. Außerdem haben weitere präklinische Studien gezeigt, dass, während die Blockade von CD28 eine Abschwächung der Antitumorimmunantwort zur Folge hat, CTLA-4-Blockade zu einer verstärkten Antitumorantwort führt (Wolchok and Saenger, 2008). Insgesamt konnten dank der Entwicklung monoklonaler Antikörper für CTLA-4 wichtige Erkenntnisse über dessen Funktion gewonnen und im Wesentlichen zwei Hypothesen zur CTLA-4-vermittelten Regulierung der T-Zell-Antwort entwickelt werden. Einerseits wird davon ausgegangen, dass CTLA-4 eine Schwelle definiert, die über dem „Hintergrundrauschen“ zufälliger TCR-Bindungen und TCR-Aktivierungen liegt. Andererseits kann CTLA-4 nach Initiierung einer Immunantwort die Möglichkeit zur Proliferation aktivierter T-Zellen abschwächen. Diese beiden Modelle schließen sich natürlich nicht aus und können auch – abhängig von der Stärke des TCR-Signals – beide wirksam werden (Wolchok and Saenger, 2008). Desweiteren wurde postuliert, dass CTLA-4 nicht nur die körpereigene Reaktion auf Autoantigene reguliert, sondern auch zu einer Diversifizierung der T-Zell-Population während einer Immunantwort führt. Diese These wird von der Beobachtung gestützt, dass CTLA-4 tendenziell eher die initial starken TCR-Bindungen abschwächt (Wolchok and Saenger, 2008).

## Der induzierbare Costimulator (ICOS) und sein Ligand (LICOS)

Wie der Name bereits nahelegt, wird das CD28-Homolog ICOS nicht konstitutiv auf naiven T-Zellen exprimiert, sondern seine Expression auf aktivierten CD4+- und CD8+-T-Zellen induziert. TCR- und CD28-vermittelte Signalwege stimulieren die ICOS-Expression, wohingegen ein Ausbleiben der Bindung von B7-1 oder B7-2 an CD28 sich negativ auf die Hochregulierung der ICOS-Expression auswirkt. Zu Beginn der Differenzierungsphase von T-Helferzellen (Th1- und Th2-Zellen) ist ICOS stark exprimiert. Im weiteren Verlauf der Differenzierung bleibt das Expressionslevel allerdings nur auf Th2-Zellen hoch, während es auf Th1-Zellen wieder absinkt. Die Hypothese, dass ICOS auch bei der Unterstützung von B-Zellen durch T-Helferzellen eine Rolle spielt, konnte durch funktionelle Studien bestätigt werden. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass IL-12 und IL-23, also Zytokine, die die Th1-Antwort begünstigen, die Expression von ICOS auf T-Helferzellen steigern und dass ICOS auch auf aktivierten NK-Zellen induziert wird (Greenwald et al., 2005).

ICOSL mRNA wird konstitutiv in lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben transkribiert. Als Oberflächenprotein konnte der ICOS-Ligand auf einer Reihe von Zelltypen gefunden werden, unter anderem auf B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen. Die Stimuli, die die Expression von ICOSL regulieren sind teilweise noch unklar. Es konnte eine Hochregulation von ICOSL mit Hilfe von IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden, wobei man davon ausgeht, dass die ICOSL-Expression im peripheren Gewebe von inflammatorischen Zytokinen gesteuert wird.

Funktionell gesehen, haben ICOS und CD28 sowohl unterschiedliche als auch überlappende Eigenschaften. Wie CD28 verstärkt ICOS die T-Zell-Differenzierung und Zytokinproduktion. ICOS kann mit Ausnahme von IL-2 die Produktion von Th1-

und Th2-spezifischen Zytokinen – sowohl in der Primingphase als auch während der Effektorphase – anregen. Die Stimulation der IL-10-Produktion wird als möglicher Mechanismus diskutiert, über den ICOS regulatorische T-Zellen („Tregs“) und somit T-Zell-Toleranz und Autoimmungeschehen beeinflussen kann.

Es konnte auch nachgewiesen werden, dass ICOS über die Wechselwirkung mit T-Helferzellen eine wichtige Rolle bei der B-Zell-Differenzierung, dem Immunglobulinklassen-Switching, der Formation von Keimzentren und der Entwicklung von B-Gedächtniszellen spielt. Dies konnte nicht nur an ICOS und ICOSL-Knockout-Mäusen nachgewiesen werden. Bei vier Patienten konnte ein Adult-Onset-Common-Variable-Immunodeficiency-Syndrom durch den homozygoten Verlust von ICOS erklärt werden (Greenwald et al., 2005).

### **Der PD-1L/PD-1-Signalweg**

Das Molekül PD-1 („programmed death-1“) ist ein weiteres Mitglied der CD28-Superfamilie. Es bildet jedoch im Gegensatz zu CD28 und CTLA-4 keine Homodimerstruktur aus. PD-1 ist während der T-Zellreifung im Thymus auf doppelt negativen (CD4-CD8-) T-Zellen und  $\gamma\delta$ -Thymozyten exprimiert und auf peripheren CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, B-Zellen sowie Monozyten durch Zellaktivierung induzierbar. Auch NK-Zellen exprimieren PD-1 in geringem Maße. PD-1 weist also ein breiteres Expressionsmuster auf als andere Mitglieder der CD28-Familie, die im Wesentlichen auf T-Zellen vorkommen.

Als Liganden für PD-1 konnten die beiden Moleküle PD-L1 (programmed death-1 ligand 1; B7-H1) und PD-L2 (programmed death-1 ligand 2; B7-DC) identifiziert

werden, wobei PD-L2 mit zwei- bis sechsfach höherer Affinität als PD-L1 an PD-1 bindet.

PD-L1 ist in sehr vielen Geweben exprimiert: Neben aktivierten T- und B-Zellen, myeloischen und dendritischen Zellen konnte die Expression auch auf mikrovaskulären Endothelzellen und nicht-lymphatischen Organen wie Herz, Lunge, Pankreas, Muskel und Plazenta nachgewiesen werden. Ob die Expression von PD-L1 auf CD4+CD25+-Tregs einen Einfluss auf die Funktion dieser regulatorischen T-Zell-Population hat, ist nicht abschließend geklärt. Aufgrund der breiten Expression auch in nicht-lymphatischen Organen wird vermutet, dass PD-L1 autoreaktive B- und T-Zellen in der Peripherie oder Entzündungsreaktionen in den Zielorganen beeinflussen kann (Sharpe and Freeman, 2002).

Die immuninhibitorischen Effekte der Interaktion von PD-1 mit PD-L1 gelten mittlerweile als gesichert. Sie führen zu Zellarrest in der G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>-Phase und können so ein starkes B7-CD28-Signal antagonisieren, wenn nur eine schwache Antigenstimulation vorliegt. In einzelnen wenigen Arbeiten konnten jedoch auch Hinweise für costimulatorische Eigenschaften von PD-L1 und PD-L2 gefunden werden, sodass die Rolle dieser beiden Moleküle der B7-Familie nicht als endgültig geklärt gelten kann (Sharpe and Freeman, 2002).

Zusammenfassend lässt sich dem PD-L1/PD-L2:PD-1 Signalweg wohl eine bedeutende Rolle in der Regulation von T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Toleranz zuschreiben. PD-1 hat hierbei wichtige inhibitorische Funktionen, die denen von CTLA-4 durchaus ähnlich sind. CTLA-4 wirkt allerdings vor allem im Lymphgewebe, während PD-1 bei der Regulation von Entzündungsprozessen in peripheren Geweben von Bedeutung ist. PD-1 und PD-L1 können die CD8+ T-Zell-Antwort inhibieren, was zum Beispiel für maligne Tumoren einen Weg darstellt, der

Überwachung durch das Immunsystem des Organismus zu entgehen (Greenwald et al., 2005).

## **Weitere costimulatorische und coinhibitorische Moleküle: B7-H4 und**

### **BTLA-4**

B7-H4 ist das jüngste Mitglied der B7-Familie und ein negativer Regulator der T-Zell-Antwort. Es besitzt sowohl im lymphoiden wie auch im nicht-lymphoiden Gewebe ein breites Expressionsmuster auf mRNA-Ebene, jedoch nicht auf Protein-Ebene. B7-H4-Protein-Expression konnte allerdings in Lungen- und Ovarialtumoren sowie in einer Reihe von Krebszelllinien nachgewiesen werden. B7-H4 bindet an einen bisher unbekanntem Rezeptor, der sich jedoch von CTLA-4, ICOS, PD-1 und dem Rezeptor für B7-H3 unterscheidet und vermittelt so ein Signal, das die TCR-vermittelte Proliferation von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die Progression durch den Zellzyklus und die Produktion von IL-2 inhibiert. Diese Funktionen sowie die (induzierbare) Expression im peripheren Gewebe und in Tumorgewebe legen wichtige Aufgaben im Bereich der Regulierung der T-Zell-Toleranz sowie der Antitumorimmunität nahe (Greenwald et al., 2005).

Das monomere BTLA-4 gehört zur CD28-Familie und ist funktionell CTLA-4 und PD-1 ähnlich. Es ist ausschließlich auf Lymphozyten exprimiert und übt inhibitorische Effekte sowohl auf B- als auch auf T-Lymphozyten aus (Greenwald et al., 2005).

## B7-H3

Das Molekül B7-H3 (CD 276) wurde erstmals im Jahre 2001 von Chapoval et al. als Homolog der B7-Familie beschrieben. Es handelt sich hierbei um ein Typ-I-Transmembranprotein, das zu den anderen Mitgliedern der B7-Familie eine Homologie von 20-27 Prozent in der Aminosäuren-Sequenz aufweist. Entgegen dieser eher geringen Gemeinsamkeiten in der Primärstruktur sind die daraus abgeleitete Sekundär- und Tertiärstruktur den anderen B7-Molekülen in hohem Maße ähnlich. Während das in Mäusen exprimierte B7-H3 nur eine IgV-IgC-Domäne besitzt, kommt beim Menschen auch das sogenannte 4Ig-B7-H3 vor. 4Ig-B7-H3 enthält eine – wahrscheinlich durch Exon-Duplikation entstandene – Tandem-Duplikation der IgV-IgC-Domäne (Chapoval et al., 2001).

B7-H3-mRNA besitzt ein breites Expressionsmuster in gesundem Gewebe, wohingegen die Expression auf Proteinebene eher selten ist, was das Vorhandensein einer strikten, posttranskriptionalen Kontrolle vermuten lässt. Nichtsdestotrotz konnte B7-H3 als Protein, wenn auch in geringer Menge, in folgenden Geweben des Menschen identifiziert werden: Leber-, Lungen-, Blasen-, Hoden-, Prostata-, Brust-, Plazenta- und Lymphgewebe. Die Expression von B7-H3 konnte auf T-Zellen, NK-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen und Makrophagen) induziert werden. B7-H3 kann während der Reifung von Monozyten zu dendritischen Zellen oder während der Interaktion von dendritischen Zellen mit T-Zellen hochreguliert werden. B7-H3 kann aber nicht nur auf Immunzellen gefunden werden: Es wird von Fibroblasten, fibroblastenähnlichen Synoviozyten und Epithelzellen exprimiert. Wahrscheinlich spielt es daher auch eine Rolle bei Wachstum und Entwicklung von nicht-hämatopoetischem Gewebe. Während der

Embryogenese findet sich ein hohes Expressionsniveau von B7-H3 in sich entwickelnden Knochen, wobei seine Expression bei der Differenzierung von Osteoblasten-Vorläuferzellen zu Osteoblasten am höchsten ist (Yi and Chen, 2009).

Im Jahre 2008 wurde von Hashiguchi et al. erstmals ein Rezeptor für B7-H3 beschrieben. Das sogenannte TREM like transcript 2 (TLT-2) gehört zur Triggering receptor expressed on myeloid cells Rezeptorfamilie, deren Mitglieder sowohl im angeborenen als auch im erworbenen Immunsystem eine Rolle spielen. Bei TLT-2 handelt es sich ebenfalls um ein Typ-I-Transmembranprotein, das konstitutiv von CD8+-T-Zellen exprimiert wird und auf aktivierten CD4+-T-Zellen induzierbar ist (Hashiguchi et al., 2008).

Um funktionelle Experimente im Mausmodell zu beurteilen, ist es interessant zu wissen, dass humanes und murines TLT-2 eine Homologie von 60 Prozent und deren Ig-Domänen eine Ähnlichkeit von 80 Prozent aufweisen. Der zytoplasmatische Teil des humanen TLT-2 besitzt zwei Tyrosinreste, die als Motive für Endozytose des Rezeptors oder für die Rekrutierung und Aktivierung von STAT-3 (signal transducers and activators of transcription 3) dienen können. Hier besteht ein wesentlicher Unterschied zum murinen TLT-2, in dem keines dieser beiden Motive konserviert ist. TLT-2 besitzt weder ein ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) noch ein ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) (Yi and Chen, 2009).

Nach dieser kurzen Beschreibung der biochemischen Eigenschaften von B7-H3 und seines Rezeptors wird im Folgenden auf die aktuelle Datenlage bezüglich funktioneller Untersuchungen zu B7-H3 eingegangen.

## B7-H3 – ein Costimulator der T-Zell-Antwort

In-vitro-Studien belegen die costimulatorischen Eigenschaften von B7-H3. In Anwesenheit von Anti-CD3-Antikörpern, die das TCR-Signal imitieren, kann B7-H3-Fusionsprotein die Proliferation von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen sowie die Produktion von IFN- $\gamma$  steigern. Mithilfe von anti-sense B7-H3-Oligonukleotiden lässt sich die Expression auf dendritischen Zellen und die IFN- $\gamma$ -Produktion von aktivierten T-Zellen verringern. Außerdem kann die Transfektion von B7-H3 in Tumorzellen die Proliferation und IFN- $\gamma$ -Produktion von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen steigern und so der Beitrag von B7-H3 zur Costimulation von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nachvollzogen werden (Yi and Chen, 2009).

Diese Funktionen sind mit dem als costimulatorisch beschriebenen B7-H3-Rezeptor TL2 in Einklang zu bringen. TL2-Signaltransduktion in T-Zellen nach Bindung von B7-H3 hatte eine erhöhte Produktion von IL-2 und IFN- $\gamma$  zur Folge (Hashiguchi et al., 2008).

Auch im Mausmodell konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass B7-H3 als Costimulator von T-Zellen wirkt. Es wurden Abstoßungsreaktionen in experimentellen, allogenen Herz- und Inselzell-Transplantaten unter Behandlung mit Rapamycin bei Wildtyp- und B7-H3-Knockout-Mäusen verglichen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass B7-H3 eine Rolle bei der akuten und chronischen Abstoßungsreaktion allogener Transplantate spielt und unterstreichen die Funktion von B7-H3 als Costimulator von T-Zellen (Yi and Chen, 2009).

## B7-H3 – ein Coinhibitor der T-Zell-Antwort

Entgegen der initialen Beschreibung durch Chapoval et al. von B7-H3 als Costimulator gibt es Daten, die nahelegen, dass B7-H3 auch als Coinhibitor der T-Zell-Antwort wirkt. Es wurde beschrieben, dass rekombinante murine und humane B7-H3-Antikörper – nach TCR-Bindung durch monoklonale Anti-CD3-Antikörper – nicht nur die T-Zell-Proliferation sondern auch die Zytokinproduktion und die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NFAT, NF- $\kappa$ B und AP-1 inhibieren.

Zudem konnte in B7-H3-Knockout-Mäusen ein vermehrtes Auftreten von Th1-Zell-vermittelten Hypersensitivitätsreaktionen und ein früheres Auftreten von experimenteller Autoimmunenzephalitis beobachtet werden (Suh et al., 2003; Prasad et al., 2004). Interessant ist die Beziehung von B7-H3 zu CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen (Tregs). Tregs scheinen die Expression von B7-H3 auf dendritischen Zellen induzieren zu können. Blockt man dieses B7-H3 mithilfe eines Antikörpers, führt dies wiederum zu einer gesteigerten CD4+-T-Zell-Proliferation innerhalb einer gemischt-lymphozytären Reaktion (Mahnke et al., 2007).

Es gibt also auch Ergebnisse, die B7-H3 als coinhibitorisches Molekül erscheinen lassen. Wie diese Hinweise einzuordnen sind, ist bis dato nicht geklärt. Es ist nicht bekannt, ob diese Effekte durch TLT-2 vermittelt sind und ob nicht eventuell die verwendeten „blockierenden“ Antikörper doch eine intrinsische Teilaktivität besitzen. Auch über die Existenz eines weiteren, bisher unentdeckten Rezeptors, der die immuninhibitorischen Eigenschaften von B7-H3 vermittelt, lässt sich spekulieren (Yi and Chen, 2009).

## B7-H3 und Antitumorimmunität

Ein möglicher Anwendungsbereich für B7-H3 als Mitglied der B7-Familie – sei es als prognostischer Marker oder als Angriffspunkt für Therapieansätze – ist die Behandlung von Krebserkrankungen. Obwohl die Entdeckung von B7-H3 noch nicht lange zurück liegt, existierten bereits eine Reihe von Studien über B7-H3 im Zusammenhang mit Krebserkrankungen.

Im Mausmodell konnten überzeugende funktionelle Daten generiert werden, die darauf hindeuten, dass eine hohe B7-H3-Expression die körpereigene Immunreaktion gegen das Tumorgewebe verbessern kann. Bei hoher B7-H3-Expression konnten eine gesteigerte Immunogenität der Tumorzellen, eine verringerte sekundäre Metastasierungsrate der Tumoren und in Kombination mit Chemotherapeutika sogar die komplette Eradikation von Karzinomen nachgewiesen werden (Luo et al., 2004; Ma et al., 2007; Yi and Chen, 2009).

B7-H3 konnte nicht nur in Tumorzelllinien in vitro gefunden werden sondern ist auch in einer Reihe von Tumorentitäten des Menschen in vivo nachgewiesen worden. Hierzu gehören das Prostata-, Magen-, Ovarial-, Nierenzell- und das Urothelkarzinom sowie das Neuroblastom und das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom. Die Expression von B7-H3 durch maligne Tumoren scheint also ein recht verbreitetes Phänomen zu sein (Yi and Chen, 2009).

In retrospektiven Studien, die den dokumentierten Krankheitsverlauf in Abhängigkeit von der B7-H3-Expression untersuchten, korrelierte in einer Studie die erhöhte Expression von B7-H3 mit längeren Überlebenszeiten von Magenkarzinom-Patienten (Wu et al., 2006). Ein Ergebnis, das zwar von den funktionellen Untersuchungen im

Mausmodell gestützt wird, jedoch nicht in weiteren Studien bei anderen Krebsentitäten des Menschen bestätigt werden konnte. Bei Patienten mit Nierenzellkarzinom zeigte sich ein positiver Zusammenhang zwischen einer hohen B7-H3-Expression im Tumor oder den intratumoralen Gefäßen und einer erhöhten Wahrscheinlichkeit am Nierenzellkarzinom zu versterben. Ebenso konnte in der Mehrheit der Prostatakarzinome eine deutlich erhöhte B7-H3-Expression gefunden werden, was statistisch signifikant mit einer schlechten Prognose korrelierte (Roth et al., 2007; Crispen et al., 2008). Inwiefern diese auf den ersten Blick widersprüchlichen Ergebnisse in Einklang zu bringen sind, wird im Diskussionsteil dieser Arbeit ausführlicher besprochen werden.

### **Costimulation and Cancer – From bench to bedside**

Die immunologische Forschung konnte bereits gute Erfolge verzeichnen und hat auch schon Therapieansätze unter Ausnutzung des Prinzips der Costimulation bzw. der Coinhibition hervorgebracht.

Tumorzellen können durchaus in der Lage sein T-Zellen antigenspezifische Signale zu vermitteln. Nach der „Zwei-Signal-Theorie“ kann allerdings die Initiation einer Immunantwort ausbleiben, da die Expression von B7-1 und B7-2 weitgehend auf antigenpräsentierende Zellen beschränkt und nur bei wenigen Tumorarten zu finden ist. Die Überlegung, dass eine erhöhte Expression von B7-1 durch Tumorzellen zu einer verbesserten Antitumorimmunantwort führen müsste, konnte im Experiment bestätigt werden. Bei Untersuchungen mit transplantablen, murinen Melanomzellen konnte nach B7-1-Transfektion eine CD8+-T-Zell-vermittelte Tumorabstoßung im

Mausmodell nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass nach vorangegangener Tumoreradikation eine Immunität gegen Wildtyp-Melanomzellen bestand, lässt auf die Entwicklung einer systemischen Immunität und auf das Vorhandensein von Gedächtniszellen schließen (Zang and Allison, 2007).

Es konnte somit nachgewiesen werden, dass B7-1 und B7-2 in gleichem Maße dazu in der Lage sind, die Immunantwort gegen Tumoren zu verbessern. Es wurde allerdings auch deutlich, dass die Expression von B7-1 und B7-2 alleine nicht ausreichend war um Immunreaktionen gegen nur schwach antigene Tumorzellen zu induzieren (Zang and Allison, 2007).

Drei klinische Phase-1-Studien wurden durchgeführt um den therapeutischen Effekt von Impfungen mit B7-1-transfizierten Tumorzellen zu untersuchen. Es konnten vereinzelt gute Ergebnisse bei Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom und nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom beobachtet werden (Zang and Allison, 2007).

Allerdings steckt die klinische Erprobung dieses Therapieansatzes noch sicherlich in den Kinderschuhen und man sollte auch nicht aus den Augen verlieren, dass B7-1 und B7-2 ebenfalls und noch mit höherer Affinität an CTLA-4 binden können, was zu einer Abschwächung der T-Zell-Antwort führen müsste (Zang and Allison, 2007).

Ein weiterer logischer Ansatz zum Einsatz costimulatorischer Regelwerke in der Krebstherapie ist, die durch CTLA-4 vermittelte Inhibition der T-Zell-Antwort via B7-1 und B7-2 zu blockieren. Schon vor über zehn Jahren konnte dieses Prinzip am Beispiel des Kolonkarzinoms im Mausmodell nachvollzogen werden: CTLA-4-Blockade konnte die initial schwache, vom Tumor hervorgerufene Immunantwort so verstärken, dass es zur Tumorabstoßung kam. Desweiteren kam es zu einer

langandauernden Immunität gegenüber einer Zweitexposition mit Tumorzellen ohne begleitende Therapie (Leach et al., 1996).

Basierend auf diesen Resultaten wurden bereits klinische Studien in Phase I und II mit humanen Anti-CTLA-4-Antikörpern durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Anti-CTLA-4-Monotherapie in der Lage ist, ein teilweises oder auch komplettes Ansprechen des Tumors bei Patienten mit Melanomen, Prostata- und Nierenzellkarzinom sowie Non-Hodgkin-Lymphomen hervorzurufen. Man ist der Annahme, dass die Anti-CTLA-4-Therapie die Antitumorantwort initiieren und verstärken kann. Gegen die Hypothese, dass die Anti-CTLA-4-Therapie seine die Immunantwort verstärkende Wirkung über regulatorische T-Zellen entfaltet, spricht, dass im Mausmodell keine Depletion der Treg-Population unter Anti-CTLA-4-Therapie beobachtet werden konnte (Zang and Allison, 2007).

Um eine Anti-CTLA-4-Therapie auch bei Tumoren mit nur geringer Immunogenität wirksam werden zu lassen, werden aktuell verschiedene Kombinationstherapien erprobt. Besonders vielversprechend ist der zusätzliche Einsatz einer Impfung mit bestrahlten Tumorzellen, in die GM-CSF (=granulocyte monocyte colony-stimulating factor) transfiziert wurde. Hierbei konnte ein dichtes, von Granulozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen beherrschtes Immuninfiltrat beobachtet werden, von dem man sich ein besonders effektives Cross-Priming der T-Zellen verspricht (Zang and Allison, 2007).

Ein dritter costimulatorischer Signalweg, der neue Möglichkeiten in der Krebstherapie bieten kann, ist der PD-L1/PD-1-Weg. Eine Reihe von Tumorentitäten des Menschen weisen ein aberrantes Expressionsmuster von PD-L1 auf. Außerdem konnte in Studien beobachtet werden, dass diese Überexpression von PD-L1 mit einer wesentlich schlechteren Prognose und kürzerem Überleben der Krebspatienten

einhergeht. Die These, dass der PD-L1/PD-1-Signalweg für Tumoren eine Möglichkeit darstellt, der Überwachung durch das Immunsystem zu entgehen, wird durch die Feststellung gestützt, dass die PD-L1-Expression im Tumor invers mit der Zahl der tumorinfiltrierenden CD8+- Zellen korreliert (Loos et al., 2008).

Auch wenn noch nicht geklärt ist, über welche intrazellulären Mediatoren die Expression von PD-L1 reguliert wird und inwiefern die PD-L1-Expression die Tumorprogression direkt beeinflusst, kann festgehalten werden, dass PD-L1 auf Tumorzellen die gegen den Tumor gerichtete Immunantwort inhibiert. Schon aus diesem Grund stellt der PD-L1/PD-1-Signalweg ein sehr attraktives Ziel für die Antitumorimmuntherapie dar (Loos et al., 2008).

Bei Untersuchungen von Tumoren im Mausmodell konnten nach Blockade von PD-L1 bereits interessante Ergebnisse erzielt werden, sodass die erste klinische Erprobung des PD-L1/PD-1-Signalwegs in naher Zukunft erwartet wird. Hierbei wird aufgrund des extrem breiten Expressionsmusters von PD-L1 auch im Normalgewebe besonders sorgfältig auf das Auftreten von Autoimmunphänomenen geachtet werden müssen (Zang and Allison, 2007).

## Problemstellung

Das Pankreaskarzinom ist eine der Krebsentitäten des Menschen mit der schlechtesten Prognose und stellt eine große therapeutische Herausforderung dar. Die chirurgische Resektion ist bis heute der einzige kurative Therapieansatz. Unter den neuen Therapiemodellen ist vor allem die Idee, Krebserkrankungen durch Immunmodulation zu therapieren sehr vielversprechend. Um erste interessante Ergebnisse aus diesem Bereich fort zu führen, ist es von entscheidender Bedeutung, die der Costimulation zugrunde liegenden Mechanismen besser und umfassender zu verstehen. Ziel dieser Arbeit ist es, die Expression des costimulatorischen Moleküls B7-H3 im Pankreaskarzinom zu beschreiben und mögliche Korrelationen zu klinischen Parametern wie dem postoperativen Überleben zu untersuchen.

## Materialien und Methoden

### Patientengut

Alle in dieser Studie untersuchten Gewebe wurden gemäß anerkannter und bewährter Richtlinien gesammelt und aufbereitet. Die Pankreaskarzinomgewebeproben stammen von insgesamt 96 Patienten, die sich auf Grund eines diagnostizierten Pankreaskarzinoms in der Chirurgischen Klinik der Universität Heidelberg einer Pankreasresektion unterzogen. Die Diagnose des duktales Adenokarzinoms des Pankreas wurde durch das Institut für Pathologie der Technischen Universität München gesichert. Bei den Patienten wurde eine ärztliche Aufklärung zur Studie durchgeführt und es wurde dazu eine schriftliche Zustimmung erhalten.

Es handelt sich um 39 weibliche und 57 männliche Patienten im Alter von 38-83 Jahren mit einem medianen Alter von 63 Jahren (siehe Tab.1).

Nach der UICC-Klassifikation des Pankreaskarzinoms (6. Ausgabe, 2002) befanden sich zwei Patienten in Stadium IB, elf Patienten in Stadium IIA, 70 Patienten in Stadium IIB, zwei Patienten in Stadium III und elf Patienten in Stadium IV.

Mit einer Spanne von zwei bis 44 Monaten betrug das mittlere Follow-up 23 Monate.

Die Proben des normalen Pankreasgewebes stammen von zehn vormals gesunden Organspendern, für die kein passender Empfänger gefunden werden konnte. Es handelt sich um vier Frauen und sechs Männer im Alter von 17-62 Jahren mit einem medianen Alter von 43 Jahren.

## Gewebeaufbereitung

Die untersuchten Gewebeproben wurden unmittelbar nach der chirurgischen Resektion aufbereitet. Ein Teil wurde zum Zwecke der RNA- und Proteinextraktion in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der andere Teil wurde für 24 Stunden in Formalin eingelegt und danach bis zur Einbettung in Paraffinblöcke in Ethanol 70% zwischengelagert. Zur histologischen Untersuchung und Diagnosesicherung wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung von jedem Block angefertigt. Ein weiterer Teil der Gewebeproben wurde in RNA-later (Ambion Europe Ltd., Huntington, Ambridgeshire, UK) konserviert. Bei RNA-later handelt es sich um eine Fixierungslösung, die in die Gewebeprobe eindringt und die darin enthaltene RNA stabilisiert, indem sie das Enzym RNase inaktiviert. Die Aufbewahrung dieser Gewebeproben bis zur weiteren Analyse erfolgte bei -80 °C .

## Zellkultur

Die verwendeten Pankreaskarzinomzelllinien Panc-1, MiaPaCa-2 und SU86.86 wurden routinemäßig in RPMI-1640-Nährmedium mit L-Glutamin und 25mM HEPES (Gibco, Karlsruhe) kultiviert. Das Nährmedium wurde mit 10% fetalem Rinderserum (FBS), 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt. Die Zelllinien wurden in Brutschränken bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

## Quantitative Real-Time PCR

### Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die qRT-PCR wurde durch das Pankreasforschungslabor der Chirurgischen Klinik der Universität Heidelberg durchgeführt. Zur Durchführung und Analyse der quantitativen Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Geräte und Verbrauchsmaterialien verwendet:

Relevante Geräte und Verbrauchsmaterialien im Rahmen der qRT-PCR	
Gerät oder Material	Hersteller
First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR	Roche Applied Science, Mannheim
LightCycler 2.0	Roche Applied Science, Mannheim
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Applied Science, Mannheim
MagNA Lyser	Roche Applied Science, Mannheim
MagNA Pure LC Instrument	Roche Applied Science, Mannheim
MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit I+II	Roche Applied Science, Mannheim
Primer CD4	Search-LC, Heidelberg
Primer CD8	Search-LC, Heidelberg

Primer IFN- $\gamma$	Search-LC, Heidelberg
Primer B7-H3	Search-LC, Heidelberg
Primer Cyclophilin B	Qiagen, Hilden
Primer HPRT1	Qiagen, Hilden
RNAlater	Ambion, Austin/Texas, USA

## Analyse

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) lässt sich DNA in vitro exponentiell vervielfältigen. Das Enzym DNA-Polymerase synthetisiert pro Zyklus einen DNA-Einzelstrang, der komplementär zu der zu untersuchenden DNA ist. Anfang und Ende des zu vervielfältigenden DNA-Abschnitts werden hierbei von den zugegebenen Primern bestimmt. Pro Zyklus wird die Menge an DNA verdoppelt: Es kommt zu einem exponentiellen Anstieg des DNA-Gehaltes.

Durch die Methode der qRT-PCR kann die gewonnene DNA schließlich auch gemessen werden. Mit Fluorochromen markierte Oligonukleotide – sogenannte Sonden – geben bei jedem Zyklus ein Signal ab, das mit Fluoreszenzmessungen quantifiziert werden kann.

Die aus Pankreaszelllinien und aus Pankreaskarzinomgewebe gewonnene messenger RNA (mRNA) wurde mit Hilfe des MagNA Pure LC Instruments und der MagNA Pure LC Isolation Kits I und II (alle Roche Applied Science, Mannheim) durch

automatisierte Isolation aufbereitet. Das MagNA Pure LC Instrument ist in der Lage Nukleinsäuren durch magnetische Kräfte zu isolieren. Mit dem MagNA Pure LC Isolation Kit lässt sich aufgereinigte mRNA aus Zelllinien (Kit I) und aus Gewebe (Kit II) gewinnen.

Damit mRNA mittels PCR untersucht werden kann, muss sie zunächst in complementary DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Unter Verwendung des „First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR“ kann man die weitaus stabilere cDNA gewinnen. Man macht sich das Prinzip der reversen Transkriptase zu Nutze, die einen zur mRNA komplementären, sogenannten cDNA-Strang synthetisiert.

Um die bei der qRT-PCR erzielten Werte richtig einordnen zu können, werden zusätzlich konstitutiv exprimierte Gene, sogenannte „Housekeeping Genes“, gemessen. Zu den gemessenen Spiegeln dieser Housekeeping Genes können die Werte der Zielgene (in unserem Fall CD4, CD8, B7-H3 und IFN- $\gamma$ ) in Relation gesetzt werden.

Die qRT-PCR wurde mit dem Gerät LightCycler 480 und mit der Reagenzienmischung Light Cyler Fast Start DNA Master SYBR Green I (beide Roche Applied Science, Mannheim) durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I interkaliert mit den Doppelsträngen der DNA. Die Vervielfältigung der DNA führt zu einem proportional ansteigenden Fluoreszenzsignal. Die Reagenzienmischung enthält des Weiteren eine chemisch modifizierte Taq („*Thermus aquaticus*“) DNA-Polymerase, die bei Raumtemperatur inaktiv ist und durch Präinkubation bei 95°C aktiviert werden kann.

Als Ergebnis wurde die Kopienzahl der Zielgene CD4, CD8, B7-H3 und IFN- $\gamma$  pro  $\mu$ l Ausgangs-cDNA in Relation zu den Housekeeping Genes HPRT1 und Cyclophilin B angegeben.

## Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen der Gewebeschnitte wurden mit folgenden Antikörpern durchgeführt:

- mouse anti-human B7-H3-Antikörper (MAB 1027, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)
- mouse anti-human CD4-Antikörper (1F6, Monosan, Uden, Holland) und
- mouse anti-human CD8-Antikörper (DAKO Diagnostics AG, Zürich, Schweiz).

Von den in Paraffin eingebetteten Pankreasgewebeproben wurden mit dem Mikrotom (RM 2255, LEICA Microsystems, Nußloch) konsekutive Schnitte mit einer Dicke von 3 $\mu$ m angefertigt. Um eine sichere Haftung auf den Objektträgern (Superfrost Ultra Plus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) zu garantieren, wurden die Schnitte über Nacht bei 60°C getrocknet.

Zu Anfang der immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte für 3 x 10 Minuten in Xylol (Roticlear) deparaffinisiert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert: 3 x Ethanol 100%, 1 x Ethanol 96%, 1 x Ethanol 70% und 1 x Ethanol 50% für je 5 Minuten und anschließend in destilliertem Wasser für weitere 5 Minuten.

Die Demaskierung der Antigene wurde mit Citratpuffer (10mM, pH=6) durchgeführt. Der 15-minütigen Behandlung in der Mikrowelle bei 600 Watt folgte die Abkühlung auf Raumtemperatur.

Es folgte ein Waschschrift für fünf Minuten in TRIS-gepufferter NaCl-Lösung mit 0,5% gelöstem bovinen Serumalbumin (BSA) (TBS/BSA 0,5%).

TBS („TRIS-buffered-saline“) setzt sich wie folgt zusammen: TRIS 1,21g/l, NaCl 8,5g/l, bei pH=7,4.

Anschließend wurde – um eine unspezifische Reaktion der endogenen Gewebs-Peroxidase zu unterbinden – jeder Schnitt für zehn Minuten in Wasserstoffperoxid 3% in Methanol inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (s.o.) wurden die Gewebe in TRIS-gepufferter NaCl-Lösung mit 3% BSA (TBS/BSA 3%) inkubiert um eine eventuelle unspezifische Aktivität der sekundären Antikörper zu verhindern.

Die Antikörper wurden in DAKO Antibody Diluent (S3022, DAKO Diagnostics AG, Zürich, Schweiz) verdünnt und auf die Gewebe aufgetragen. Die Schnitte wurden anschließend in einer feuchten Kammer bei +4°C über Nacht inkubiert.

Am zweiten Tag wurde der ungebundene, erste Antikörper mit TBS/BSA 0,5% und 0,05% Tween 20 (S1966, DAKO Diagnostics AG, Zürich, Schweiz) abgewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit dem zweiten Antikörper (K4001, anti-mouse horseradish-peroxidase-labeled secondary antibody, DAKO Diagnostics AG, Zürich, Schweiz) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Stunde wurde wiederum der nicht in Bindung gegangene zweite Antikörper mit TBS/BSA 0,5% und 0,05% Tween 20 abgewaschen.

Für die Farbreaktion mit der an den zweiten Antikörper gebundenen Meerrettichperoxidase wurde das DAKO Envision System (DAKO) benutzt. Die

optimale Reaktionsdauer für das beste immunohistochemische Signal wurde in vorangehenden Versuchen ermittelt und die Farbreaktion nach Ablauf dieser – selbstverständlich für alle Präparate einer Färbung identischen – Zeit in destilliertem Wasser beendet.

Für eine bessere Beurteilung der Schnitte unter dem Lichtmikroskop wurde mit Mayers Hematoxylin („Saures Hämalan nach Mayer“) für 15 Sekunden gegengefärbt und die Schnitte im Anschluss für 10 Minuten unter laufendem Leitungswasser gespült. Ein Liter „saures Hämalan nach Mayer“ enthält: 1g Hämatoxilin, 0,2g Natriumjodat, 50g Kaliumaluminiumsulfat-12-Hydrat, 50g Chloralhydrat, 0,91g Zitronensäure.

Nach der Dehydrierung (aufsteigende Alkoholreihe, anschließend 3 x 10 Minuten in Xylol (Roticlear)) folgte das Eindeckeln der Präparate mit „Mounting solution“ (Cytoseal XYL, Richard-Allan-Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Die lichtmikroskopische Analyse wurde von zwei Experten ohne Kenntnis der klinischen Daten der Patienten unabhängig voneinander durchgeführt. Bei 10-facher Vergrößerung wurden positiv gefärbte Tumoreale identifiziert und zur genaueren Analyse bei 200-facher Vergrößerung betrachtet. Das Mikroskop „Axioskop 40“ stammt von der Firma Zeiss.

## **Semiquantitative Analyse und Evaluation der B7-H3-Expression im Pankreaskarzinomgewebe und deren Korrelation mit dem postoperativen Überleben**

Zur Klärung, ob ein Zusammenhang zwischen der B7-H3-Expression in Pankreaskarzinomgewebe und dem postoperativen Überleben besteht, wurden immunhistochemische Färbungen für B7-H3 von 68 Patienten mit histologisch gesichertem duktalem Adenokarzinom des Pankreas durchgeführt.

Die Evaluation führten wir gemäß dem Scoringsystem durch, für das im Pankreasforschungslabor von Prof. Dr. med. J. Kleeff Konsens besteht und das bereits von anderen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe in Publikationen verwendet wurde (Erkan et al., 2005).

Um sowohl den Anteil der positiv gefärbten Tumorzellen als auch die Intensität der Färbung zu berücksichtigen, besteht der Score aus zwei Faktoren.

Für das positiv gefärbte Areal wurden Werte von 1-3 vergeben:

- „1“ für einen Anteil von  $\leq 33\%$
- „2“ für einen Anteil von  $> 33\%$  bis  $\leq 66\%$  und
- „3“ für einen Anteil von  $> 66\%$  B7-H3-positiver Tumorzellen

Ebenso wurden Werte für die Intensität der Farbreaktion vergeben:

- „1“ für keine oder schwache
- „2“ für moderate und

- „3“ für starke Immunoreaktivität

Die beiden Werte für Areal und Intensität ergaben durch Multiplikation den Gesamtwert. Patientenproben, die einen Gesamtscore von  $\leq 3$  erhielten, wurden als Gewebe mit niedriger B7-H3-Expression, solche mit einem Gesamtscore  $> 3$  als Gewebe mit hoher B7-H3-Expression klassifiziert.

### **Semiquantitative Analyse der Prävalenz von tumorinfiltrierenden CD4+- und CD8+-T-Zellen in Pankreaskarzinomgewebe und deren Korrelation mit der B7-H3-Expression**

Um zu untersuchen, ob und inwiefern die B7-H3-Expression im Pankreaskarzinom mit der Anzahl an infiltrierenden CD4+- und CD8+-T-Zellen assoziiert ist, wurde eine semiquantitative Analyse der Prävalenz von CD4+- und CD8+-T-Zellen durchgeführt.

Hierzu wurden in konsekutiven Schnitten (Dicke = 3 $\mu$ m) einer Pankreaskarzinom-Gewebeprobe die Proteine CD4, CD8 und B7-H3 immunhistochemisch angefärbt und histologisch untersucht. Bei geringer Vergrößerung (10x) wurden unter Zuhilfenahme histologischer Orientierungsmarken Bereiche mit und ohne B7-H3-Expression im Tumor identifiziert und untersucht. Die Prävalenz von T-Zellen wurde semiquantitativ anhand der Anzahl der unter 400-facher Vergrößerung pro Gesichtsfeld sichtbaren CD4+- und CD8+-T-Zellen ermittelt und ein entsprechender Score vergeben:

- „0“ für 0-5
- „1“ für 6-15 und

- „2“ für mehr als 15 gezählte CD4+- oder CD8+- Zellen pro Gesichtsfeld.

## **Die Induktion von B7-H3 in Pankreaskarzinomzelllinien**

Um die Effekte von IFN- $\gamma$  (R&D Systems) und IL-4 (R&D Systems) auf die Expression von B7-H3 zu untersuchen, wurden die Pankreaskrebs-Zelllinien Panc-1, MiaPaCa-2 und SU86.86 in Zellkultur verwendet.

Die Zelllinien wurden in 6-Well-Platten ausgesät, sodass sich zum Zeitpunkt der FACS-Analyse ca. 100.000 Zellen in einem Well befanden.

Das Nährmedium der Zelllinien wurde entweder mit 2000IU/ml IFN- $\gamma$  oder mit 40ng/ml IL-4 versetzt. Die Expression von B7-H3 wurde anschließend nach 24- und 48-stündiger Inkubation mit dem jeweiligen Zytokin mittels Durchflusszytometrie untersucht und mit der Negativkontrolle verglichen.

Die Färbungen zu dieser Single-color Durchflusszytometrie wurden mit den folgenden Antikörpern durchgeführt:

- anti-human B7-H3-FITC (B&D Pharmingen, Heidelberg)
- anti-human IgG-FITC (B&D Pharmingen, Heidelberg)

## **Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, mit dessen Hilfe Zellen aufgrund ihrer Eigenschaften unterschieden und gezählt werden können. Findet außerdem eine

Sortierung der Zellen statt, spricht man vom sogenannten „fluorescence activated cell sorting“ (=FACS). In der FACS-Analyse können Zellpopulationen anhand verschiedener Merkmale durch elektrostatische Ladung getrennt werden. Dieses Akronym wird gerne als Synonym für Durchflusszytometrie verwendet, ist allerdings eine geschützte Handelsmarke eines Geräteherstellers.

Bei der Durchflusszytometrie wird die zu untersuchende Zellsuspension durch eine Kapillare geleitet, sodass die Zellen einzeln einen oder mehrere Laserstrahlen passieren. Aufgrund der Lichtstreuung der Zellen kann – nach Aufnahme des Signals durch Fotodetektoren – auf deren Eigenschaften rückgeschlossen werden. Das Vorwärtsstreulicht („forward scatter channel“) korreliert dabei mit der Größe der Zelle und ist ein Parameter zur Unterscheidung von abgestorbenen und lebendigen Zellen. Das Seitwärtsstreulicht („side scatter channel“) lässt Rückschlüsse auf die Granularität der Zellen zu. Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht sind für jede Zelle einzigartig und durch die Kombination dieser beiden Parameter können verschiedene Typen innerhalb einer gemischten Zellpopulation unterschieden werden.

Außerdem ist es möglich, Zellen mit Hilfe von an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelten Antikörpern zu markieren. Ein solcher Farbstoff ist Fluoresceinisothiocyanat (FITC), das bereits seit über 30 Jahren verwendet wird und auch bei unseren Versuchen zum Einsatz kam. Bei Bestrahlung mit einem Laser der Wellenlänge 488nm emittiert FITC grünes Licht, was schlussendlich zur Identifizierung und Quantifizierung der markierten Zellpopulation verwendet werden kann.

Zur Durchführung der Durchflusszytometrie wurden  $2-4 \times 10^5$  Zellen in FACS-Puffer aufgenommen (FACS-Puffer = PBS; 0,5% BSA; 0,1% Natriumazid) und wie folgt aufbereitet:

- Inkubation mit 0,5µg/ml FC-Block (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
- Zugabe von anti-human B7-H3-FITC (B&D Pharmingen, Heidelberg) und Inkubation auf Eis für 30-60min.
- Zwei Waschschrirte mit FACS-Puffer und Aufnahme der Zellen in 200µl FACS-Puffer.
- Durchführung der Messungen mit Hilfe des Durchflusszytometers „FACSCalibur“ (Becton-Dickinson, BD, Heidelberg).

Zur Analyse der Daten wurde die Software „FlowJo“ der Firma TreeStar verwendet.

## Statistische Analyse

Die Ergebnisse der mRNA-Expression sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

Zur statistischen Analyse wurde die Software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) verwendet.

Zur vergleichenden statistischen Evaluation zwischen Gruppen und zur Korrelationsanalyse von histologischen und klinischen Parametern wie Alter, Geschlecht, Tumor-Staging, Tumor-Grading und postoperativem Überleben wurden der Mann-Whitney U Test, der  $\chi^2$ -Test oder der Spearman-Rho-Test durchgeführt.

Das Signifikanz-Niveau wurde bei  $p < 0,05$  festgelegt.

Die Kaplan-Meier-Methode wurde verwendet um die postoperativen Überlebenskurven für die beiden Patientengruppen zu errechnen und statistische Signifikanz mit Hilfe des Log-rank-Tests festgestellt.

## Ergebnisse

### Die Expression von B7-H3 im Pankreaskarzinom des Menschen

Zur Untersuchung der Expression von B7-H3-mRNA wurden qRT-PCRs von 28 chirurgisch resezierten Pankreaskarzinomgewebeproben und von 10 Proben normalen Pankreasgewebes durchgeführt.

B7-H3-mRNA ist im Pankreaskarzinom in signifikant höherem Maße exprimiert als im Normalgewebe. Einer relativen Expression von 275,5 Transkripten (SD  $\pm$ 44,4) im Pankreaskarzinom steht eine relative Expression von 86,5 Transkripten (SD  $\pm$  22,2) im Normalgewebe gegenüber ( $p < 0,05$ ).

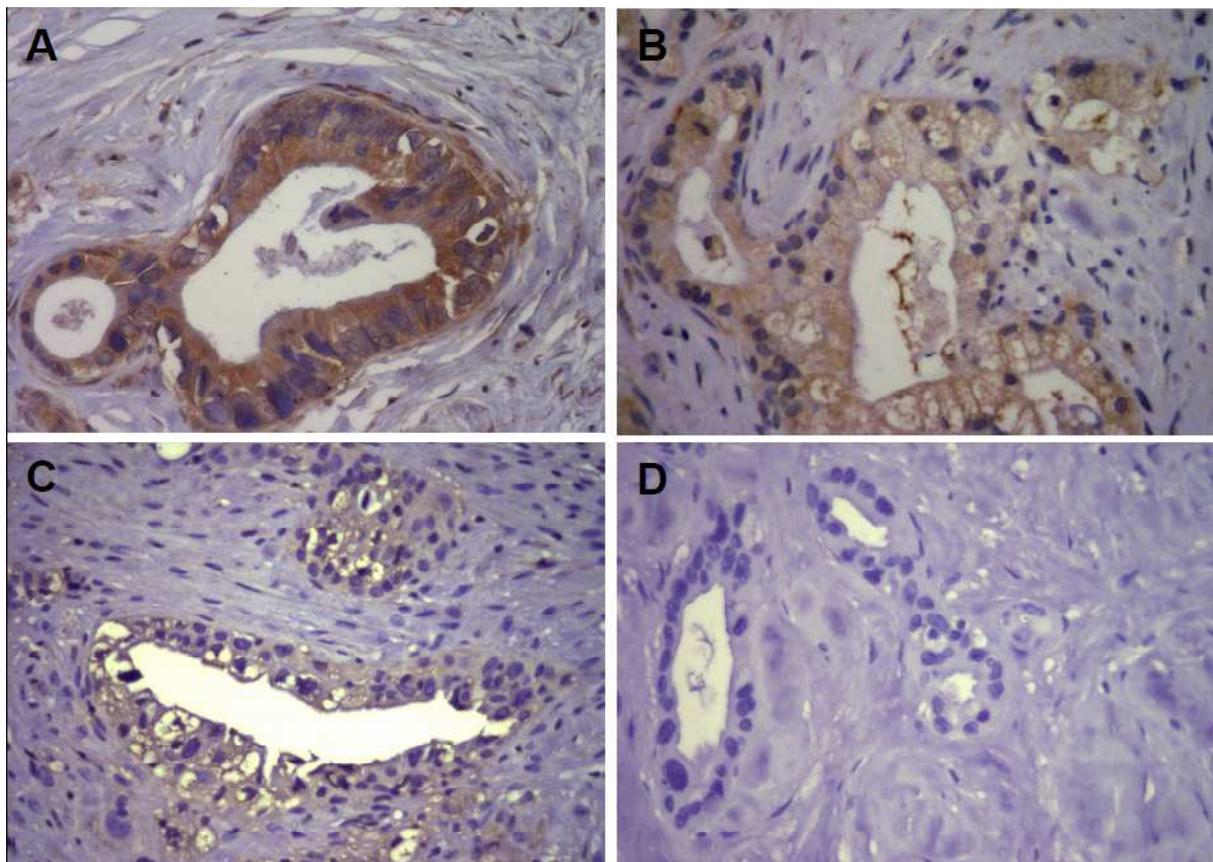
Um die Daten der qRT-PCR zu bestätigen und das Expressionsmuster von B7-H3-Protein im Gewebe zu untersuchen, führten wir immunhistochemische Färbungen von 68 Gewebeproben mit histologisch gesichertem Pankreaskarzinom durch.

Das Pankreaskarzinom zeigt eine deutliche Expression von B7-H3 (s. Abb.1). Ein immunhistochemisches Signal konnte in Tumorzellen sowie in Inselzellen und tumorinfiltrierenden Immunzellen gefunden werden. Schwache, sporadische Immunoreaktivität fand sich in den Tumor umgebenden tubulären Komplexen und Endothelzellen.

Von den 68 untersuchten Präparaten zeigten 60 Gewebe eine positive B7-H3-Färbung der Tumorzellen. Gemäß der Intensität des immunhistochemischen Signals in den Tumorzellen wurden die Präparate in drei Gruppen eingeteilt. Tumoren ohne oder mit schwacher Immunoreaktivität (s. Abb.1 D bzw. C) wurde der Wert 1

zugeordnet, Tumoren mit moderater (s. Abb.1 B) bzw. starker Immunreaktivität (s. Abb.1 A) bekamen den Wert 2 bzw. 3. Unter Einbeziehung des Anteils der B7-H3-positiven Tumorzellen errechnete sich – wie bereits im Teil „Materialien und Methoden“ ausführlich beschrieben – der Gesamtscore des Präparats.

In normalem Pankreasgewebe kann eine sporadische Expression von B7-H3 in duktalem und azinären Zellen beobachtet werden.



**Abbildung 1:** A: Starke; B: Moderate; C: Schwache und D: Keine Expression von B7-H3 im Pankreaskarzinom

## Die Expression von B7-H3 korreliert mit besserem postoperativen Überleben der Pankreaskarzinompatienten

Da costimulatorische Signale bereits als mögliche Regulatoren der gegen den Tumor gerichteten Immunantwort beschrieben wurden, untersuchten wir die Beziehung zwischen der B7-H3-Expression im Tumorgewebe und verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern (s. Tabelle 1).

	n	B7-H3-Expression		p-Wert
		niedrig	hoch	
<b>Geschlecht</b>				n.s.
Männlich	24	15	9	
Weiblich	44	25	19	
<b>Tumor-Stage</b>				n.s.
T1	0	0	0	
T2	4	3	1	
T3	62	36	26	
T4	2	1	1	
<b>Lymphknotenstatus</b>				n.s.
N0	10	5	5	
N1	58	35	23	
<b>Fernmetastasenstatus</b>				n.s.
M0	58	36	22	
M1	10	4	6	
<b>Tumor-Grade</b>				n.s.
G1	2	1	1	
G2	44	27	17	
G3	22	12	10	
G4	0	0	0	
<b>Postoperatives Überleben</b>		11 Monate	17,8 Monate	p=0,0067

**Tabelle 1:** Korrelationen der B7-H3-Expression mit verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem B7-H3-Expressionslevel und dem Alter, dem Geschlecht, dem Tumor-Stadium oder dem Tumor-Grading der Patienten festgestellt werden.

Allerdings zeigte sich eine Korrelation des B7-H3-Expressionslevels mit einem deutlich verlängerten postoperativen Überleben von Pankreaskarzinompatienten ( $p=0,0067$ ; Abb. 2).

Unter den 68 untersuchten Tumorgewebeproben zeigten 40 geringe B7-H3-Expression und 28 hohe B7-H3-Expression in Tumorzellen. Bei der Gruppe der Patienten mit hoher B7-H3-Expression liegt das mediane postoperative Überleben bei 17,8 Monaten, während die Gruppe mit niedriger B7-H3-Expression nur ein medianes Überleben von 11,0 Monaten nach der Operation erreicht (s. Abb.2).

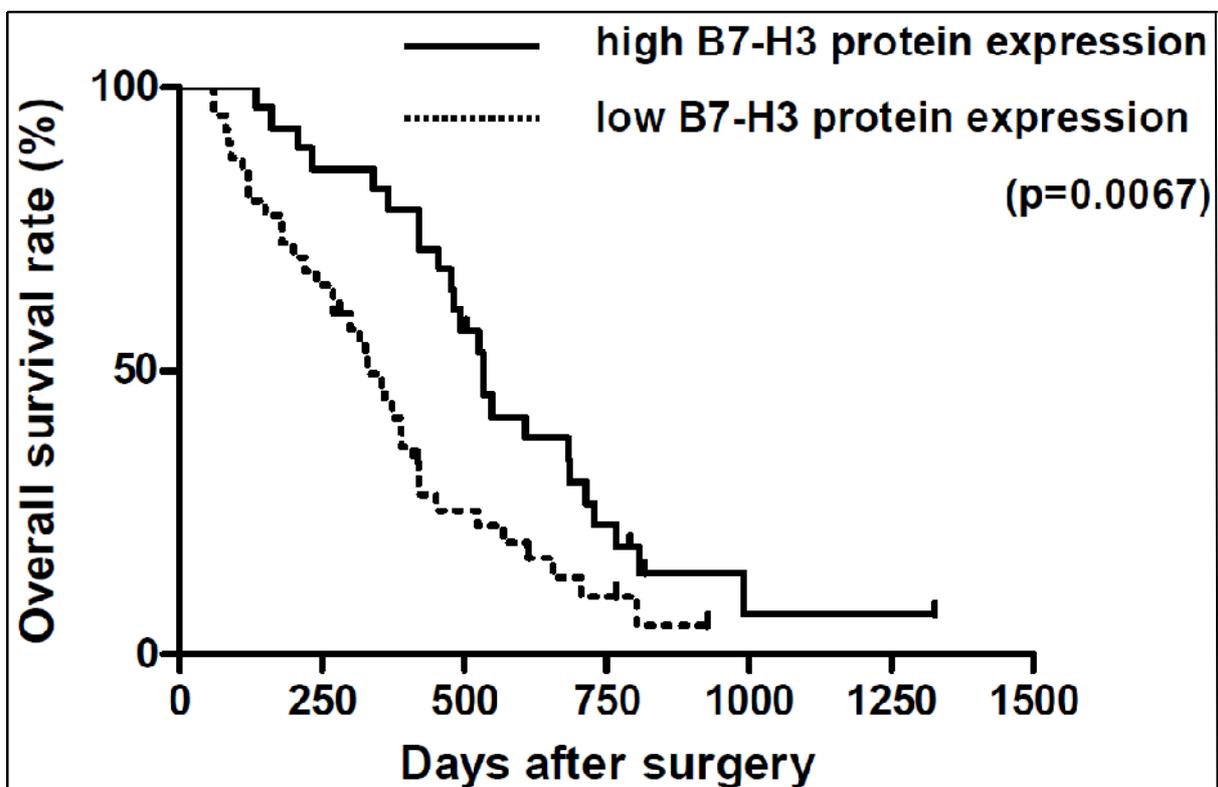


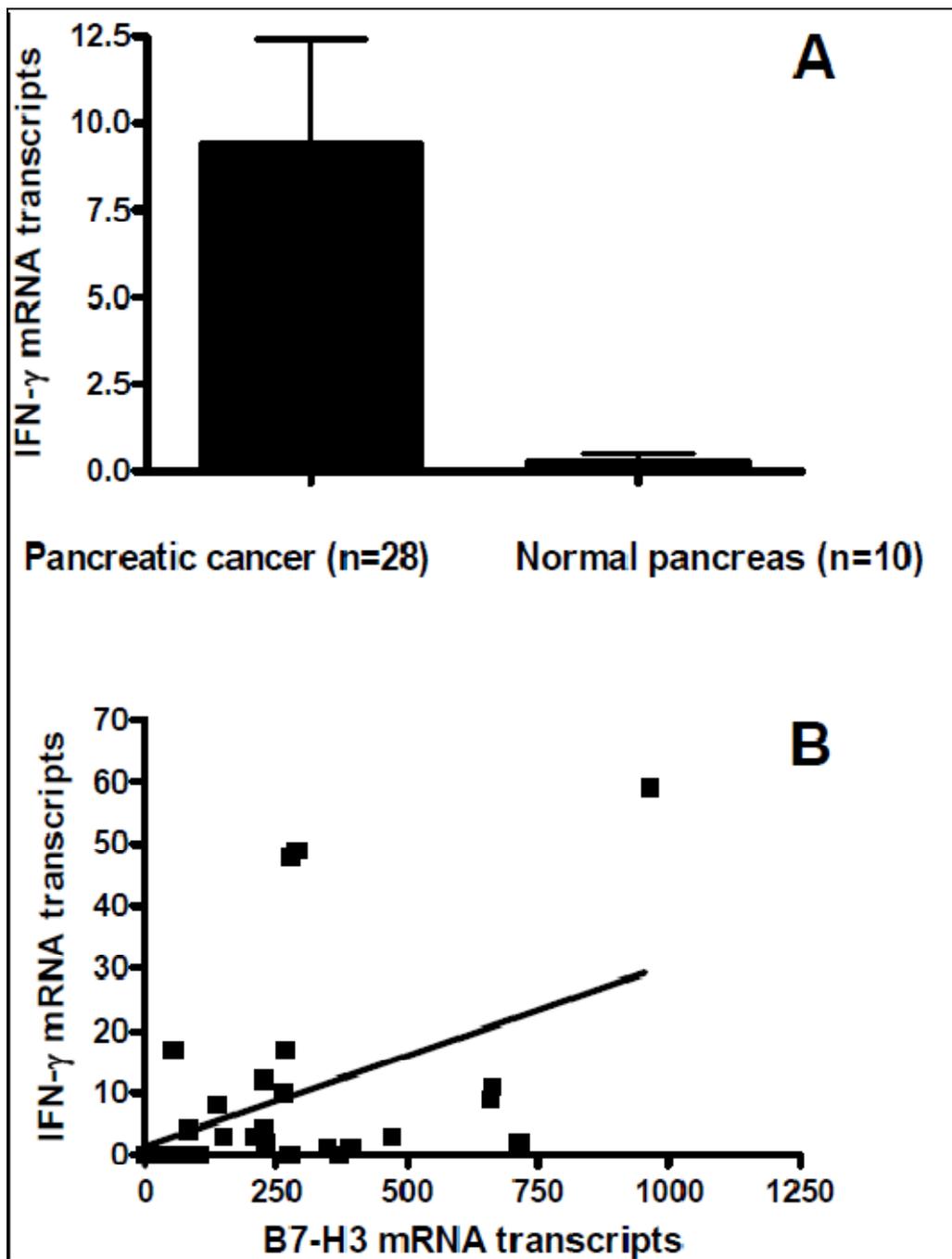
Abbildung 2: Postoperatives Überleben in Abhängigkeit der B7-H3-Expression.

## **IFN- $\gamma$ ist im Pankreaskarzinom in vivo hochreguliert und korreliert signifikant mit der B7-H3-Expression im Tumor**

In vitro konnte nachgewiesen werden, dass B7-H3 selektiv die Produktion von IFN- $\gamma$  durch T-Lymphozyten stimuliert (Chapoval et al., 2001).

Um zu untersuchen, ob die Expressionen von IFN- $\gamma$  und B7-H3 im Pankreaskarzinom in vivo zusammenhängen, wurden qRT-PCRs von 28 Pankreaskarzinomgewebeproben und von 10 Gewebeproben von normalem Pankreasgewebe durchgeführt.

Es zeigte sich, dass die Gen-Expression von IFN- $\gamma$  im Pankreaskarzinom verglichen mit Normalgewebe signifikant erhöht ist ( $p < 0,05$ ; Abb. 3A). Außerdem besteht eine statistisch signifikante Korrelation zwischen den Expressionen von B7-H3 und IFN- $\gamma$  im Pankreaskarzinom ( $p = 0,0225$ ; Spearman rho 0,4297; Abb.3B).



**Abbildung 3:** **A:** IFN-γ ist im Pankreaskarzinom hochreguliert ( $p < 0,05$ ); **B:** Die Expression von IFN-γ korreliert mit der Expression von B7-H3 ( $p = 0,0225$ ; Spearman rho 0,4297)

## **Die Pankreaskarzinomzelllinien Panc-1, MiaPaCa-2 und SU86.86**

### **exprimieren B7-H3 in vitro**

Um zu klären, ob die Pankreaskrebs-Zelllinien Panc-1, MiaPaCa-2 und SU86.86 das costimulatorische Molekül B7-H3 in vitro exprimieren, führten wir qRT-PCRs durch. Alle getesteten Zelllinien exprimieren B7-H3 konstitutiv unter normalen Bedingungen.

Panc-1: 541  $\pm$  36,6 relative Transkripte

MiaPaCa-2: 358  $\pm$  17,5 relative Transkripte

SU86.86: 743  $\pm$  725 relative Transkripte

## **IL-4 und INF- $\gamma$ können die B7-H3-Expression der Zelllinie SU86.86**

### **hochregulieren**

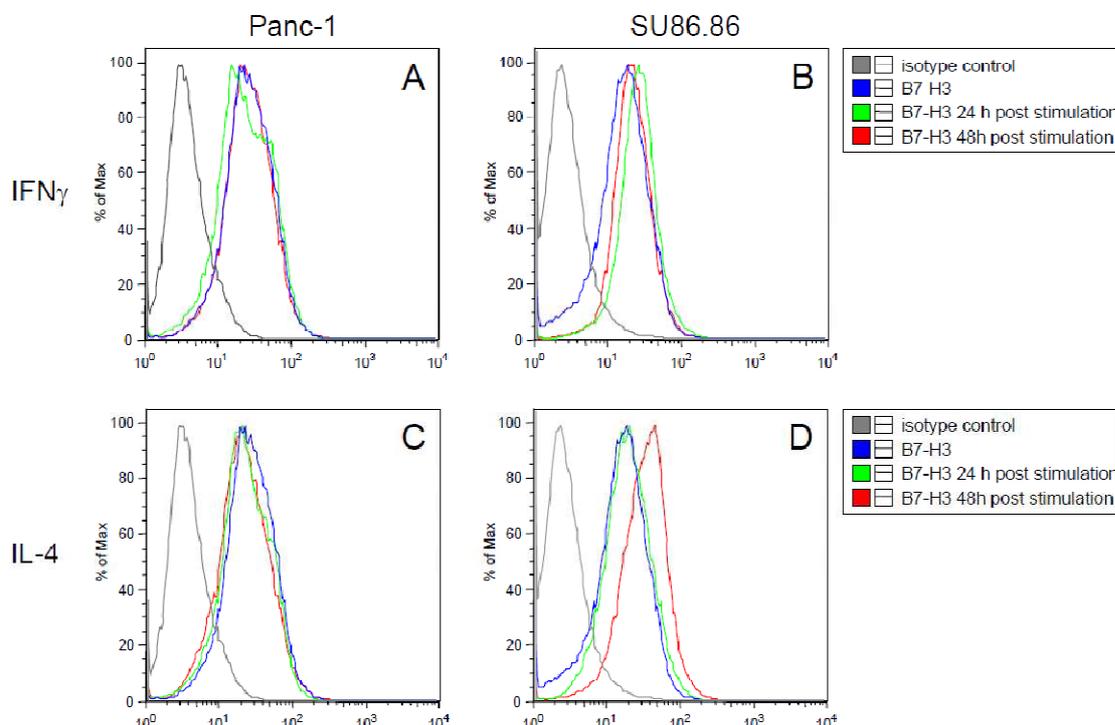
Um den Effekt von Zytokinen auf die B7-H3-Expression in vitro zu untersuchen, behandelten wir die repräsentativen Krebszelllinien Panc-1 und SU86.86 entweder mit dem Th1-Zytokin IFN- $\gamma$  oder mit IL-4, einem Mediator der Th2-Antwort.

Nach Inkubation der Zellen mit rekombinant hergestelltem IFN- $\gamma$  oder IL-4 ermittelten wir nach 24 und 48 Stunden die Expression von B7-H3 mit Hilfe der Durchflusszytometrie und konnten folgende Beobachtungen machen:

- IFN- $\gamma$  führte in Panc-1-Zellen zu einem leichten Abfall der B7-H3-Expression. Dieser Effekt zeigte sich nach 48 Stunden nicht mehr (Abb. 4A).

- In der Zelllinie SU86.86 führte die Behandlung mit IFN- $\gamma$  zu einem deutlichen Anstieg der B7-H3-Expression nach 24 Stunden. Dieser Trend schwächte sich allerdings nach 48 Stunden wieder etwas ab (Abb. 4B).
- Die Zugabe von IL-4 zum Nährmedium führte bei Panc-1-Zellen ebenfalls zu einer Verringerung der B7-H3-Expression nach 24 Stunden, wobei sich dieser Trend nach 48 Stunden noch verstärkte (Abb. 4C).
- Im Gegensatz dazu konnte IL-4 die B7-H3-Expression in SU86.86 nach 24, und noch deutlicher nach 48 Stunden hochregulieren (Abb. 4D).

Somit führte die Behandlung mit IFN- $\gamma$  und in noch stärkerem Ausmaße die Behandlung mit IL-4 zu einer Hochregulierung der B7-H3-Expression auf der Zelloberfläche von SU86.86-Zellen, nicht aber auf der Zelloberfläche von Panc-1.



**Abbildung 4:** Durchflusszytometrische Messung der Expressionslevel von B7-H3 auf der Zelloberfläche von Panc-1- und SU86.86-Zellen 24h und 48h nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  bzw. IL-4.

## Die B7-H3-Expression korreliert mit der Anzahl der tumorinfiltrierenden CD8+-T-Zellen im Pankreaskarzinom

Um festzustellen, ob die Expression von B7-H3 mit der Verteilung von CD4+- und CD8+-T-Zellen im Pankreaskarzinom korreliert, führten wir qRT-PCR und Immunhistochemie durch.

Zuerst untersuchten wir die CD4- und CD8-Expression auf mRNA-Ebene in 28 Pankreaskarzinomgeweben und 10 normalen Pankreasgeweben.

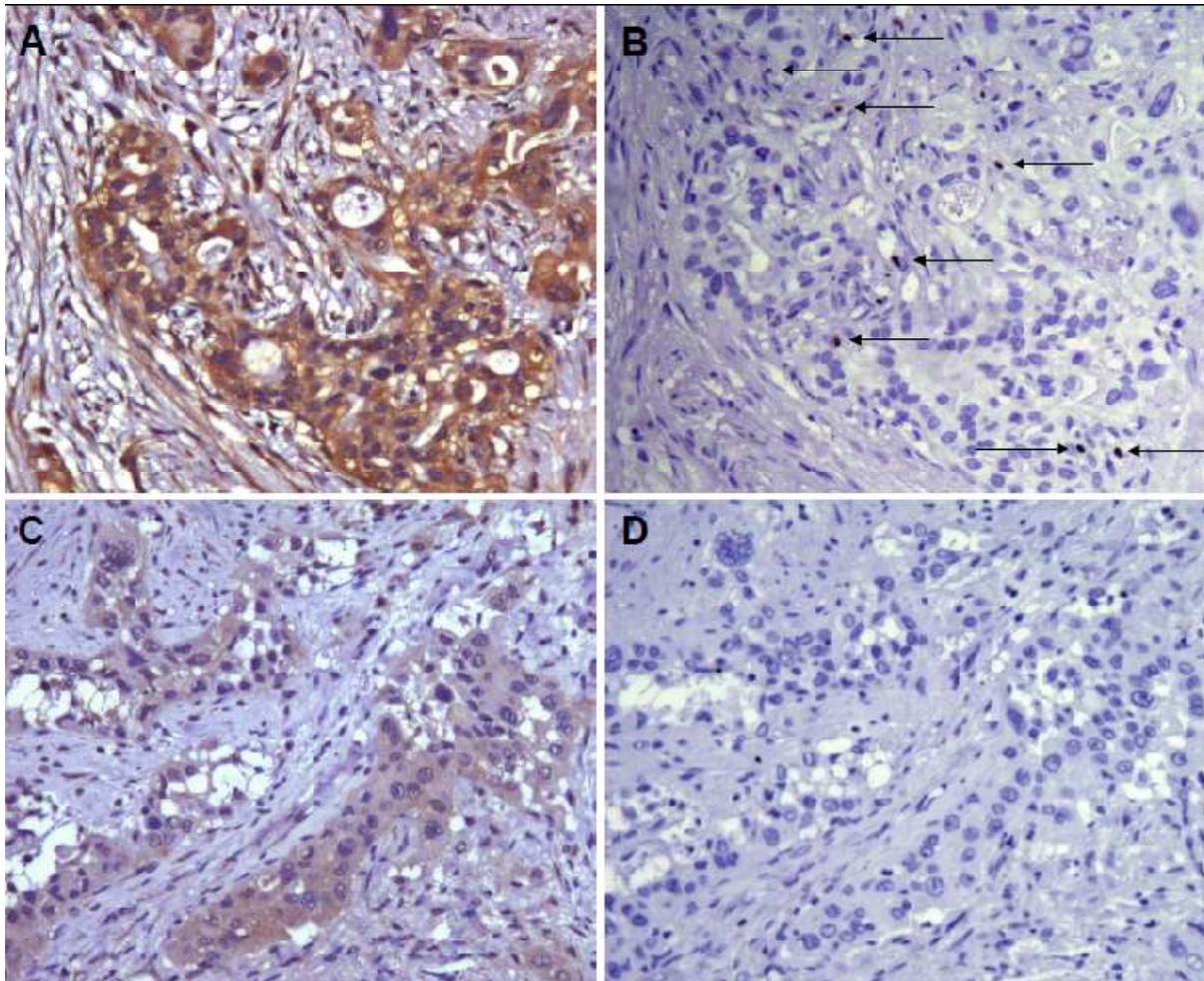
Es zeigte sich, dass die Gen-Expression im Pankreaskarzinom (PC) verglichen mit Normalgewebe (NP) deutlich hochreguliert ist:

- CD4:  $150 \pm 28,1$  relative Transkripte in PC versus  $52 \pm 12,4$  relative Transkripte in NP.
- CD8:  $171 \pm 30,2$  relative Transkripte in PC versus  $39 \pm 6,4$  relative Transkripte in NP.

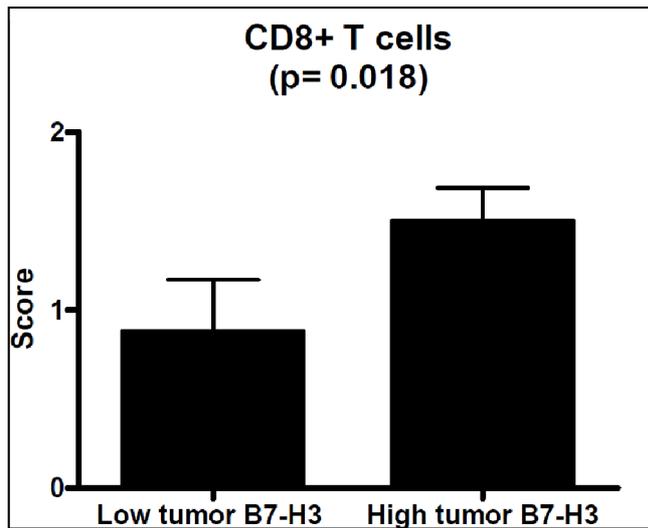
Auf mRNA-Ebene zeigte sich eine signifikante Korrelation der B7-H3-Expression sowohl mit CD4 mRNA ( $p < 0,0001$ ; Spearman Rho 0,76) als auch mit CD8 mRNA ( $p < 0,0097$ ; Spearman Rho 0,48).

Um zu untersuchen, inwieweit von Tumorzellen exprimiertes B7-H3 mit der Verteilung tumorinfiltrierender CD4+- und CD8+-T-Zellen korreliert, wählten wir per Zufall 20 Pankreaskarzinomgewebe aus, anhand derer wir immunhistochemische Färbungen von konsekutiven Schnitten durchführten. Mit Hilfe des in „Material und Methoden“ beschriebenen Scoring-Systems konnten wir einen positiven Zusammenhang zwischen der B7-H3-Expression und der Anzahl der CD8+-T-Zellen,

nicht aber der CD4+-T-Zellen, im Tumorgewebe nachweisen ( $p=0,018$ ; s. Abb. 5 und Abb. 6)



**Abbildung 5:** Tumordinfiltrierende CD8+-T-Zellen (**B+D**) in Bereichen hoher (**A**) und niedriger (**C**) B7-H3-Expression.



**Abbildung 6:** Semiquantitative Analyse der tumorinfiltrierenden CD8+-T-Zellen bei niedriger bzw. hoher B7-H3-Expression.

## Diskussion

Das Pankreaskarzinom ist eine der aggressivsten Krebserkrankungen des Menschen und seine Behandlung stellt eine große Herausforderung für Ärzte, Wissenschaftler, das Pflegepersonal und die betroffenen Patienten dar. Pankreaskrebszellen besitzen nicht nur häufig natürliche Resistenzen gegen Chemotherapeutika und Strahlentherapie, sondern rufen in der Regel durch ihre geringe Immunogenität auch nur recht schwache Immunantworten hervor (Laheru and Jaffee, 2005). Obwohl im Pankreaskarzinomgewebe generell eine hohe Anzahl an Zellen des Immunsystems zu beobachten ist, gelingt es dem Immunsystem offenbar nicht, die Krankheit zu bekämpfen oder in Schach zu halten. So stellt die chirurgische Resektion bislang den einzigen kurativen Therapieansatz des Pankreaskarzinoms dar. Aufgrund der in der Regel späten Diagnosestellung können jedoch häufig nur noch palliative Therapien in Erwägung gezogen werden. Deshalb werden große Anstrengungen unternommen, um neue Therapien gegen das Pankreaskarzinom zu entwickeln. Besondere Hoffnung liegt hierbei auf Konzepten, die in der Lage sind, die körpereigene Immunreaktion gegen den Tumor zu induzieren und zu verbessern. Es ergeben sich hierfür unterschiedliche immunologische Ansätze: Eine vielversprechende und elegante Möglichkeit ist es T-Zellen, welche tumorspezifische Antigene erkennen, zu rekrutieren und zu aktivieren. Unterstützend hierzu können rekombinante, monoklonale Antikörper gegen tumorspezifische Antigene entworfen und eingesetzt werden. Diese Antikörper können nach Bindung an die Krebszellen deren Untergang entweder durch direkte Lyse oder durch zytotoxische Mediatoren hervorrufen (Laheru and Jaffee, 2005).

Zu den Vorteilen der immunbasierten Therapiekonzepte gehört, dass die Methodik sich grundsätzlich von Chemo- und Strahlentherapie unterscheidet. Natürlich ergibt sich hieraus auch ein anderes Spektrum an möglichen und unbedingt zu überwachenden Nebenwirkungen (Laheru and Jaffee, 2005).

Das erworbene Immunsystem und die ihm zugehörigen B- und T-Zellen sind aufgrund der großen Variabilität ihrer Rezeptoren in der Lage eine große Anzahl an tumorspezifischen Antigenen zu erkennen. Dabei ist es ihnen allerdings prinzipiell möglich schon anhand geringer Unterschiede der Epitope zwischen gesunden und entarteten Zellen zu unterscheiden.

Neue Erkenntnisse über den Ablauf einer erfolgreichen Aktivierung von T-Zellen gegen den Tumor aber auch darüber, wie es der Tumor schafft, dieser Überwachung durch das Immunsystem zu entgehen, treiben die Immuntherapieforschung erheblich voran. Zusammen mit der Identifizierung neuer tumorspezifischer Zielantigene können so immer bessere Konzepte entwickelt werden, um die Fähigkeiten des Immunsystems im Kampf gegen das Pankreaskarzinom zu nutzen (Laheru and Jaffee, 2005).

Einen besonders vielversprechenden Ansatz stellen die costimulatorischen Signalwege dar, da sie eine zentrale Rolle in der Aktivierung der erworbenen Immunantwort spielen (Greenwald et al., 2005).

Costimulatorische Moleküle aus der B7-Familie liefern nach Antigenerkennung am TCR das für den Beginn einer von T-Zellen getragenen Immunantwort essentielle, sogenannte „zweite Signal“ (Sharpe and Freeman, 2002). Bindungen von costimulatorischen B7-Liganden an die entsprechenden Rezeptoren steigern die T-Zell-Proliferation und Zytokinsekretion und verhindern T-Zell-Apoptose. Sie

stimulieren somit die T-Zell-Antwort. Im Gegensatz hierzu begrenzen, beenden und schwächen coinhibitorische Moleküle die T-Zell-Antwort und verhindern so Gewebe- und Organschäden durch autoaggressive Immunreaktionen (Seliger et al., 2008).

Interessant ist die Beobachtung, dass die Expression von B7-Molekülen bei einer Reihe von Tumorentitäten des Menschen nachgewiesen werden konnte. Dies führte zu der These, dass die aberrante Expression dieser Moleküle eine Möglichkeit für den Tumor darstellt, der Bekämpfung durch das körpereigene Immunsystem zu entkommen bzw. diese zu modulieren. Als Beispiel hierfür ist vor allem B7-H1 zu nennen, das in großer Menge sowohl in hämatologischen Neoplasien als auch in den meisten soliden Tumoren gefunden werden konnte (Seliger et al., 2008). Auch Studien zum Pankreaskarzinom ergaben, dass B7-H1 im Tumorgewebe überexprimiert ist und signifikant mit schlechterer Prognose und kürzerem postoperativen Überleben der Patienten korreliert. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass B7-H1 mit der Zahl der FoxP3+ regulatorischen T-Zellen (Tregs) assoziiert ist. Die Induktion dieser als immuninhibitorisch geltenden CD4+CD25+-T-Zell-Subpopulation könnte einen möglichen Weg zur Erzeugung von Immuntoleranz durch B7-H1 aufzeigen. Insgesamt passen diese Ergebnisse sehr gut zu der Annahme, dass B7-H1 - als Mitglied der B7-Familie - den Tumor vor der Bekämpfung durch das Immunsystem schützt (Loos et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass mit B7-H3 ein weiteres Molekül der B7-Familie im Pankreaskarzinom überexprimiert ist. Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene fanden sich im Pankreaskarzinom signifikant erhöhte Expressionslevel im Vergleich zum Normalgewebe. Desweiteren konnten wir zeigen, dass die Pankreaskrebs-Zelllinien Panc-1, SU86.86 und MiaPaCa-2 B7-H3 in vitro exprimieren.

Bei der retrospektiven Analyse des postoperativen Überlebens der in unsere Studie eingeschlossenen Patienten stellten wir fest, dass eine signifikante Korrelation zwischen der B7-H3-Expression im Tumor und dem postoperativen Überleben der Patienten besteht. Eine denkbare Erklärung für diese Beobachtung ist, dass B7-H3 mittels costimulatorischer Eigenschaften die gezielte Immunantwort gegen den Tumor initiiert und verbessert. Zu dieser Überlegung passen unsere Ergebnisse der semiquantitativen Analyse des Immunzellinfiltrats in Tumorarealen mit hoher B7-H3-Expression. Dort ließ sich eine signifikant erhöhte Anzahl an tumorinfiltrierenden CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Vergleich zu Bereichen mit niedriger B7-H3-Expression finden.

Desweiteren konnten wir mittels qRT-PCR auf mRNA-Ebene eine positive Korrelation zwischen der Gen-Expression von B7-H3 mit CD4 und CD8 bestätigen.

Unsere Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass auf Pankreaskarzinomzellen exprimiertes B7-H3 an einen Rezeptor auf T-Zellen bindet und die Antitumorimmunantwort moduliert. Vermutlich vermittelt es positive costimulatorische Signale und führt so zur Proliferation und Aktivierung der T-Zellen. Die Korrelation zwischen B7-H3 mit CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen spricht dafür, dass tumorassoziiertes B7-H3 die T-Zell-Antwort aufrecht erhalten und verstärken kann. Eine verbesserte tumorspezifische Immunantwort kann den Tumor besser bekämpfen und die Krankheit so länger in Schach halten, was unserer Hypothese nach in einer verlängerten postoperativen Überlebensdauer der Pankreaskarzinompatienten resultiert.

Diese Schlussfolgerung wird von der oben bereits vorgestellten Erstbeschreibung des costimulatorischen Moleküls B7-H3 durch Chapoval et al., die in vitro eine von B7-H3 geförderte Proliferation von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen sowie die Induktion der IFN- $\gamma$ -Produktion nachwies, gestützt (Chapoval et al., 2001).

Weitere Hinweise auf eine positive costimulatorische Funktion von B7-H3 wurden von Untersuchungen im Kontext der akuten und chronischen Abstoßung von allogenen Transplantaten geliefert. In einer im Jahre 2005 veröffentlichten Arbeit untersuchten Wang et al. die Eigenschaften von B7-H3 mit Hilfe von B7-H3-Knockout-Mäusen nach allogenen Herz- und Inselzelltransplantationen. Sie untersuchten die B7-H3-Expression während der Abstoßung des Allotransplantats. Während in normalem, murinem Myokard B7-H3 immunhistochemisch nicht nachzuweisen war, konnte gezeigt werden, dass B7-H3 bei der akuten Abstoßungsreaktion von infiltrierenden mononukleären Zellen exprimiert wurde. Insgesamt war in allogenen transplantierten Herzen die B7-H3-mRNA-Expression im Vergleich zu nicht transplantierten oder isogen transplantierten Herzen um das Zehnfache erhöht (Wang et al., 2005).

In einem weiteren Schritt transplantierte die Forschungsgruppe Spenderherzen von Balb/c-Mäusen in C57BL/6 Mäuse mit homozygot deletiertem B7-H3 („B7-H3-Knockout-Mäusen“) und verglichen sie mit der Kontrollgruppe, bei der die Allele für B7-H3 nicht deletiert waren. Es konnte festgestellt werden, dass sowohl die akute als auch die chronische Abstoßungsreaktion gegen allogene Herz- und Inselzelltransplantate bei B7-H3-Knockout-Mäusen wesentlich milder verlief. Die Expression von B7-H3 korrelierte somit positiv mit der Etablierung einer effektiven Immunantwort. Passend hierzu ist, dass bei B7-H3-Knockout-Mäusen eine verminderte Produktion von IL-2 und INF- $\gamma$ , zweier Schlüsselmediatoren der Th1-Antwort, vorlag (Wang et al., 2005).

Funktionelle Daten, die Hinweise auf costimulatorische Eigenschaften von B7-H3 liefern, liegen aber nicht nur im Zusammenhang mit Abstoßungsreaktionen gegen Transplantate sondern auch im Kontext der Antitumorimmunität vor.

Luo et al. transfizierten B7-H3-cDNA in die Mastozytomzelllinie P815 und untersuchten deren Tumorigenität nach subkutaner Injektion in Versuchstiere. P815-Mastozytomzellen der Negativkontrolle, d.h. nach Transfektion eines Plasmids ohne B7-H3, entwickelten sich in DBA/2-Mäusen zu großen Tumoren. Auch die subkutane Injektion von B7-H3-transfizierten P815 Zellen führte zur Entstehung von soliden Tumoren, allerdings war die Wachstumsrate wesentlich geringer und etwa 50 Prozent der Tumoren bildeten sich einige Wochen nach Inokulation komplett zurück. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung steht, dass die Überlebenszeiten von DBA/2-Mäusen, die mit B7-H3-positiven Mastozytomzellen behandelt wurden, länger als die der Kontrollgruppe waren. In immundefizienten BALB/c-Mäusen unterschieden sich die Überlebenszeiten der beiden Versuchsgruppen jedoch nicht. Dies stützt die These, dass die Korrelation der B7-H3-Expression mit einem verlängerten Überleben der Versuchstiere durch eine verbesserte antitumorale Immunantwort erklärbar ist (Luo et al., 2004).

Ein weiterer Hinweis für costimulatorische Eigenschaften von B7-H3 ist, dass durch die Injektion von monoklonalen Antikörpern gegen CD8 die zuvor beobachtete Wachstumshemmung der Tumoren komplett aufgehoben wurde, sodass alle Versuchstiere nach 30 Tagen an den Tumoren verstorben waren. Die Beeinträchtigung der Aktivität von CD4+-T-Zellen und NK-Zellen mittels monoklonaler Antikörper gegen CD4 beziehungsweise GM1 hatte jedoch keinen Einfluss auf die Wachstumshemmung der B7-H3-positiven Tumoren. Für das Vorhandensein von T-Gedächtniszellen – einem Charakteristikum der erworbenen Immunantwort – spricht, dass Mäuse, bei denen sich ein B7-H3-positiver Tumor bereits zurückgebildet hatte, bei Inokulation von Wildtyp P815-Zellen eine hohe Aktivität zytotoxischer T-Zellen gegen diese entwickelten (Luo et al., 2004).

Auch wenn man in Betracht zieht, dass es sich bei P815 um eine ohnehin schon recht immunogene Tumorzelllinie handelt, sind die Hinweise dieser Arbeit auf eine selektive Stimulation der von CD8+-T-Zellen vermittelten und gegen den Tumor gerichteten Immunantwort bemerkenswert. Natürlich ist die Übertragung sowohl auf den Menschen als auch auf andere (unter Umständen weniger immunogene) Tumorentitäten mit entsprechender Vorsicht vorzunehmen.

Eine Forschergruppe aus China um Ma konnte in einem Modell des hepatozellulären Karzinoms (HCC) ähnliche Ergebnisse erzielen. Sie inokulierten Balb/c-Mäusen subkutan die HCC-Zelllinie H22. Anschließend beobachteten sie den therapeutischen Effekt eingebrachter Plasmide, die für B7-H3 oder Vasostatin kodieren (Ma et al., 2007).

Die B7-H3-Monotherapie brachte hier zwar keinen erkennbaren Überlebensvorteil, dafür konnten erhöhte Serumspiegel von IFN- $\gamma$ , eine erhöhte tumorspezifische zytotoxische Aktivität sowie eine erhöhte Anzahl der tumorinfiltrierenden CD8+-T-Zellen und NK-Zellen nachgewiesen werden (Ma et al., 2007).

Im Gegensatz dazu führte die Kombinationstherapie durch zusätzlichen Gentransfer von Vasostatin zur Eradikation der Tumoren. Dies galt nicht nur für die primär gesetzten Tumoren, in die die Plasmide eingebracht wurden, sondern auch für kleinere, entfernt eingebrachte Tumorherde. Die immunhistochemische Analyse zeigte, dass die B7-H3-vermittelte Immunreaktion hauptsächlich von CD8+- und NK-Zellen getragen wurde (Ma et al., 2007).

Die im Jahre 2007 publizierte Studie von Lupu et al. kommt der Realität durch orthotope Injektion der syngenesischen Kolonkarzinomzellen im Mausmodell näher als die beiden zuvor vorgestellten Arbeiten. Zwei Wochen nach der Injektion der

Tumorzellen in das Zölkum von Balb/c-Mäusen begannen die Forscher die Behandlung mit B7-H3 mittels eines rekombinanten, adenoviralen Vektors.

Anhand von explorativen Laparotomien zwei Wochen nach Tumorimplantation (d.h. unmittelbar vor Beginn der adenoviralen Therapie) und nach Ablauf weiterer zwei Wochen (also zwei Wochen nach Beginn der adenoviralen Therapie) wurde die TumorgroÙe bestimmt und mit der Kontrollgruppe, in die nur ein an GFP gekoppelter Adenovirus eingebracht wurde, verglichen.

Tendenziell zeigte sich ein geringeres Wachstum der Tumoren, die mit adenoviralem B7-H3 behandelt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede konnten jedoch nur für kleinere Tumoren beobachtet werden, deren Größe bei der ersten Messung zwei Wochen nach Implantation weniger als  $7\text{mm}^3$  betrug (Lupu et al., 2007).

Während zwei Wochen nach Tumoringektion noch keine der beiden Gruppen Metastasen entwickelt hatte, waren zwei Wochen nach Injektion der adenoviralen Vektoren folgende Unterschiede erkennbar: Alle Versuchstiere in der Kontrollgruppe (10/10) entwickelten sekundäre Lymphknotenmetastasen, wohingegen nur sieben der zehn Tiere, die die adenovirale Behandlung mit B7-H3 erhielten, positive Lymphknoten aufwiesen. Statistisch signifikant war der Unterschied im Auftreten von Lebermetastasen: 8/10 Tiere in der Kontrollgruppe verglichen mit 2/10 in der behandelten Gruppe. Bemerkenswerterweise blieben drei Tiere der Behandlungsgruppe komplett frei von Metastasen.

Zusätzlich konnten erhöhte systemische Serumspiegel von IL-12 gemessen werden. Der enge Zusammenhang zwischen B7-H3 und IFN- $\gamma$  wird in dieser Arbeit dadurch bestätigt, dass sich unter den aus der Milz isolierten CD8 $^+$ -T-Zellen ein erhöhter

Anteil an tumorspezifischen und IFN- $\gamma$  produzierenden T-Zellen befand (Lupu et al., 2007).

Auch beim Menschen liegen Daten vor, die eine costimulatorische Rolle von B7-H3 in der antitumoralen Immunantwort nahe legen.

In einer retrospektiven Studie untersuchten Wu et al. die B7-H3-Expression im Magenkarzinom bei 102 Patienten. In fast 60 Prozent der Magenkarzinomgewebeproben konnte eine positive Expression von B7-H3 nachgewiesen werden. Während mit Alter oder Geschlecht keine Korrelation nachgewiesen werden konnte, zeigte sich ein Zusammenhang bezüglich der Prognose der Patienten: Der Anteil der B7-H3-positiven Patienten, die länger als fünf Jahre nach Operation überlebten, war signifikant höher als der Anteil der B7-H3-positiven Magenkarzinome in der Gruppe derer, die weniger als zwei Jahre überlebten.

Desweiteren konnte eine Korrelation der B7-H3-Expression mit einer geringeren Infiltrationstiefe und einem besser-differenzierten histologischen Typ der Tumoren hergestellt werden. Auch nach Angleichung dieser Faktoren zeigte sich allerdings ein zweifach verlängertes postoperatives Überleben der Patienten mit hoher B7-H3-Expression im Tumor. Die Autoren leiteten hieraus die Hypothese ab, dass B7-H3 bei der Behandlung des Magenkarzinoms sowohl als prognostischer Marker, als auch als möglicher Angriffspunkt für neue Therapiekonzepte dienen könnte (Wu et al., 2006).

Die oben dargestellten Arbeiten geben klare Hinweise für costimulatorische Eigenschaften von B7-H3. Allerdings bleibt die exakte physiologische,

beziehungsweise pathophysiologische Rolle von B7-H3 ungeklärt, da auch eine Reihe von Arbeiten von coinhibitorischen Eigenschaften von B7-H3 berichteten.

Die Arbeitsgruppe um Prasad führte funktionelle Experimente mit aufgereinigten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus C57BL/6-Mäusen durch. Hierbei beobachteten sie einen vermutlich durch IL-2 vermittelten immuninhibitorischen Effekt der Interaktion von B7-H3 mit CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (Prasad et al., 2004).

Um diesen Effekt intrazellulär weiter zu untersuchen, wurden die Spiegel der für die T-Zell-Aktivierung und -Funktion wichtigen Transkriptionsregulatoren NFAT, NF-κB und AP-1 in DO11.10 T-Zell-Hybridom-Zellen gemessen. Diese Zelllinie, die nach Aktivierung B7-H3 auch selbst exprimiert, wurde mit B7-H3-Ig behandelt, was zur Reduktion von NFAT, NF-κB und AP-1 führte. Dies wiederum korrelierte mit verringerter IL-2 Produktion und dem Auftreten von aktivierungsinduziertem Zelltod (Prasad et al., 2004). Die Forschergruppe führte auch Experimente in vivo mit C57BL/6 Mäusen durch. Sie induzierte eine experimentelle autoimmune Enzephalitis (EAE) und untersuchte deren Verlauf nach Gabe von Anti-B7-H3-mAb – einem monoklonalen Antikörper, der die Funktion von B7-H3 blockiert – im Vergleich zur Kontrollgruppe, die nur unspezifisches IgG erhielt. Beide Antikörper wurden zum Zeitpunkt des T-Zell-Primings gegeben. Die Blockade von B7-H3 korrelierte sowohl mit einer Beschleunigung und klinischen Verschlimmerung der EAE als auch mit einer erhöhten Anzahl an CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in den Gehirnen der Mäuse (Prasad et al., 2004).

Diese Arbeit lieferte in vitro und in vivo interessante funktionelle Daten für coinhibitorische Eigenschaften von B7-H3 im Mausmodell, machte aber keine Aussagen über die CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Population bei B7-H3-Stimulation oder -Blockade.

Suh et al. beschrieben in ihrem 2003 erschienenen Artikel ebenfalls die coinhibitorischen Eigenschaften von B7-H3. Sie konnten in vitro nachweisen, dass murines B7-H3 die CD4+- und CD8+-T-Zell-Proliferation, einhergehend mit reduzierten Spiegeln an IFN- $\gamma$  und IL-2, hemmt. Ein Effekt, der durch gleichzeitige Bindung von CD28 aufgehoben werden konnte. Die Autoren schlussfolgerten hieraus, dass die immunoinhibitorischen Eigenschaften von B7-H3 womöglich vor allem dort eine Rolle spielen, wo Costimulation durch CD28 nur begrenzt vorkommt (Suh et al., 2003).

Im Tiermodell mit B7-H3-defizienten Versuchsmäusen (C57BL/6 x 129/Ola) beobachteten Suh et al. eine erhöhte Intensität von Th1-vermittelten, nicht aber von Th2-vermittelten Hypersensitivitätsreaktionen (Suh et al., 2003).

Mit Hilfe ihres B7-H3-defizienten Mausmodells untersuchten die Forscher auch die von zytotoxischen T-Zellen vermittelte Immunantwort auf Viren wie das lymphozytäre Choriomeningitis-Virus (LCMV), das Influenza-Virus und das Vesikuläre-Stomatitis-Virus in vivo. Hierbei konnte, obwohl die Immunantwort gegen Influenza und das Vesikuläre-Stomatitis-Virus in hohem Maße von Costimulation abhängt, auch bei den B7-H3-Knockout-Mäusen keine Beeinträchtigung der Virusabwehr durch zytotoxische T-Zellen festgestellt werden (Bertram et al., 2002; Suh et al., 2003).

Die Gruppe um Suh schloss daraus, dass B7-H3 kein essentielles costimulatorisches Signal für zytotoxische T-Zellen darstellt und dass das Fehlen von B7-H3 weder Einfluss auf die Entstehung noch auf die Effektorfunktionen zytotoxischer T-Zellen hat (Suh et al., 2003).

Die von den Autoren vertretene Sichtweise, B7-H3 nur im Kontext seiner coinhibitorischen Eigenschaften zu betrachten und die zuvor nachgewiesene

Fähigkeit eine CTL-getragene Immunantwort zu stimulieren außer Acht zu lassen, ist jedoch fragwürdig. Aus den oben genannten Ergebnissen von Suh et al. ging nämlich vor allem hervor, dass ein Verlust von B7-H3 sich nicht in einer Defizienz bzw. Fehlfunktion der zytotoxischen T-Zellen niederschlug und eventuell durch bisher nicht bekannte Mechanismen kompensiert werden konnte.

Eine Gruppe aus Heidelberg postulierte eine coinhibitorische Funktion von B7-H3 im Zusammenspiel mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-regulatorischen T-Zellen (Tregs) und dendritischen Zellen.

Nach 24-stündiger Co-Kultur mit Tregs zeigte die Untersuchung der dendritischen Zellen mittels FACS, dass diese vermehrt B7-H3 auf ihrer Oberfläche exprimierten. In einem nachfolgenden Versuch wurden die Tregs nach 24 Stunden in Co-Kultur mit dendritischen Zellen entfernt und normale, allogene CD4<sup>+</sup>-T-Helfer-Zellen hinzugegeben. Eine hochregulierte Expression von B7-H3 auf dendritischen Zellen korrelierte mit deren verminderter Fähigkeit CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu stimulieren, was allerdings durch Zugabe von Lipopolysaccharid (LPS) reversibel war (Mahnke et al., 2007).

Die Arbeit von Mahnke et al. lieferte sehr interessante Ergebnisse über das Zusammenspiel von dendritischen Zellen und T-Helferzellen, lässt aber eine Stellungnahme zur Rolle von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen vermissen.

Neben den oben zitierten Arbeiten, die vorrangig funktionelle Daten zu B7-H3 lieferten, existieren auch eine Reihe von deskriptiven Studien, die die Expression von B7-H3 in den einzelnen Krebsentitäten untersuchten.

Die Arbeitsgruppe um Zang untersuchte in einer groß angelegten Studie 823 Prostatakarzinom-Patienten nach radikaler Prostatektomie hinsichtlich der B7-H3-

Expression im Tumorgewebe mit einem Follow-up von bis zu sieben Jahren. Laut ihren Ergebnissen fanden sich in 93 Prozent der untersuchten Prostatakarzinomgewebe B7-H3-positive Tumorzellen, während nur 7 Prozent der Präparate B7-H3-negativ waren. Der Medianwert positiv-gefärbter Tumorzellen im Gewebe lag bei 80 Prozent (Zang et al., 2007).

Um die immunhistochemisch erhobenen Befunde mit klinischen Daten zu korrelieren, wurde eine Gruppe von Patienten mit „starker“ B7-H3-Intensität definiert. In diese Kategorie fielen 26 Prozent der Patienten, die gegenüber der restlichen Kohorte eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine extrakapsuläre Ausdehnung des Karzinoms, eine Invasion der Samenbläschen und ein nicht mehr organbeschränktes Krankheitsstadium aufwiesen. Letztlich konnte auch festgestellt werden, dass Patienten mit starker B7-H3-Expression eine schlechtere Prognose hinsichtlich der Rezidivrate und der postoperativen Überlebenszeit hatten (Zang et al., 2007).

Eine weitere im Jahre 2007 veröffentlichte retrospektive Studie über B7-H3 im Prostatakarzinom von Roth et al. kam zu ähnlichen Ergebnissen. In dieser Arbeit wurde bei allen 338 untersuchten Gewebeproben eine positive B7-H3-Expression im Tumor nachgewiesen, mit einem Anteil von 40 Prozent bis 100 Prozent B7-H3-positiver Tumorzellen. In 83,4 Prozent aller Gewebeproben waren 100 Prozent der Tumorzellen B7-H3-positiv. Deshalb wurde auch hier nach der Intensität der Immunoreaktivität unterschieden: 19,2 Prozent der Präparate zeigten schwache, 61 Prozent moderate und 19,8 Prozent starke B7-H3-Expression (Roth et al., 2007).

Nach Korrelation dieser unterschiedlichen Expressionsintensitäten mit klinischen Daten konnte festgestellt werden, dass ein Zusammenhang zwischen hoher Expression von B7-H3 und fortgeschrittenem Krankheitsstadium, Progression der Erkrankung und schlechter Prognose besteht. Eine Korrelation mit dem

postoperativen Überleben konnte allerdings nicht hergestellt werden (Roth et al., 2007).

Es gibt noch weitere, ähnliche Studien für andere Tumorentitäten des Menschen, so zum Beispiel für das klarzellige Nierenzellkarzinom (ccRCC). Der Anteil der Tumorgewebe mit immunhistochemisch positivem Signal für B7-H3 war hier allerdings wesentlich geringer: Nur 17,4 Prozent der insgesamt 743 Gewebeproben konnten als B7-H3-positiv identifiziert werden. Die restlichen 614 Präparate zeigten keinen Anhalt für eine B7-H3-Expression. Die Positivität für B7-H3 im Tumor war mit dem Auftreten klinischer Symptome und einer aggressiven Tumorpathologie assoziiert (Crispen et al., 2008).

Im Gegensatz zu dem geringen Anteil B7-H3-exprimierender Tumoren zeigten die Tumorgefäße in 95 Prozent eine immunhistochemische Reaktivität für B7-H3.

In der univariaten Analyse hatten die Patienten mit positiver B7-H3-Expression im Tumor ein vierfach erhöhtes Risiko an ccRCC zu sterben. Allerdings korrelierte die B7-H3-Expression auch mit klinisch-pathologischen Parametern wie fortgeschrittenem Tumor-Stadium und aggressiverer Tumorpathologie. Nach Adjustierung für die Parameter Tumor-Stadium, Tumorgröße, Tumor-Grading und Nekrose im Sinne des von der Mayo-Clinic entwickelten SSIGN-Scores („stage, size, grade and necrosis“) (Crispen et al., 2008; Ficarra et al., 2008) verlor dieser Zusammenhang seine statistische Signifikanz.

Ähnliches galt für den Vergleich der Patienten, deren Gefäße im Tumor B7-H3 mit einem „diffusen“ Muster exprimieren im Gegensatz zu B7-H3-negativen Tumorgefäßen.

Es konnte allerdings – auch nach Adjustierung für die Parameter des SSIGN-Scores – eine Korrelation mit dem postoperativen Überleben hergestellt werden, indem 340 Patienten identifiziert wurden, die entweder positive B7-H3-Expression im Tumor oder diffuse B7-H3-Expression in den Gefäßen des Tumors aufwiesen. Diese Patienten hatten gegenüber den Patienten mit negativer B7-H3-Expression im Tumor und negativer, fokaler oder moderater B7-H3-Expression in tumorassoziierten Gefäßen ein signifikant erhöhtes Risiko am ccRCC zu versterben (Crispen et al., 2008).

Nach Abschluss unserer Arbeiten veröffentlichten Yamato et al. einen Artikel, in dem sie ebenfalls die Rolle von B7-H3 im Pankreaskarzinom untersuchten.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen konnten sie mittels Immunhistochemie und PCR nachweisen, dass B7-H3 im Pankreaskarzinom überexprimiert ist. Sie führten immunhistochemische Färbungen an 59 Präparaten durch. Nur vier dieser Präparate waren B7-H3-negativ, was eventuell durch die extrem hohe Konzentration des verwendeten Antikörpers bei Inkubation über Nacht erklärt werden kann. Leider ist die Qualität der von ihnen veröffentlichten Färbungen nicht objektiv zu überprüfen, da in der Publikation nur Schwarz-Weiß-Fotos abgebildet sind (Yamato et al., 2009).

Im Folgenden korrelierten die Forscher die 55 B7-H3-positiv gefärbten Gewebe mit klinisch-pathologischen Patientendaten. Sie stellten so einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer hohen B7-H3-Expression und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen sowie einer fortgeschrittenen Tumorpathologie fest (Yamato et al., 2009).

Hier ist zunächst die Aussagekraft der Korrelation von Lymphknotenmetastasen und Tumor-Stadium mit der B7-H3-Expression kritisch zu hinterfragen, da die Zeitpunkte

von Diagnose und Operation ganz entscheidende Einflussfaktoren hierfür sind. Desweiteren ist anzumerken, dass Yamamoto et al. kein schlüssiges Scoringsystem unter Einbeziehung des Anteils der positiven Tumorzellen und der Signalintensität in ihrer Arbeit darlegten. Zudem bleibt unklar, warum die vier anfangs genannten B7-H3-negativen Gewebeproben nicht mehr in die Korrelationsanalyse einbezogen wurden.

Im funktionellen Teil ihrer Arbeit behandelten sie ein experimentelles Pankreaskarzinom (PAN02) im Mausmodell mit dem monoklonalen B7-H3-Antikörper MJ18 und konnten dabei nach B7-H3-Blockade einen signifikanten antitumoralen Effekt beobachten. Dass sie diesen Effekt nicht in vitro bestätigen konnten, scheint auf den ersten Blick seltsam, unterstreicht aber wahrscheinlich vor allem die Wichtigkeit des Zytokinmilieus in der Tumorumgebung für den B7-H3-vermittelten Antitumoreffekt. Dass die Autoren durch immunhistologische Analysen zu dem Ergebnis kamen, dass die Blockade von B7-H3 die CD8+-T-Zell-Infiltration im Tumorgewebe erhöhte, erscheint angesichts der oben dargelegten, recht eindeutigen Datenlage zur Beziehung zwischen CD8+-T-Zellen und B7-H3 verwunderlich (Yamamoto et al., 2009).

Natürlich muss neben der geringen Anzahl der untersuchten Versuchstiere (n=7 bzw.10) auch der potentielle Unterschied zwischen den Eigenschaften von murinem und humanem B7-H3 Anlass dazu geben, bei der Herstellung von Analogien zu B7-H3 im Pankreaskarzinom des Menschen Vorsicht walten zu lassen.

Eine grundlegende Eigenschaft wachsender Tumoren ist es, der normalen Immunabwehr zu entgehen. Das veränderte Zusammenspiel costimulatorischer, beziehungsweise coinhibitorischer Moleküle im Tumorgewebe ist hierbei ein Weg, Immuntoleranz zu erzeugen. Diese Balance zwischen Costimulation und Coinhibition

wird maßgeblich durch das Zytokinmilieu im Tumor beeinflusst (Seliger et al., 2008). Wie die Expression von costimulatorischen Molekülen im Tumor reguliert wird ist jedoch noch nicht geklärt. Für Entzündungsmediatoren wie Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Interleukin-4 (IL-4), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) konnte bislang nachgewiesen werden, dass sie die Expression von B7-H1 steigern (Seliger et al., 2008).

Wir konnten zeigen, dass B7-H3 in vitro in Pankreaskarzinomzellen durch IFN- $\gamma$  induzierbar ist.

Schon in der Erstbeschreibung von B7-H3 durch Chapoval et al. im Jahre 2001 wurde die Beziehung zwischen B7-H3 und IFN- $\gamma$  explizit herausgestellt. Es konnte in einem Costimulations-Assay nachgewiesen werden, dass B7-H3 die Proliferation von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen sowie die Entstehung zytotoxischer T-Zellen in vitro fördert. Desweiteren korrelierte die Inkubation von B7-H3 und Anti-CD3 selektiv mit einer gesteigerten IFN- $\gamma$ -Produktion von humanen T-Zellen, während eine blockierte B7-H3-Expression zu einer verringerten IFN- $\gamma$ -Produktion durch T-Zellen führte. Diese Beobachtungen führten zu dem Schluss, dass B7-H3 wahrscheinlich eine Rolle bei der Regulation der IFN- $\gamma$ -Produktion während der Aktivierungsphase der T-Zellen spielt (Chapoval et al., 2001).

Die Arbeitsgruppe um Suh untersuchte die Regulation von B7-H3 auf dendritischen Zellen. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass IFN- $\gamma$  die Expression von B7-H3 auf dendritischen Zellen steigert. Hierbei wurde allerdings eine Diskrepanz zwischen dem Effekt auf mRNA-Ebene und Proteinebene erkennbar, was über bisher unbekannte, posttranskriptionale Regulationsmechanismen von B7-H3 mutmaßen lässt (Suh et al., 2003).

Bezüglich IL-4 – einem typischen Zytokin der Th2-Antwort – konnte festgestellt werden, dass es die Expression von B7-H3 auf dendritischen Zellen herunter regulieren kann (Suh et al., 2003). Unsere Studie liefert in dieser Hinsicht auf den ersten Blick widersprüchliche Ergebnisse: IL-4 konnte die Expression von B7-H3 auf der Zelloberfläche von Pankreaskarzinomzelllinien steigern. Natürlich muss bedacht werden, dass es sich nicht um dendritische Zellen handelte. Es ist sehr gut vorstellbar, dass die Regulation der Expression in Tumorzellen von der physiologischen Regulation abgekoppelt ist.

Es bleibt also festzuhalten, dass außer der Assoziation von B7-H3 und IFN- $\gamma$  bis heute nicht viel über die Regulation der B7-H3-Expression – weder physiologisch noch pathophysiologisch im Zusammenhang mit Krebserkrankungen – bekannt ist.

Die oben zitierten Studien lieferten widersprüchliche Ergebnisse zur Rolle von B7-H3 im Rahmen der Immunantwort. Es wurden sowohl costimulatorische als auch coinhibitorische Eigenschaften beschrieben. Um diese Widersprüche zu erklären kann man zum Einen unterschiedliche Eigenschaften von B7-H3 bei Maus und Mensch anbringen, und zum Anderen auch die Existenz unterschiedlicher Rezeptoren für B7-H3 diskutieren. Als der Großteil der oben genannten Studien veröffentlicht wurde, war noch kein einziger Rezeptor für B7-H3 bekannt.

Im Jahre 2008 veröffentlichten Hashiguchi et al. eine Arbeit, in der sie erstmals einen für B7-H3 spezifischen Rezeptor beschrieben. Auf der Suche nach möglichen Rezeptorproteinen für B7-H3 stießen sie auf verschiedene cDNAs. Letztendlich stellte sich heraus, dass B7-H3 an TLT-2 („triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2“) mit einer Dissoziationskonstanten  $K_D$  von  $90 \pm 44$  nM bindet, was durchaus mit der Dissoziationskonstanten, mit der humanes B7-DC an humanes

PD-1 an der Zelloberfläche bindet, zu vergleichen ist. Es konnte durch Versuchsansätze, bei denen entweder B7-H3 oder TLT-2 mit Hilfe monoklonaler Antikörper geblockt wurde, festgestellt werden, dass es sich um eine direkte und spezifische Bindung handelt (Hashiguchi et al., 2008).

Mittels Durchflusszytometrie und PCR konnte gezeigt werden, dass TLT-2 auf frisch isolierten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, nicht jedoch auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen konstitutiv exprimiert wird. Während die Stimulation mit Anti-CD3-mAb TLT-2 auf der Zelloberfläche der CD4<sup>+</sup>-Subpopulation klar induzierte, blieb die TLT-2-Expression auf CD8<sup>+</sup>-T-Zellen – auch nach Aktivierung – nahezu unverändert. TLT-2-Expression konnte auch auf weiteren Subpopulationen von Immunzellen nachgewiesen werden: Geringe Mengen von TLT-2 konnten auf CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen sowie auf CD49<sup>+</sup>-NK-Zellen und CD11c<sup>+</sup> dendritischen Zellen gefunden werden. Erhebliche Level von TLT-2 konnten auf peritonealen B-1 (CD11b<sup>high</sup>, B220<sup>int</sup>), B-2 (CD11b<sup>low</sup>, B220<sup>high</sup>) und CD11b<sup>+</sup>-Makrophagen nachgewiesen werden. Dendritische Zellen im Knochenmark zeigten eine geringe TLT-2-Expression, wobei kein Unterschied zwischen reifen und unreifen DCs festzustellen war (Hashiguchi et al., 2008).

Hashiguchi et al. liefern allerdings auch funktionelle Daten: Sie transfizierten die Zelllinie P815 mit B7-H3 („B7-H3/P815“), sodass sie eine ca. 50-fach höhere B7-H3-Expression als der Wildtyp, der B7-H3 nur gering exprimiert, aufwies. Es wurden die Effekte der Co-Kultur von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mit dem Wildtyp-P815 oder B7-H3/P815 in Anwesenheit von Anti-CD3-mAb untersucht. Die Proliferation der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen sowie deren IFN- $\gamma$ -Produktion waren bei Stimulation mit Anti-CD3-mAb und B7-H3/P815-Zellen erheblich gesteigert. Bei den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen waren diesbezüglich keine substantiellen Unterschiede zwischen B7-H3-transfizierten und Wildtyp-P815-Zellen auszumachen. Diese Ergebnisse bestätigen zum Großteil die bereits in einer

Reihe von Publikationen aufgestellte Hypothese, dass B7-H3 costimulatorisch auf die CD8+-T-Zell-Antwort unter Steigerung der IFN- $\gamma$ -Produktion wirkt (Hashiguchi et al., 2008).

Nach der Transduktion von TLT-2 in CD4+- und CD8+-T-Zellen mithilfe eines retroviralen Vektors, wiesen beide T-Zell-Subpopulationen eine erhöhte Oberflächenexpression von TLT-2 auf. Dies korrelierte v.a. bei den CD8+-T-Zellen mit einer erhöhten INF- $\gamma$ -Produktion sowohl nach Stimulation mit B7-H3-transfizierten als auch mit Wildtyp P815 Zellen. In einem weiteren Experiment führte die Blockade von TLT-2 und von B7-H3 mittels monoklonaler Antikörper zu verminderten Kontakt-Hypersensitivitäts-Reaktionen.

In Zusammenschau aller Ergebnisse dieser Arbeit über den B7-H3-spezifischen Rezeptor TLT-2 kann also als nachgewiesen gelten, dass dieser Signalweg in der CD8+-T-Zell-Aktivierung eine einzigartige und costimulatorisch-positive Rolle spielt (Hashiguchi et al., 2008).

Dieselbe Forschergruppe berichtet in einer darauffolgenden Arbeit über B7-H3- und TLT-2-vermittelte Antitumorimmunität. Sie konnte nachweisen, dass tumorassoziiertes B7-H3 die antigenspezifische Aktivität zytotoxischer T-Zellen während der Effektorphase verstärkt. Fünf transplantierbare Tumorzelllinien wiesen nach Transfektion von B7-H3 ein vermindertes Wachstum und eine erhöhte Abstoßungsrate in immunkompetenten, syngenen Mäusen auf. Außerdem konnten Hinweise dafür gefunden werden, dass auf CD8+-T-Zellen exprimiertes TLT-2 die antigenspezifische Zytotoxizität durch direkte Interaktion mit B7-H3 steigert (Kobori et al., 2010).

Auch nach Entdeckung eines Rezeptors für B7-H3 und nachfolgenden Untersuchungen im Zusammenhang mit Tumoren sind die Eigenschaften von B7-H3 nicht abschließend geklärt (Hashiguchi et al., 2008; Kobori et al., 2010).

Wie kann man sich die äußerst heterogene Datenlage über die Rolle von B7-H3 erklären? Zunächst ist es möglich, dass neben TLT-2 weitere, bisher unbekannte Rezeptoren für B7-H3 existieren, über deren Bindung coinhibitorische Signale vermittelt werden. Desweiteren könnte die Expressionsstärke von B7-H3 für die Vermittlung verschiedener immunologischer Funktionen eine Rolle spielen. B7-H3 könnte verschiedene Bindungsaffinitäten für verschiedene Rezeptoren besitzen und so je nach Expressionsintensität costimulatorische oder coinhibitorische Funktionen ausüben. Ähnliches wurde auch schon für B7-1 – einem weiteren und bereits intensiver erforschten Mitglied der B7-Familie – berichtet. Im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass geringe B7-1-Expression im Kolonkarzinom ein möglicher Weg für den Tumor ist, der Bekämpfung durch das Immunsystem zu entkommen. Wahrscheinlich liegt dieser Beobachtung zugrunde, dass in geringem Maße exprimiertes B7-1 bevorzugt an den coinhibitorischen Rezeptor CTLA-4 bindet, zu dem es – im Vergleich zum costimulatorischen Rezeptor CD28 – eine 100- bis 1000-fach erhöhte Bindungsaffinität hat (Tirapu et al., 2006).

Im Hinblick auf die divergierenden Ergebnisse der retrospektiven Studien zur Expression von B7-H3 in verschiedenen Krebsentitäten kann als mögliche Erklärung angebracht werden, dass die Definition von B7-H3-Positivität über die einzelnen Forschergruppen hinweg nicht einheitlich erfolgte. So galten Magenkarzinomproben als B7-H3-positiv, sobald mehr als 20 Prozent der Tumorzellen positive Immunoreaktivität aufwiesen. Im Nierenzellkarzinom war B7-H3-Negativität als Immunoreaktivität bei weniger als 10 Prozent der Tumorzellen definiert. Teilweise

wurde die B7-H3-Intensität berücksichtigt und in das Scoring-System miteinbezogen, teilweise nicht (Wu et al., 2006; Crispen et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit zur B7-H3-Expression im Pankreaskarzinom haben wir eines der genauesten Scoring-Systeme, das sowohl den Anteil der B7-H3-positiven Tumorzellen als auch die Intensität der Immunoreaktivität berücksichtigt, benutzt.

Weiterhin müssen eventuelle Einflüsse der löslichen Form von B7-H3, dem sogenannten sB7-H3, in Betracht gezogen werden. Untersuchungen im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom zeigten, dass die sB7-H3-Serumspiegel positiv mit Tumor-Stadium, Tumorgröße, Lymphknotenmetastasen sowie Fernmetastasen korrelierten (Zhang et al., 2009).

Desweiteren besteht die Möglichkeit, dass Tumoren aberrante Formen von B7-H3 exprimieren, die von den existierenden Antikörpern nicht unterschieden werden können. In einem kürzlich erschienenen Artikel von Yi et al. äußerten die Autoren die Vermutung, dass viele der verwendeten, sogenannten blockierenden Antikörper auch eine intrinsische Aktivität an diversen Rezeptoren für B7-H3 ausüben könnten (Yi and Chen, 2009).

## Schlussfolgerung

Wir konnten nachweisen, dass B7-H3 im Pankreaskarzinom überexprimiert ist und dass das von Tumorzellen exprimierte B7-H3 signifikant mit einem längeren postoperativen Überleben korreliert.

Desweiteren konnten wir zeigen, dass die B7-H3-Expression mit einer erhöhten Anzahl tumorinfiltrierender CD8+-T-Zellen einhergeht. B7-H3 könnte somit über die Vermittlung costimulatorischer Signale zu einer verbesserten tumorspezifischen Immunantwort beitragen, die vor allem von CD8+-T-Zellen getragen wird.

Obwohl sicherlich weitere funktionelle Studien zur Funktion von B7-H3 im Pankreaskarzinom durchgeführt werden müssen, unterstützen unsere Daten die Hypothese, dass B7-H3 bei der tumorspezifischen Immunantwort im Pankreaskarzinom eine Rolle spielt.

Als positiver Costimulator der tumorgerichteten Immunantwort stellt B7-H3 möglicherweise einen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Therapien und Prognoseparameter dar.

## Zusammenfassung

Costimulatorischen Signalwegen wurde eine Rolle bei der Antitumorimmunität zugeschrieben. Die Funktion des costimulatorischen Liganden B7-H3 (CD 276) ist bisher weitgehend ungeklärt. Wir untersuchten mit Hilfe von PCR und Immunhistochemie die Expression von B7-H3 im duktalem Adenokarzinom des Pankreas. Die Gen-Expression von B7-H3 war im duktalem Adenokarzinom des Pankreas im Vergleich zum Normalgewebe deutlich erhöht und B7-H3-Protein konnte in Adenokarzinomzellen nachgewiesen werden. Eine hohe tumorassoziierte B7-H3-Expression korrelierte hierbei mit einem verlängerten Überleben der Patienten nach Tumorresektion sowie mit einer erhöhten Anzahl von tumorinfiltrierenden CD8+-T-Zellen. B7-H3 scheint also eine positive prognostische Rolle beim Pankreaskarzinom zu spielen.

## Abstract

Costimulatory signaling has been implicated as a potential regulator of antitumor immunity. Since the exact role of B7-H3 (CD 276) is still elusive, we investigated its expression in pancreatic ductal adenocarcinoma using immunohistochemistry and PCR. The expression of B7-H3 is upregulated in pancreatic ductal adenocarcinoma compared to normal pancreatic tissue and was detectable by immunohistochemistry in adenocarcinoma cells. Furthermore, high tumor B7-H3 expression correlated with prolonged postoperative survival and with the number of tumor-infiltrating CD8+ T-cells. Thus B7-H3 seems to play a positive prognostic role in pancreatic cancer.

## Literaturverzeichnis

- Bartsch DK, Kress R, Sina-Frey M, Grutzmann R, Gerdes B, Pilarsky C, Heise JW, Schulte KM, Colombo-Benkmann M, Schleicher C, Witzigmann H, Pridohl O, Ghadimi MB, Horstmann O, von Bernstorff W, Jochimsen L, Schmidt J, Eisold S, Estevez-Schwarz L, Hahn SA, Schulmann K, Bock W, Gress TM, Zugel N, Breitschaft K, Prenzel K, Messmann H, Endlicher E, Schneider M, Ziegler A, Schmiegel W, Schafer H, Rothmund M, Rieder H. 2004. Prevalence of familial pancreatic cancer in Germany. *Int J Cancer* 110:902-906.
- Bertram EM, Lau P, Watts TH. 2002. Temporal segregation of 4-1BB versus CD28-mediated costimulation: 4-1BB ligand influences T cell numbers late in the primary response and regulates the size of the T cell memory response following influenza infection. *J Immunol* 168:3777-3785.
- Bhatia S, Edidin M, Almo SC, Nathenson SG. 2006. B7-1 and B7-2: similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties. *Immunol Lett* 104:70-75.
- Bretscher P, Cohn M. 1970. A theory of self-nonself discrimination. *Science* 169:1042-1049.
- Chapoval AI, Ni J, Lau JS, Wilcox RA, Flies DB, Liu D, Dong H, Sica GL, Zhu G, Tamada K, Chen L. 2001. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat Immunol* 2:269-274.
- Chari ST, Leibson CL, Rabe KG, Ransom J, de Andrade M, Petersen GM. 2005. Probability of pancreatic cancer following diabetes: a population-based study. *Gastroenterology* 129:504-511.
- Crispen PL, Sheinin Y, Roth TJ, Lohse CM, Kuntz SM, Frigola X, Thompson RH, Boorjian SA, Dong H, Leibovich BC, Blute ML, Kwon ED. 2008. Tumor cell and tumor vasculature expression of B7-H3 predict survival in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 14:5150-5157.
- Erkan M, Kleeff J, Esposito I, Giese T, Ketterer K, Buchler MW, Giese NA, Friess H. 2005. Loss of BNIP3 expression is a late event in pancreatic cancer contributing to chemoresistance and worsened prognosis. *Oncogene* 24:4421-4432.
- Esposito I, Kleeff J, Bergmann F, Reiser C, Herpel E, Friess H, Schirmacher P, Buchler MW. 2008. Most pancreatic cancer resections are R1 resections. *Ann Surg Oncol* 15:1651-1660.
- Ficarra V, Galfano A, Novara G, Iafrate M, Brunelli M, Secco S, Cavalleri S, Martignoni G, Artibani W. 2008. Risk stratification and prognostication of renal cell carcinoma. *World J Urol* 26:115-125.
- Freitas D, Fernandes Gdos S, Hoff PM, Cunha JE. 2009. Medical management of pancreatic adenocarcinoma. *Pancreatology* 9:223-232.
- Fuchs CS, Colditz GA, Stampfer MJ, Giovannucci EL, Hunter DJ, Rimm EB, Willett WC, Speizer FE. 1996. A prospective study of cigarette smoking and the risk of pancreatic cancer. *Arch Intern Med* 156:2255-2260.
- Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. 2005. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 23:515-548.
- Hashiguchi M, Kobori H, Ritprajak P, Kamimura Y, Kozono H, Azuma M. 2008. Triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2 (TLT-2) is a counter-receptor for B7-H3 and enhances T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10495-10500.
- Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington de Gonzalez A, Barzi F, Woodward M. 2005. Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br J Cancer* 92:2076-2083.
- James TA, Sheldon DG, Rajput A, Kuvshinoff BW, Javle MM, Nava HR, Smith JL, Gibbs JF. 2004. Risk factors associated with earlier age of onset in familial pancreatic carcinoma. *Cancer* 101:2722-2726.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun M. 2009. Cancer Statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 59:225-249.
- Kalser MH, Barkin J, MacIntyre JM. 1985. Pancreatic cancer. Assessment of prognosis by clinical presentation. *Cancer* 56:397-402.

- Kloppel G, Kosmahl M, Luttges J. 2005. [Intraductal neoplasms of the pancreas: cystic and common.]. *Pathologe* 26:31-36.
- Kobori H, Hashiguchi M, Piao J, Kato M, Ritprajak P, Azuma M. 2010. Enhancement of effector CD8+ T-cell function by tumour-associated B7-H3 and modulation of its counter-receptor triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2 at tumour sites. *Immunology* 130:363-373.
- Laheru D, Jaffee EM. 2005. Immunotherapy for pancreatic cancer - science driving clinical progress. *Nat Rev Cancer* 5:459-467.
- Leach DR, Krummel MF, Allison JP. 1996. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271:1734-1736.
- Loos M, Giese NA, Kleeff J, Giese T, Gaida MM, Bergmann F, Laschinger M, M WB, Friess H. 2008. Clinical significance and regulation of the costimulatory molecule B7-H1 in pancreatic cancer. *Cancer Lett* 268:98-109.
- Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, Dimagno EP, Andren-Sandberg A, Domellof L. 1993. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med* 328:1433-1437.
- Luo L, Chapoval AI, Flies DB, Zhu G, Hirano F, Wang S, Lau JS, Dong H, Tamada K, Flies AS, Liu Y, Chen L. 2004. B7-H3 enhances tumor immunity in vivo by costimulating rapid clonal expansion of antigen-specific CD8+ cytolytic T cells. *J Immunol* 173:5445-5450.
- Lupu CM, Eisenbach C, Lupu AD, Kuefner MA, Hoyler B, Stremmel W, Encke J. 2007. Adenoviral B7-H3 therapy induces tumor specific immune responses and reduces secondary metastasis in a murine model of colon cancer. *Oncol Rep* 18:745-748.
- Luttges J, Kloppel G. 2005. [Pancreatic ductal adenocarcinoma and its precursors]. *Pathologe* 26:12-17.
- Ma L, Luo L, Qiao H, Dong X, Pan S, Jiang H, Krissansen GW, Sun X. 2007. Complete eradication of hepatocellular carcinomas by combined vasostatin gene therapy and B7H3-mediated immunotherapy. *J Hepatol* 46:98-106.
- Mahnke K, Ring S, Johnson TS, Schallenberg S, Schonfeld K, Storn V, Bedke T, Enk AH. 2007. Induction of immunosuppressive functions of dendritic cells in vivo by CD4+CD25+ regulatory T cells: role of B7-H3 expression and antigen presentation. *Eur J Immunol* 37:2117-2126.
- Martin-Fontecha A, Cavallo F, Bellone M, Heltai S, Iezzi G, Tornaghi P, Nabavi N, Forni G, Dellabona P, Casorati G. 1996. Heterogeneous effects of B7-1 and B7-2 in the induction of both protective and therapeutic anti-tumor immunity against different mouse tumors. *Eur J Immunol* 26:1851-1859.
- McWilliams RR, Rabe KG, Olswold C, De Andrade M, Petersen GM. 2005. Risk of malignancy in first-degree relatives of patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* 104:388-394.
- Michaud DS, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Fuchs CS. 2001. Physical activity, obesity, height, and the risk of pancreatic cancer. *JAMA* 286:921-929.
- Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, Campos D, Lim R, Ding K, Clark G, Voskoglou-Nomikos T, Ptasynski M, Parulekar W. 2007. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 25:1960-1966.
- Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H, Beger H, Fernandez-Cruz L, Dervenis C, Lacaine F, Falconi M, Pederzoli P, Pap A, Spooner D, Kerr DJ, Buchler MW. 2004. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 350:1200-1210.
- Prasad DV, Nguyen T, Li Z, Yang Y, Duong J, Wang Y, Dong C. 2004. Murine B7-H3 is a negative regulator of T cells. *J Immunol* 173:2500-2506.
- Roth TJ, Sheinin Y, Lohse CM, Kuntz SM, Frigola X, Inman BA, Krambeck AE, McKenney ME, Karnes RJ, Blute ML, Cheville JC, Sebo TJ, Kwon ED. 2007. B7-H3 ligand expression by prostate cancer: a novel marker of prognosis and potential target for therapy. *Cancer Res* 67:7893-7900.

- Seliger B, Marincola FM, Ferrone S, Abken H. 2008. The complex role of B7 molecules in tumor immunology. *Trends Mol Med* 14:550-559.
- Seufferlein T, Adler G. 2009. [The S3 guideline exocrine pancreatic cancer]. *Med Klin (Munich)* 104:869-874.
- Sharpe AH. 2009. Mechanisms of costimulation. *Immunol Rev* 229:5-11.
- Sharpe AH, Freeman GJ. 2002. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2:116-126.
- Shi C, Hruban RH, Klein AP. 2009. Familial pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med* 133:365-374.
- Suh WK, Gajewska BU, Okada H, Gronski MA, Bertram EM, Dawicki W, Duncan GS, Bukczynski J, Plyte S, Elia A, Wakeham A, Itie A, Chung S, Da Costa J, Arya S, Horan T, Campbell P, Gaida K, Ohashi PS, Watts TH, Yoshinaga SK, Bray MR, Jordana M, Mak TW. 2003. The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. *Nat Immunol* 4:899-906.
- Tirapu I, Huarte E, Guiducci C, Arina A, Zaratiegui M, Murillo O, Gonzalez A, Berasain C, Berraondo P, Fortes P, Prieto J, Colombo MP, Chen L, Melero I. 2006. Low surface expression of B7-1 (CD80) is an immunoescape mechanism of colon carcinoma. *Cancer Res* 66:2442-2450.
- Wagner M, Redaelli C, Lietz M, Seiler CA, Friess H, Büchler MW. 2004. Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma. *British Journal of Surgery* 91:586-594.
- Wang L, Fraser CC, Kikly K, Wells AD, Han R, Coyle AJ, Chen L, Hancock WW. 2005. B7-H3 promotes acute and chronic allograft rejection. *Eur J Immunol* 35:428-438.
- Wolchok JD, Saenger Y. 2008. The mechanism of anti-CTLA-4 activity and the negative regulation of T-cell activation. *Oncologist* 13 Suppl 4:2-9.
- Wu CP, Jiang JT, Tan M, Zhu YB, Ji M, Xu KF, Zhao JM, Zhang GB, Zhang XG. 2006. Relationship between co-stimulatory molecule B7-H3 expression and gastric carcinoma histology and prognosis. *World J Gastroenterol* 12:457-459.
- Yamato I, Sho M, Nomi T, Akahori T, Shimada K, Hotta K, Kanehiro H, Konishi N, Yagita H, Nakajima Y. 2009. Clinical importance of B7-H3 expression in human pancreatic cancer. *Br J Cancer* 101:1709-1716.
- Yi KH, Chen L. 2009. Fine tuning the immune response through B7-H3 and B7-H4. *Immunol Rev* 229:145-151.
- Zang X, Allison JP. 2007. The B7 family and cancer therapy: costimulation and coinhibition. *Clin Cancer Res* 13:5271-5279.
- Zang X, Thompson RH, Al-Ahmadie HA, Serio AM, Reuter VE, Eastham JA, Scardino PT, Sharma P, Allison JP. 2007. B7-H3 and B7x are highly expressed in human prostate cancer and associated with disease spread and poor outcome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19458-19463.
- Zhang G, Xu Y, Lu X, Huang H, Zhou Y, Lu B, Zhang X. 2009. Diagnosis value of serum B7-H3 expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 66:245-249.

## Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Jörg Kleeff für die Betreuung des Themas, die große Unterstützung und stets prompte Hilfe danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Martin Loos für die freundschaftliche und stets fachlich kompetente Betreuung, Beratung und Hilfestellung in allen Belangen.

Herzlichen Dank auch an Frau Prof. Dr. Irene Esposito für die Hilfe bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen, Herrn Tiago De Oliveira und Dr. Danguole Sauliunaite für die lehrreiche Unterstützung und fachliche Beratung bei der Laborarbeit.

Meinen Eltern Carola und Dr. Ulrich Hedderich für ihre Unterstützung in allen Lebensbereichen, die mir ein sorgenfreies Studium ermöglicht hat.