

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
Lehrstuhl für Ernährung und Immunologie

Immunmodulation durch CXC-Chemokine beim kolorektalen Karzinom

Larissa Renate Kistner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. H. Luksch
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. D. Haller
2. Priv.-Doz. Dr. K.-P. Janssen

Die Dissertation wurde am 06. Oktober 2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch das Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 26. Januar 2015 angenommen.

If I find 10.000 ways something won't work, I haven't failed. I am not discouraged, because every wrong attempt discarded is another step forward.

Thomas A. Edison

Für Sebastian

	Seite
<u>1 EINLEITUNG</u>	- 1 -
1.1 MOLEKULARGENETIK DER TUMORENTSTEHUNG IM KOLOREKTALEN KARZINOM	- 1 -
1.2 DAS KOLOREKTALE KARZINOM – KLINISCHE ASPEKTE	- 4 -
1.3 EINFLUSS DES IMMUNSYSTEMS AUF DIE TUMORENTSTEHUNG	- 9 -
1.4 CHEMOKINFAMILIEN UND IHRE REZEPTOREN	- 15 -
1.5 CXCR3 UND SEINE LIGANDEN CXCL9, CXCL10 UND CXCL11	- 18 -
1.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	- 22 -
<u>2 MATERIALIEN UND METHODEN</u>	- 24 -
2.1 BEZUGSQUELLENNACHWEIS	- 24 -
2.1.1 CHEMIKALIEN	- 24 -
2.1.2 GERÄTE	- 27 -
2.1.3 SOFTWARE	- 28 -
2.1.4 ENZYME	- 29 -
2.1.5 OP-BESTECK	- 29 -
2.1.6 VERBRAUCHSMATERIAL	- 30 -
2.1.7 MOLEKULARBIOLOGISCHE KITS UND SONSTIGES	- 31 -
2.2 MEDIEN UND PUFFER	- 32 -
2.2.1 STAMMLÖSUNGEN UND PUFFER	- 32 -
2.2.2 MEDIEN FÜR DIE ZELLKULTUR	- 34 -
2.3 ZELLINIEN UND VERSUCHSTIERE	- 36 -
2.3.1 ZELLINIEN	- 36 -
2.3.2 VERSUCHSTIERE	- 37 -
2.3.3 PATIENTEN	- 38 -
2.3.3.1 Patientenkollektiv	- 38 -
2.3.3.2 <i>Ex vivo</i> Organkultur	- 38 -
2.4 ANTIKÖRPER UND OLIGONUKLEOTIDE	- 40 -
2.4.1 ANTIKÖRPER FÜR IMMUNFLUORESCENZ	- 40 -
2.4.2 ANTIKÖRPER FÜR IMMUNHISTOCHEMIE (IHC)	- 41 -
2.4.3 OLIGONUKLEOTIDE	- 41 -
2.4.3.1 Oligonukleotide für die Genotypisierung	- 41 -
2.4.3.2 Oligonukleotide für die qRT-PCR	- 42 -
2.4.3.3 Oligonukleotide für die Klonierung und Sequenzierung	- 44 -

2.5	METHODEN	- 45 -
2.5.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	- 45 -
2.5.1.1	Isolierung von DNA für die Genotypisierung	- 45 -
2.5.1.2	Restriktionsverdau zum Ausschneiden spezifischer DNA Fragmente aus Vektoren und PCR-Produkten	- 45 -
2.5.1.3	Ligation von DNA-Molekülen	- 46 -
2.5.1.4	Aufreinigung von DNA für die Sequenzierung	- 46 -
2.5.1.5	Isolierung von RNA	- 46 -
2.5.1.5.1	Isolierung gesamtzellulärer RNA aus Gewebeproben	- 46 -
2.5.1.5.2	RNA Isolierung von Zellen	- 47 -
2.5.1.6	Bestimmung der RNA-Konzentration	- 47 -
2.5.1.7	Aufreinigung von PCR-Produkten für die Klonierung	- 47 -
2.5.1.8	cDNA Synthese (Reverse Transkription)	- 47 -
2.5.1.9	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	- 48 -
2.5.1.10	<i>Real-time</i> PCR	- 48 -
2.5.1.11	Auftrennung von PCR-Produkten im Agarosegel	- 50 -
2.5.1.12	Plasmidisolierung aus E.coli K12	- 50 -
2.5.1.13	Transformation von kompetenten E.coli K12	- 50 -
2.5.1.14	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Gelstücken	- 51 -
2.5.2	TIEREXPERIMENTELLE METHODEN	- 51 -
2.5.2.1	Orthotope Zellimplantation	- 51 -
2.5.2.2	Blutentnahme im Finalversuch	- 52 -
2.5.2.3	Organentnahme	- 53 -
2.5.2.4	Murine <i>ex vivo</i> Organkultur	- 53 -
2.5.2.5	Gewebefixierung (<i>Tissue Fix</i>)	- 53 -
2.5.2.6	Kryoschnitte	- 53 -
2.5.2.7	Paraffinschnitte	- 54 -
2.5.3	IMMUNHISTOCHEMISCHE METHODEN	- 54 -
2.5.3.1	Hämatoxylin und Eosin Färbung (HE)	- 54 -
2.5.3.2	Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten	- 54 -
2.5.3.3	IHC Färbung von Kryoschnitten	- 55 -
2.5.3.4	Immunfluoreszenz Färbung von Kryoschnitten	- 55 -
2.5.4	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	- 56 -
2.5.4.1	Kultivierung von Zelllinien	- 56 -
2.5.4.2	Bestimmung der Zellzahl	- 56 -

2.5.4.3	Generierung von stabilen Klonen für die orthotope Zellimplantation	- 56 -
2.5.4.4	Präparation von Zellen zur orthotopen Zellimplantation	- 56 -
2.5.4.5	Auftauen von Zellen	- 57 -
2.5.4.6	Einfrieren von Zellen	- 57 -
2.5.4.7	Stimulation von Zellen	- 57 -
2.5.4.8	Proliferationsanalyse verschiedener Zelllinien	- 57 -
2.5.4.9	Zellmigrationsassay	- 58 -
2.5.4.10	Nachweis von Chemokinen mittels ELISA	- 58 -
2.5.5	STATISTISCHE METHODEN	- 59 -
3	ERGEBNISSE	- 60 -
3.1	TEIL I: DIE ROLLE VON CXC-CHEMOKINEN BEIM KOLOREKTALEN KARZINOM - BEFUNDE AN PATIENTENPROBEN	- 60 -
3.1.1	ÜBERSICHT DES UNTERSUCHTEN KOLLEKTIVS VON PATIENTEN MIT KOLOREKTALEN TUMOREN	- 60 -
3.1.2	TRENNWERTANALYSE DER CXC-CHEMOKIN UND GRANZYM B EXPRESSION ZUR EINTEILUNG DER PATIENTEN IN ZWEI GRUPPEN	- 62 -
3.1.3	MULTIVARIATE ANALYSE ZUR VALIDIERUNG VON CXCL11 ALS UNABHÄNGIGEN PROGNOSEPARAMETER	- 63 -
3.1.4	UNTERSCHIEDLICHE EXPRESSION VON CXC-CHEMOKINEN UND GRANZYM B IM VERGLEICH VON NORMALSCHLEIMHAUT UND TUMORGEWEBE	- 64 -
3.1.5	VERGLEICH VON NORMAL-, TUMOR- UND METASTASENGEBEWE DER GLEICHEN PATIENTEN	- 66 -
3.1.6	ZUSAMMENHANG DER AUSPRÄGUNG VON GRANZYM B, CXCL9, CXCL10 UND CXCL11 MIT ÜBERLEBEN UND REZIDIVBILDUNG	- 67 -
3.1.7	KORRELATION DER GENEXPRESSION DER CXC-CHEMOKINE CXCL9-11 UND GRANZYM B	- 70 -
3.1.8	DIE INTRATUMORALE CXCL11 EXPRESSION IN KOLONKARZINOMEN DES UICC STADIUM II, SOWIE ANALYSE DES PRÄDIKTIONSPOTENTIALS FÜR REZIDIVBILDUNG	- 71 -
3.1.9	EINFLUSS VON CXCL10 AUF DIE MIGRATION UND PROLIFERATION <i>IN VITRO</i>	- 72 -
3.1.10	ERMITTLUNG DER CXC-CHEMOKIN AUSPRÄGUNG IN UNTERSCHIEDLICHEN ZELLTYPEN	- 74 -
3.1.10.1	Expressionsanalyse von CXCL11 in humanen Zelllinien durch qRT-PCR	- 74 -
3.1.10.2	In vitro Analyse der Chemokinexpression auf Proteinebene mittels ELISA	- 75 -
3.1.10.3	Immunologischer Nachweis von CXCL11 auf Gewebeschnitten	- 77 -
3.1.11	ERMITTLUNG DER BLUTGEFÄßDICHTHE IN ABHÄNGIGKEIT DER CHEMOKINEXPRESSION IN PATIENTENPROBEN	- 79 -
3.1.12	IMMUNZELLINFILTRAT IN ABHÄNGIGKEIT DER CHEMOKINEXPRESSION IN PATIENTENPROBEN	- 80 -
3.1.12.1	Quantifizierung des intratumoralen Infiltrats von CD3 ⁺ Zellen auf Gewebeschnitten	- 80 -
3.1.12.2	IHC Analyse der infiltrierenden T-Zell Subtypen innerhalb des Tumorgewebes	- 81 -

3.1.12.3	qRT-PCR Analyse des intratumoralen Infiltrats	- 82 -
3.1.13	EX VIVO ORGANKULTUR VON NORMAL- UND TUMORGEWEBE	- 84 -
3.2	TEIL II: DIE ROLLE DER CXC-CHEMOKINEXPRESSION BEI KOLONKARZINOMEN: BEFUNDE AN MAUSMODELLEN	- 86 -
3.2.1	GENETISCHE MAUSMODELLE UND ZELLINIEN	- 86 -
3.2.1.1	Expressionsanalyse der Chemokine in transgenen Modellen für Darmkrebs	- 86 -
3.2.1.2	Expression von CXC-Chemokinen <i>in vitro</i>	- 88 -
3.2.1.3	Identifizierung der intratumoralen Immunzellinfiltrate auf m-RNA Ebene	- 90 -
3.2.1.4	Ex vivo Organkultur von murinem Tumorgewebe	- 91 -
3.2.2	ORTHOTOPES TUMORIMPLANTATIONSMODELL	- 92 -
3.2.2.1	Einfluss von CXCL10 auf die Migration und Proliferation von Tumorzellen <i>in vitro</i>	- 93 -
3.2.2.2	Herstellung und Klonierung von Vektoren	- 94 -
3.2.2.3	Charakterisierung der generierten stabilen Klone muriner Tumorzellen	- 95 -
3.2.2.3.1	CXCL10 Ausprägung auf Proteinebene	- 96 -
3.2.2.3.2	Proliferationsanalyse ausgewählter Tumorzellklone	- 96 -
3.2.2.4	Etablierung der intrarektalen Zellimplantation in immunkompetente Balb/c- sowie immundefiziente Rag1 ^{-/-} -Mäuse	- 98 -
3.2.2.4.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Tumoren des orthotopen Mausmodells	- 99 -
3.2.2.4.2	Makroskopische Tumoranalyse	- 100 -
3.2.2.4.3	CXCL10 Proteinkonzentration im Serum	- 102 -
3.2.2.4.4	Immunfluoreszenzfärbung der intratumoralen CD3 ⁺ Zellen	- 104 -
3.2.2.4.5	Identifizierung der intratumoralen Immunzellinfiltrate auf m-RNA Ebene	- 105 -
4	DISKUSSION	- 107 -
4.1	AUSPRÄGUNG UND KLINISCHE BEDEUTUNG VON CXC-CHEMOKINEN BEIM KOLOREKTALEN KARZINOM	- 109 -
4.1.1	AUSPRÄGUNG VON CXC-CHEMOKINEN IN PATIENTENPROBEN	- 109 -
4.1.2	ZUSAMMENHANG ZWISCHEN CXC-CHEMOKINEXPRESSION UND PROGNOSE	- 109 -
4.1.2.1	Produzenten von CXC-Chemokinen und deren Regulation	- 111 -
4.1.2.2	Auswirkungen der CXC-Expression: Angiostase und Lymphozyten-Infiltration durch Bindung an CXCR3	- 112 -
4.1.2.3	Konsequenz der CXC-Expression: intratumorale T-Zellinfiltration des T _H 1-Typs	- 116 -
4.2	DIE ROLLE VON CXC-CHEMOKINEN IN DER INTESTINALEN TUMORGENESE: BEFUNDE AUS PRÄKLINISCHEN MAUSMODELLEN	- 122 -
4.2.1	TUMORLAST TRANSGENER MAUSMODELLE IN KORRELATION ZUR INTRATUMORALEN CXC-CHEMOKINEXPRESSION	- 123 -

4.2.2	REGULATION DER CXC-CHEMOKINPRODUKTION UND DEREN URSPRUNG	- 125 -
4.2.3	CXC-CHEMOKINAUSPRÄGUNG IN MAUSMODELLEN: ZUSAMMENHANG VON ANGIOSTASE UND REKRUTIERUNG VON T-LYMPHOZYTEN	- 126 -
4.2.4	HAT DIE CXC-CHEMOKINEXPRESSION EINEN KAUSALEN EINFLUSS AUF DIE TUMORENTSTEHUNG? ETABLIERUNG EINES ORTHOTOPEN MAUSMODELLS	- 128 -
4.2.4.1	Ermittlung einer geeigneten Zelllinie für die orthotope Implantation	- 128 -
4.2.4.2	Genetische Modifikation der CT26-Zellen	- 129 -
4.2.4.3	Das orthotope Mausmodell	- 131 -
4.2.4.4	Systemischer vs. intratumoraler Nachweis der CXCL10 Expression	- 132 -
4.3	VERGLEICHENDE BETRACHTUNG DER BEFUNDE AUS MAUSMODELLEN MIT KLINISCHEN DATEN	- 133 -
4.3.1	CXC-CHEMOKINAUSPRÄGUNG INDUZIERT T-LYMPHOZYTENINFILTRATION UND HEMMT ANGIOGENESE BEI DARMKREBS	- 136 -
4.4	AUSBLICK	- 138 -
5	ZUSAMMENFASSUNG	- 140 -
6	SUMMARY	- 141 -
7	DANKSAGUNGEN	- 142 -
8	LITERATURVERZEICHNIS	- 144 -
9	ANHANG	- 162 -
9.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	- 162 -
9.2	TABELLENVERZEICHNIS	- 164 -
9.3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	- 165 -
9.4	VEKTORENKARTEN	- 169 -

1 Einleitung

1.1 Molekulargenetik der Tumorentstehung im kolorektalen Karzinom

Die Ausbildung solider Tumore ist ein komplexer Vorgang, der sich in der Regel über Jahrzehnte erstreckt. Normale Zellen entwickeln sich hierbei zu Zellen mit einem neoplastischen Phänotyp durch einen Vorgang, der als Tumorprogression bezeichnet wird. Dieser Vorgang wird durch zufällig auftretende Mutationen und epigenetische Veränderungen der DNA angetrieben (vergleiche *Weinberg, 2007* und *Fearon und Vogelstein, 1990*).

In den vergangenen Jahrzehnten wurde sowohl die Initiation als auch das Fortschreiten des kolorektalen Karzinoms umfangreich erforscht. Es wurden zwei Untergruppen von Tumoren identifiziert, die sich im Ausmaß der genomischen Stabilität deutlich unterscheiden. Dies sind Läsionen mit Mikrosatelliteninstabilität (MSI) oder mit einer chromosomalen Instabilität (CIN) (*Banerjea, A. et al., 2005a*). Etwa 85% der sporadischen kolorektalen Karzinome haben einen CIN-Phänotyp. Es handelt sich hierbei um ein allelisches Ungleichgewicht verschiedener Chromosomen-Loci (5q, 8p, 17p und 18q), sowie der Amplifikation und Translokation in diesen Regionen, was zusammen zu einer Tumoreuploidie führt (*Abal et al., 2007; Cunningham, D. et al., 2010b; Lengauer et al., 1998; Lothe et al., 1993; Vogelstein et al., 1988; Vogelstein et al., 1989*). Die verbleibenden 15% der Läsionen weisen eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) mit Mutationen auf, die zu einer Verschiebung des Leserasters führen. Dies geht einher mit Basenpaarsubstitutionen, die in der Regel in kurzen, sich wiederholenden Nukleotidsequenzen (den Mikrosatelliten) stattfinden (*Aaltonen et al., 1993; Ionov et al., 1993*).

Der MSI-Status gibt hierbei Informationen über die Unfähigkeit des DNA Nukleotid *mismatch* Reparatursystems, auftretende Fehler während der DNA-Replikation zu beheben. Diese werden durch die Akkumulierung von Einzelnukleotidmutationen und Längenänderungen in repetitiven Mikrosatellit-Nukleotid-Sequenzen, die häufig im Genom vorkommen, hervorgerufen (*Cunningham, D. et al., 2010b*). Tumore mit einer hohen Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) werden mit einer besseren Überlebensrate der Patienten in Verbindung gebracht. Ein Grund hierfür scheint das bessere

Angreifen der Chemotherapie zu sein, was mit einer höheren Anzahl an tumorinfiltrierenden Lymphozyten einhergeht (*Banerjea, A. et al., 2005a*). Des Weiteren sind MSI-Tumore durch deren proximale Lokalisation, schlechte Differenzierung und lymphozytische Infiltration gekennzeichnet (*Kim und Kang, 2014*). Die genetischen Mechanismen, die zu diesem Phänotyp führen, sind Mutationen oder ein Aktivitätsverlust (*loss of function*) durch epigenetische Veränderungen der DNA der *mismatch repair* Gene (*Cunningham et al., 1998; Kane et al., 1997*). In den meisten sporadischen Fällen des kolorektalen Karzinoms (CRC) kommt es zu einer Mikrosatelliteninstabilität, wenn die Promotorregion der Gene des *mismatch repair* Systems durch Hypermethylierung von CpG Inseln stillgelegt wird (*Cunningham, D. et al., 2010a; Cunningham et al., 1998*). Die für MSI-Tumore charakteristische Infiltration durch Lymphozyten wird als Ursache der besseren Prognose für Mikrosatelliten instabile Kolorektalkarzinome angesehen. Es wird angenommen, dass die tumorinfiltrierenden Lymphozyten spezifisch auf die, aus Mikrosatelliteninstabilität resultierenden, Tumorpeptide reagieren (*Tougeron et al., 2013*).

Auf molekularer Ebene sind Mutationen ein wichtiger Indikator für die Prädisposition einer Tumorbildung. Bei den dynamischen Veränderungen des Genoms ist das Hauptaugenmerk auf zwei Gruppen von Genen zu richten: Tumorsuppressorgene, welche einen Aktivitätsverlust erfahren, sowie Onkogene, bei denen es zu einem Aktivitätsgewinn (*gain of function*) kommt (*Knudson, 2001*). Onkogene entstehen, sobald ein einzelnes Allel des Protoonkogens mutiert. Im Gegensatz dazu müssen beide Allele eines Tumorsuppressorgens mutieren, um dieses zu inaktivieren (*Hanahan und Weinberg, 2000*).

Im CRC ist K-RAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) ein häufig mutiertes Onkogen aus der Gruppe der GTPasen (*Bos et al., 1987; Shields et al., 1999*). Es wird häufig die 12. Aminosäure, ein Glycinrest, in einen Valin- oder Aspartatrest umgewandelt. Diese Enzyminaktivierung führt dazu, dass kein GTP mehr abgespalten werden kann, womit das onkogene K-RAS in einen daueraktiven Zustand versetzt wird. Es konnte nachgewiesen werden, dass durch onkogenes K-RAS Darmtumore ausgelöst werden können, auch in Abwesenheit von Mutationen im WNT-Signalweg (*Janssen et al., 2002; Janssen, 2003; Janssen et al., 2005*). Für die Tumorentwicklung ist neben der Aktivierung von Onkogenen auch noch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen von entscheidender Bedeutung. Diese

kodieren häufig für Proteine, die eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion, Apoptose, DNA-Reparatur und in der Hemmung der Zellproliferation spielen. Das am häufigsten mutierte Tumorsuppressorgen p53 kontrolliert den Zellzyklus am G₁-S Kontrollpunkt und löst im Falle einer nicht reparablen DNA Schädigung Apoptose aus (*Bourdon, 2007*). Zur Entwicklung des kolorektalen Karzinoms ist in der Regel die Mutation von vier bis sechs Genen erforderlich (*Knudson, 2001*). Die kolorektale Karzinogenese ist ein stufenweiser Prozess (*Fre et al., 2008*). Er führt von den normalen Darmepithelzellen über aberrante Krypten (*abberant crypt foci*) zum gutartigen Adenom und schließlich zum Karzinom (*Fearon und Vogelstein, 1990*) (siehe Abbildung 1).

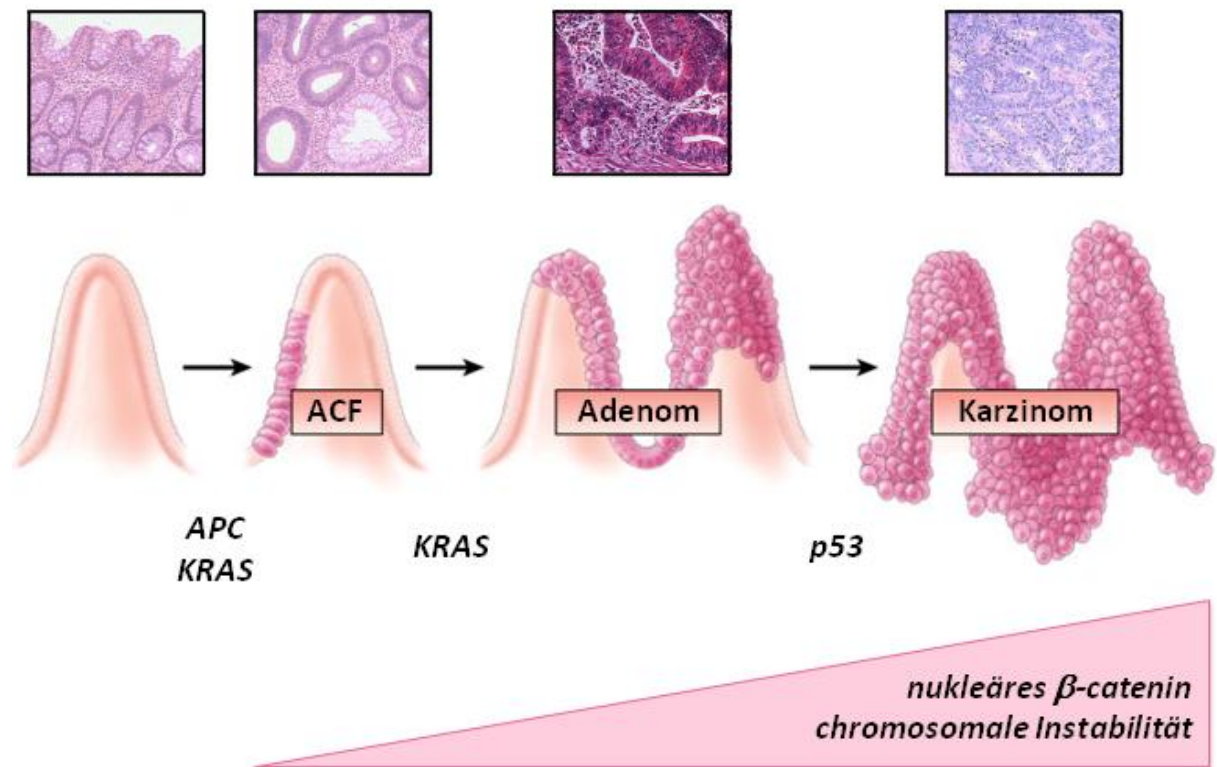


Abbildung 1: Adenom-Karzinom Sequenz. Genetische Veränderungen von einer normalen Epithelzelle über aberrante Krypten (ACF) und das Adenom hin zum malignen Karzinom in einer schematischen Darstellung des Dünndarms mit der Achse Krypte/Villus. Dieser Verlauf wird durch die Abbildung vereinfacht dargestellt, sowie von den darüber abgebildeten immunhistochemischen Färbungen verifiziert (modifiziert nach *Fearon und Vogelstein, 1990; Grady und Carethers, 2008; Terzic et al., 2010*).

In der Entstehung des kolorektalen Karzinoms kommt es zu Beginn zu einer genetischen Veränderung des Tumorsuppressorgens APC. Dieses Gen ist in 60-80% der sporadischen Fälle mutiert. Das vom APC Gen kodierte Protein spielt eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion, Zelladhäsion, Zellmigration, Segregation von Chromosomen und demzufolge der genetischen Stabilität (*Polakis, 1997*). Das

Signalmolekül β -Catenin ist eine zentrale Komponente des Wnt-Signalwegs und wird durch das APC-Protein als Bestandteil eines Multiproteinkomplexes des sogenannten „*destruction complex*“, negativ reguliert. Eine APC-Mutation führt meist dazu, dass β -Catenin auf Proteinebene stabilisiert wird, im Zytosol akkumuliert und sich in den Zellkern bewegt. Im Nukleus bindet es an Transkriptionsfaktoren der T-Zellfaktor-Familie (TCF/LEF), und fungiert somit als Ko-Aktivator der Transkription, was sich z.B. in verstärkter Ausprägung des Signalmoleküls Osteopontin äußert (Rohde et al., 2007). Diese kanonische WNT-Signalwegsaktivierung führt zu einer drastischen Veränderung der Zelltransformation und Polypenbildung.

1.2 Das kolorektale Karzinom – klinische Aspekte

Das kolorektale Karzinom (CRC) ist die dritthäufigste Krebserkrankung innerhalb der USA (Siegel et al., 2014) und weltweit (Tenesa und Dunlop, 2009). In Europa zählt es zur zweithäufigsten Krebserkrankung, wobei die Häufigkeit stetig ansteigt (Zavoral et al., 2014). Jährlich werden mehr als 500.000 Todesfälle damit in Verbindung gebracht, wobei die Mehrzahl dieser Fälle in den Industrienationen auftritt (Oladipo et al., 2011). Die meisten Patienten mit CRC versterben an Metastasen in Leber und Lunge (Chambers et al., 2002).

Es ist in weniger entwickelten Ländern eine steigende Anzahl von Patienten zu beobachten, die mit der Zunahme des westlichen Lebensstils in Zusammenhang steht (Curado et al., 2007). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, wie wichtig der Einfluss von Umweltfaktoren auf die Karzinogenese ist (Parkin et al., 2005). Neben den Umweltfaktoren nehmen auch unterschiedliche Lebensgewohnheiten Einfluss auf die Entwicklung von CRC. Die Eckpfeiler der kolorektalen Krebsvorsorge sind aus diesem Grund die Vorsorgeuntersuchungen und die somit ermöglichte Entdeckung von adenomatösen Polypen, gutartigen Tumorfrühformen. Einen positiven und präventiven Effekt zeigt eine gesunde sowie ballaststoffreiche Kost, ein gewisser Grad an körperlicher Fitness, das Vermeiden von Noxen wie Rauchen und Alkoholgenuss, sowie die Einnahme von Aspirin und nicht steroidaler, entzündungshemmender Medikamente. Im Gegensatz dazu stellt die Ernährung mit rotem Fleisch einen weiteren Risikofaktor dar (Chan und Giovannucci, 2010).

Doch nicht nur äußere Faktoren nehmen Einfluss auf die Entstehung des kolorektalen Karzinoms. Eine genetische Prädisposition kann ebenfalls zu dessen Entwicklung führen. Hereditäre Faktoren spielen eine Rolle in bis zu 30% der sich

entwickelnden kolorektalen Karzinome (*de la Chapelle, 2004*). Erbliche Darmtumore gehen häufig auf zwei bekannte Syndrome zurück. Bei der familiären adenomatösen Polyposis coli (FAP-Syndrom) treten mehr als 100 adenomatöse Polypen im Dickdarm von Patienten im Alter von 20-40 Jahren auf. Diese erbliche Tumorerkrankung ist auf eine Mutation des APC Gens (*adenomatous polyposis coli*) zurückzuführen. Beim hereditären non-polyposis coli Syndrom, auch bekannt als Lynch Syndrom, entstehen die Tumore ebenfalls aus Adenomen, doch der Grad der Polypose ist geringer als in FAP-Patienten. Diese Tumore haben ein heterogenes Spektrum, dessen Phänotyp deutlich schwerer zu definieren ist als beim FAP-Syndrom. In der Regel sind jedoch Mutationen in den DNA *mismatch repair* Genen zu finden (*Banerjea, A. et al., 2005b*). Neben den Lebensumständen und der familiären Vorgeschichte des Patienten kann auch eine der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen zu einem erhöhten Risiko kolorektaler Tumore führen. Bei den häufigsten dieser Erkrankungen handelt es sich um Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa. Dies sind Autoimmunerkrankungen, die durch eine kontinuierliche Aktivierung des Immunsystems körpereigene Epithelzellen im Darm angreifen. Diese Entzündungen können sich vom Rektum bis hin zur Mundschleimhaut ausbreiten. Der kontinuierliche Entzündungszustand des Darms zieht ein erhöhtes Risiko der Tumorbildung im Kolon und Rektum nach sich (*Jawad et al., 2011*).

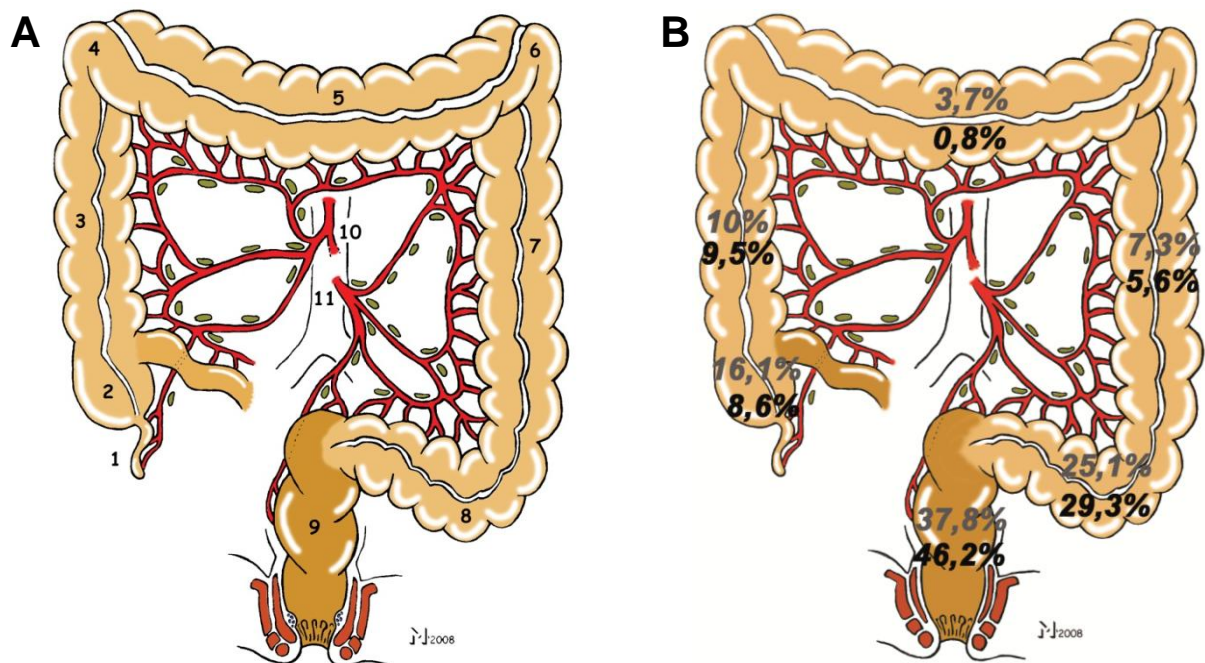


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Dickdarms und die prozentuale Verteilung der CRC. A: Der Dickdarm, bestehend aus 1 Appendix, 2 Zökum, 3 Colon ascendens, 4 rechter Kolonflexur, 5 Colon transversum, 6 linker Kolonflexur, 7 Colon descendens, 8 Colon sigmoideum, 9 Rektum, 10 oberer Mesenterialarterie und 11 unterer Mesenterialarterie (Maak, 2008); B: Lokalisation der Kolontumore im Jahr 1984 (schwarz) und 1996 (grau) (modifiziert nach Maak, 2008 und Mensink et al., 2002).

Abbildung 2 zeigt, dass die Tumore im distalen Kolon (Colon sigmoideum 25,1% und Rektum 37,8%) 1996 mit 62,9% einen Großteil der Läsionen im Dickdarm ausmachen. In den vorangegangenen Jahrzehnten war eine scheinbare „rechtsseitige Verlagerung“ der Kolontumore zu beobachten. Die Gesamtmenge der nachgewiesenen rechtsseitigen bzw. proximalen Läsionen in Zökum, Colon ascendens, Colon transversum und Colon descendens betrug im Jahr 1981 insgesamt 24,5%, stieg jedoch bis 1996 auf 37,1% an. Hierbei erhöhte sich der prozentuale Anteil der Tumore im Zökum von 8,6% auf 16,1%, im Colon ascendens von 9,5% auf 10%, im Colon transversum von 0,8% auf 3,7% und im Colon descendens von 5,6% auf 7,3% (Mensink et al., 2002). Es erfolgte ein Rückgang der linksseitigen bzw. distalen Tumore, deren Anteil von 75,5% 1981 auf 62,9% 1996 gesunken ist. Diese Veränderung in der Lokalisation wird darauf zurückgeführt, dass durch die Koloskopie linksseitige distale Polypen bereits frühzeitig erkannt und dadurch entfernt werden können, bevor es zu einer Transformation zu einem Kolonkarzinom kommt. Dies unterstützt die Theorie des positiven Einflusses der Koloskopie auf die Prävention von CRCs. Es ist allerdings zu beachten, dass die Sigmoidoskopie, also die endoskopische Untersuchung der distalen Darmregion,

nicht die optimale Vorbeugungsuntersuchung darstellt, da hierbei die proximalen Regionen des Kolon nicht in Augenschein genommen werden können (*Mensink et al., 2002*).

Nach Diagnose eines kolorektalen Karzinoms wird dieses in Abhängigkeit des Stadiums, des Befindens des Patienten und der ärztlichen Meinung chirurgisch entfernt, was dazu führt, dass der Patient je nach Tumorstadium als tumorfrei und geheilt betrachtet werden kann.

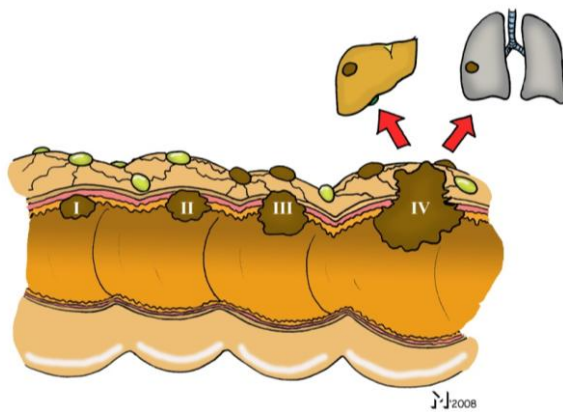


Abbildung 3: Dickdarmkrebstumorstadien UICC I-IV. TNM Klassifikation von Tumorproben führt zur Einteilung in die UICC Klassen I-IV. UICC I: T1 oder T2 N0 M0; UICC II: T3 oder T4 N0 M0; UICC III: Tx N1 oder N2 M0 (Lymphknotenmetastasen) und UICC IV: Tx Nx M1 (Fernmetastasen) (*Maak, 2008; Rosenberg et al., 2010*).

Nach Entnahme der resezierten oder biopsierten Tumorproben werden diese histopathologisch untersucht und aufgrund der TNM Klassifizierung in die AJCC/UICC Stadien I-IV unterteilt (vergleiche Abbildung 3). Die Bestimmung des Tumorstadiums fasst die verfügbaren Daten, die die Tumorlast (T), Nachweis von Krebszellen in den Lymphknoten (N) und Anzeichen für Metastasen (M) betreffen, zusammen. Diese Art der Klassifizierung basiert also ausschließlich auf Parametern der Tumorinvasion. Patienten in einem frühen Tumorstadium haben eine gute Prognose (5-Jahresüberleben > 90%) und benötigen keine Chemotherapie (UICC I und II). Allerdings bekommen 20% dieser Patienten ein Rezidiv (*Nitsche et al., 2012*). In einem fortgeschrittenen Stadium überleben allerdings weniger als 10% der Patienten mehr als 5 Jahre nach der Diagnose (*Cunningham et al., 2004; Jemal et al., 2007*). Die TNM Klassifizierung hat sich als sehr nützlich für die Abschätzung des klinischen Verlaufs der Krankheit und somit die passende Wahl der Therapie erwiesen (*Galon et al., 2012; Locker et al., 2006; Weitz et al., 2005*). Nichtsdestotrotz bietet die Klassifikation nur eingeschränkte Informationen über den Verlauf und die Prognose der Krankheit, denn der Krankheitsverlauf kann in Patienten des gleichen histologischen Krankheitsstadiums stark unterschiedlich verlaufen (*Mlecnik et al., 2011*). Patienten mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium können über Jahre stabil bleiben, wohingegen Patienten in einem frühen Tumorstadium einen rapiden

Krankheitsverlauf aufweisen können, welcher bis zum Tod führt (*Mlecnik et al., 2011*). Ein Grund für diese beobachteten Diskrepanzen könnte darin begründet liegen, dass die TNM-Klassifizierung von der Annahme ausgeht, dass es sich bei der Tumorprogression um einen weitestgehend zellautonomen Prozess handelt. Es werden also lediglich die Krebszellen und ihr Invasionspotential betrachtet, und die Immunantwort des Patienten völlig außer Acht gelassen (*Bindea et al., 2010*) (vergleiche 1.3 Abbildung 4). Die meisten Tumore sind allerdings mit einer Vielzahl von Immunzellen infiltriert (*Finn, 2008*). Die Klassifizierung dieser Immunzellinfiltrate hat einen hervorragenden prognostischen Wert, der einigen Studien zufolge die etablierte TNM-Klassifizierung deutlich an Genauigkeit übertrifft (*Fridman et al., 2011; Galon et al., 2012; Mlecnik et al., 2011*).

1.3 Einfluss des Immunsystems auf die Tumorentstehung

Sowohl die Entwicklung als auch die Aggressivität von soliden Tumoren wird stark durch das Mikromilieu des Tumors beeinflusst (Dunn et al., 2004). Hierbei spielen insbesondere Komponenten des Immunsystems eine wichtige Rolle (Hanahan und Weinberg, 2000). So ist sowohl das angeborene, als auch das adaptive Immunsystem dazu in der Lage, den Patienten mittels Mechanismen der Immunüberwachung gegen die Tumorentwicklung zu schützen (Dunn et al., 2004; Kim et al., 2007; Mlecnik et al., 2011; Smyth et al., 2006). Es ist wichtig, den Tumor als komplexes interagierendes Gewebe zu betrachten, und nicht als isolierte Masse, die lediglich aus Tumorzellen besteht. Im Jahr 2000 publizierten Hanahan und Weinberg die *Hallmarks of Cancer*, worin sie unter anderem auf diesen Zustand hinwiesen (vergleiche Abbildung 4 Hanahan und Weinberg, 2000).

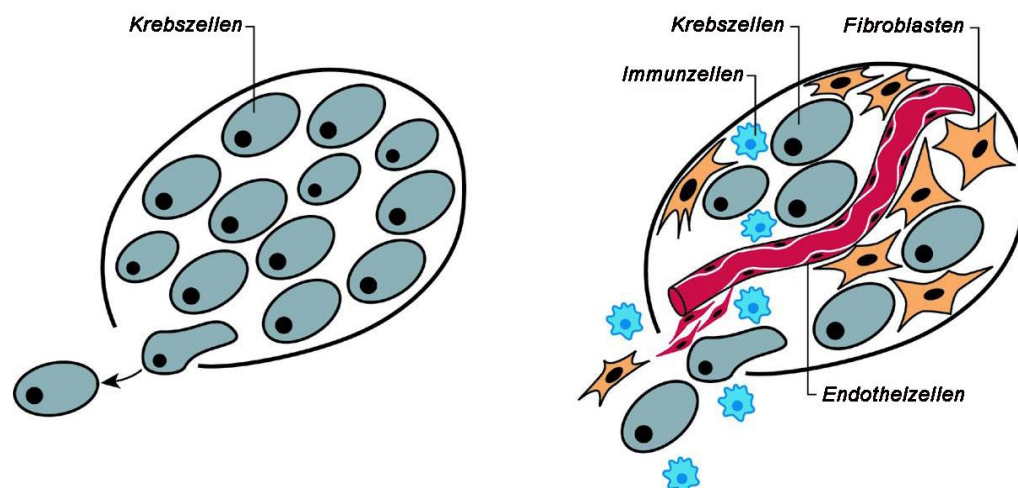


Abbildung 4: Der Tumor als komplexes Gewebe. Linke Seite: Schematisierte Tumorsicht, die sich lediglich auf die Tumorzellen und in ihnen entstehende Mutationen beschränkt. Rechte Seite: Tumorsicht mit dem umgebenden Mikromilieu, welches die Tumorprogression unterdrücken, oder aber das Überleben der Tumorzellen und die Metastasierung in andere Organe ermöglichen kann (modifiziert nach Hanahan und Weinberg, 2000).

Innerhalb der vergangenen Jahre wurde dieser Aspekt immer weiter erforscht, was dazu führte, dass vorgeschlagen wurde, die „Hallmarks of Cancer“ zu erweitern. Die bestehenden sechs „Kennzeichen von Krebs“, also die Resistenz gegenüber dem Zelltod, Auslösen von Angiogenese, unaufhörliche Proliferation, Aktivierung von Invasion und Metastasierung, Umgehung von Wachstumssuppressoren und Aufrechterhaltung von Wachstumssignalen, wurden um weitere vier ergänzt. Zu diesen neuen „Kennzeichen“ gehören die Deregulierung des zellulären Energiemetabolismus und die genomische Instabilität, sowie zwei zentrale immunologische Wirkmechanismen, das Vermeiden der Zerstörung durch das

Immunsystem, sowie die den Tumor fördernde Entzündung. Es finden sich sowohl im Mikromilieu von primären Tumoren als auch im Mikromilieu von invasiven und metastatischem Tumoren eine Vielzahl von Zelltypen (vergleiche Abbildung 5 Hanahan und Weinberg, 2011).

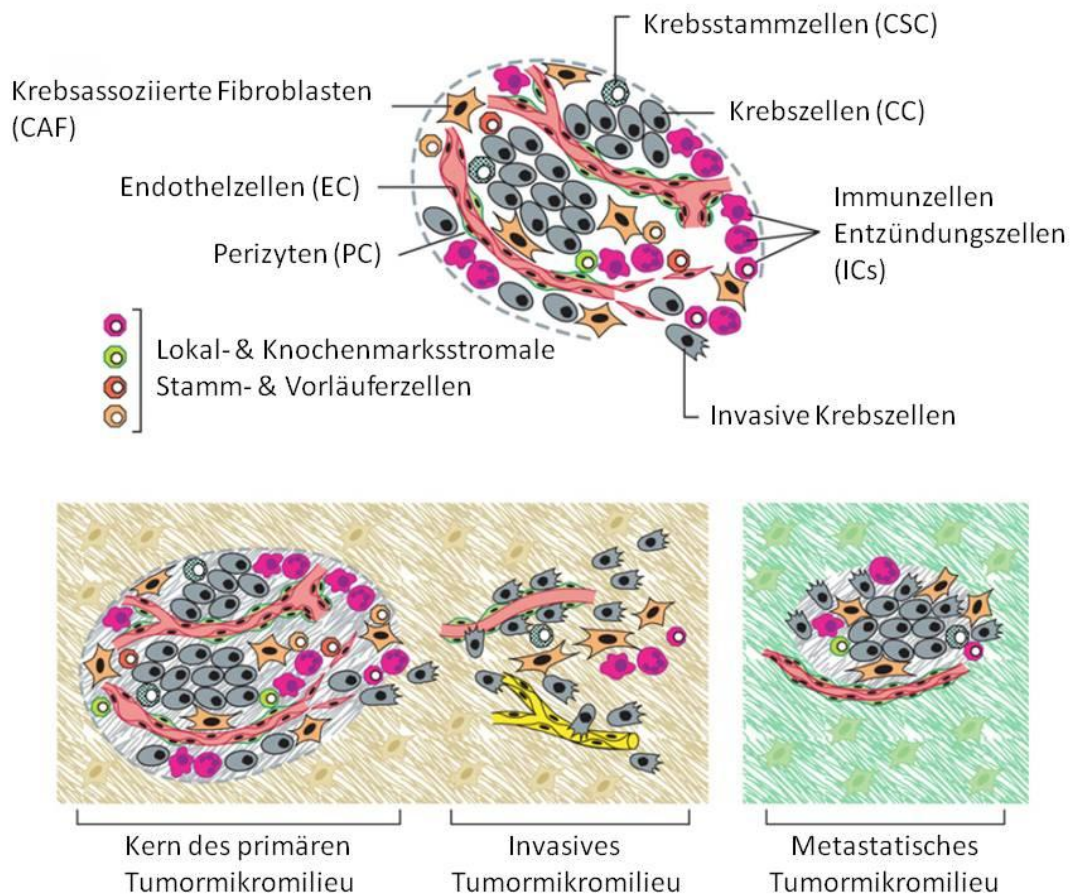


Abbildung 5: Das Tumormikromilieu. Oben: Neben den Krebszellen besteht ein Tumor in der Regel aus einer Vielzahl von Zellen. Unten: Übersicht über den Aufbau des Tumormikromilieus in verschiedenen Stadien der Tumorprogression (modifiziert nach Hanahan und Weinberg, 2011).

Besonders zu beachten sind in diesem komplexen Netzwerk die Immunzellen, und hierbei insbesondere T-Zellen und deren Subpopulationen (Tosolini, M. et al., 2011b). T-Zellen sind eine Untergruppe der Lymphozyten mit eigenen Subpopulationen. Diese T-Zellen erfüllen verschiedene Funktionen, indem sie antigenspezifisch mit einer anderen Zelle interagieren. Sie sind dazu in der Lage Makrophagen zu aktivieren, B-Zellen bei der Antikörperproduktion zu unterstützen und andere Zellen, die beispielsweise mit Krankheitserregern infiziert sind, zu töten (Murphy et al., 2009). Die unterschiedlichen T-Zell Subpopulationen lassen sich anhand ihrer Oberflächenmarker (*cluster of differentiation* = CD) erkennen. CD4 positive T-Helferzellen stimulieren B-Zellen, nachdem sie mit einem Antigen in

Kontakt gekommen sind, damit die stimulierten B-Zellen Antikörper gegen dieses Antigen produzieren. CD4 T-Zellen können zu CD4 T_H1- und CD4 T_H2- Effektorzellen differenzieren, um Makrophagen und B-Zellen als Reaktion auf Antigenkontakt zu aktivieren. Bei CD8 positive T-Zellen handelt es sich um zytotoxische T-Zellen, die andere Zellen abtöten können (*Murphy et al., 2009*). Diese Eigenschaft erweist sich in der Krankheitsabwehr durch die Eliminierung befallener Zellen als sehr effektiv. Des Weiteren gibt es sowohl T- als auch B-Gedächtniszellen, die das immunologische Gedächtnis repräsentieren und bei einem erneuten Kontakt mit einem Antigen sehr schnell reagieren können (*Murphy et al., 2009*). Effektorzellen wiederum entwickeln sich aus naiven Lymphozyten, nachdem diese durch ein Antigen erstmals aktiviert wurden. Sie sind dazu imstande Krankheitserreger zu zerstören, ohne eine weitere Differenzierung durchlaufen zu müssen (*Murphy et al., 2009*). Regulatorische T-Zellen stellen eine Gruppe der Effektorzellen dar, die T-Zellreaktionen hemmen können. T_H17-T-Zellen sind wiederum eine Untergruppe der CD4 T-Zellen und können IL-17 produzieren (*Murphy et al., 2009*). CD4⁺ T-Zellen tendieren unter T_H17 polarisierenden Bedingungen dazu, sich in IFN γ produzierende Zellen zu konvertieren, die zu T-Effektorzellen differenzieren (*Hamai et al., 2012*). T_H17⁺ T-Zellen sind sowohl an der Pathogenese inflammatorischer Immunerkrankungen als auch am Schutzmechanismus des Wirts gegenüber extrazellulärer Bakterien, Pilzen und Protozoen beteiligt (*Chen und O'Shea, 2008*). Im Einklang mit ihrer physiologischen Rolle, dem Schutz der Schleimhäute, sind sie beispielsweise im Darm und der Lunge weit verbreitet (*Kolls, 2010*). Im Gegensatz zu diesem protektiven Effekt steht deren sezerniertes Zytokin IL-17 im Zusammenhang mit einer Förderung der Angiogenese sowie der Tumorgenese (*Hamai et al., 2012; Numasaki et al., 2005*). Zur Identifizierung der T_H17⁺ Zellen kann der Transkriptionsfaktor ROR γ t herangezogen werden, der sowohl in Mäusen als auch im Menschen konserviert ist und einen abstammungsspezifischen Transkriptionsfaktor für T_H17⁺ Zellen darstellt (*Acosta-Rodriguez et al., 2007; Annunziato et al., 2007; Ivanov et al., 2006; Valmori et al., 2010*).

Die Prognose beim kolorektalen Karzinom wird durch die Präsenz von T-Zellen im Stroma, der invasiven Front und im Parenchym bei einer intraepithelialen Lokalisation beeinflusst. Des Weiteren wirkt sich das Auftreten verschiedener mRNA Expressionsprofile, die auf eine Typ 1 Immunantwort hinweisen, positiv auf die Prognose aus. So ist die Expression des T_H1-spezifischen Transkriptionsfaktor T-bet

mit einem verlängerten krankheitsfreien Überleben korreliert (*Fridman et al., 2011; Tosolini, M. et al., 2011b*). Eine Studie zeigt, dass sich 30% der Rezidive im kolorektalen Karzinom durch eine nur schwache Immunreaktion innerhalb des Tumors auszeichnen. Die Anzahl der intratumoralen T-Zellen erwies sich in dieser Studie als ein hervorragender Prognoseparameter (*Galon, J. et al., 2006a*). Des Weiteren korrelierte die T-Lymphozytendichte sowohl mit einer Abnahme der frühen Metastasierung, als auch einer Abwesenheit von Rezidiven bei CRC Patienten (*Pages et al., 2005*). Dies zeigt die Bedeutung des Immunsystems während der Tumorentstehung und im Krankheitsverlauf des kolorektalen Karzinoms (*Galon, J. et al., 2006a*). Vergleichbare Ergebnisse wurden bei der Untersuchung von Brust- (*Marrogi et al., 1997; Menegaz et al., 2008*) und Lungenkrebs erzielt (*Al-Shibli et al., 2008; Dieu-Nosjean et al., 2008; Hiraoka et al., 2006; Ito et al., 2005; Kawai et al., 2008*). Hierbei muss allerdings zwischen den Subpopulationen der T-Zellen unterschieden werden. Patienten mit einem hohen Anteil an T_H17 Zellen hatten im Gegensatz zu Patienten mit vielen T_H1 Zellen eine schlechte Prognose. Eine Auswirkung auf die Prognose konnte für die Menge an T_H2 Zellen nicht gezeigt werden (*Tosolini, M. et al., 2011b*). Regulatorische T-Zellen können eine lokale Antitumorantwort unterdrücken, wenn sie den Tumor infiltrieren und stehen aus diesem Grund mit einer schlechten Prognose in Zusammenhang (*Anz et al., 2011*). Im Gegensatz dazu ist Granzym B ein Interferon- γ induzierter Faktor, der mit einer guten Prognose beim kolorektalen Karzinom in Verbindung steht (*Naschberger et al., 2008*). In der Antitumorimmunantwort spielen $CD3^+$ -Zellen (*Galon, J. et al., 2006a; Guidoboni et al., 2001; Laghi et al., 2009; Sinicrope et al., 2009*) und $CD8^+$ -Zellen (*Funada et al., 2003; Galon, J. et al., 2006a; Guidoboni et al., 2001; Naito, Y. et al., 1998b; Oberg et al., 2002; Prall et al., 2004*) eine wichtige Rolle (*Ogino et al., 2011*). Sind dendritische Zellen (DC), M_1 Makrophagen, T_H1 $CD4^+$ T-Zellen, zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK) im Tumorbett zu finden, so tendieren diese Tumore zu einem reduzierten Tumorwachstum. Im Gegensatz hierzu scheinen M_2 Makrophagen, *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC), Neutrophile, T_H2 und T_H17 $CD4^+$ T-Zellen sowie $FoxP3^+$ $CD4^+$ regulatorische T-Zellen das Tumorwachstum zu stimulieren. Hierbei ist es allerdings sehr wichtig, dies mit dem jeweiligen Tumortyp in Kontext zu setzen, da es je nach Tumorentität unterschiedlich sein kann (*Fridman et al., 2011; Zitvogel et al., 2010; Zitvogel et al., 2011*). Allerdings ist es bisher nicht möglich den immunhistochemischen Marker herauszustellen, der

am besten geeignet ist, um standardmäßig in klinischen Tests verwendet zu werden (Ogino *et al.*, 2011).

Man findet sowohl in humanen als auch in murinen Tumoren Immunzellinfiltrate. Die Rolle des adaptiven Immunsystems in der Tumorüberwachung konnte in verschiedenen Experimenten mit immundefizienten Mäusen gezeigt werden (Dunn *et al.*, 2002; Dunn *et al.*, 2004; Shankaran *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2004). Die Tatsache, dass auch Tumorzellen Antigene exprimieren können, macht diese zum Ziel für die T-Zell vermittelte adaptive Immunantwort (Boon *et al.*, 1994; van der Bruggen *et al.*, 1991; van der Bruggen *et al.*, 2007).

Bei CD4⁺ T-Helferzellen, die sowohl Interferon- γ als auch IL-2 und TNF α sekretieren, handelt es sich um T_H1-Zellen (Mosmann *et al.*, 1986). Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen, welche für die Antitumorabwehr von enormer Bedeutung sind, weil sie die Fähigkeit besitzen Tumorzellen direkt zu eliminieren (Gooden *et al.*, 2011). Im Laufe der Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen zu T_H1 T-Helferzellen produzieren diese Interferon- γ , was zu einer Förderung der Immunantwort durch CD8⁺ zytotoxische T-Zellen führt (Szabo *et al.*, 2003). Durch das Induzieren einer Antitumorantwort sind T-Zellen dazu in der Lage die Karzinogenese zu inhibieren (Wu *et al.*, 2009). Dies ist ein Grund dafür, dass in Rag^{-/-}-Mäusen mehr Tumore entstehen, da diese Mäuse weder T-Zellen noch B-Zellen besitzen (Erdman *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2009).

Die Arbeitsgruppe von J. Galon hat beschrieben, dass eine hohe Anzahl von intratumoralen T-Lymphozyten mit einer guten Prognose in Zusammenhang steht (Galon, J. *et al.*, 2006a). Diese Aussage trifft auf verschiedenste Tumorentitäten zu wie Melanome (Clemente *et al.*, 1996), Eierstockkrebs (Sato *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2003) und das kolorektale Karzinom (Baier *et al.*, 1998; Camus *et al.*, 2009; Diederichsen *et al.*, 2003; Galon, J. *et al.*, 2006a; Naito, Y. *et al.*, 1998c).

Beim Beleuchten der verschiedenen Aspekte des Einflusses des Immunsystems auf die Tumorentstehung darf die Theorie über das *Immunoediting* nicht außer Acht gelassen werden. Es handelt sich hierbei um die Modifizierung der Immunogenität von Krebs. Dabei werden die drei essentiellen Phasen in der Interaktion von Wirts- und Tumorzellen beschrieben (Dunn *et al.*, 2002). In der ersten Phase, der Eliminierungsphase (*Elimination*), werden Tumorzellen durch die Immunantwort von Zellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems eliminiert. Die Gleichgewichtsphase (*Equilibrium*) ist der nächste Schritt im *Immunoediting*, bei dem

Tumorzellen mit einer verminderten Immunogenität entstehen, die resistent gegenüber Immuneffektorzellen sind. Diese Zellen sind dazu in der Lage in einem immunkompetenten Wirt zu überleben, da während der darwinistischen Selektion viele Tumorzellvarianten eliminiert werden. Dabei entstehen durch neue Mutationen immer mehr Zellen, die resistent gegenüber der Immunattacke sind. In der dritten und letzten Phase wird der Ausbruch (*Escape*) beschrieben. Lösliche Faktoren, die vom Tumor produziert werden, unterstützen die Tumorzellen darin, dem Angriff des Immunsystems zu entgehen (*Kim et al., 2007*). Diese vom Tumor sekretierten Faktoren wie z.B. VEGF (*Gabrilovich et al., 1998*), IL-10 (*Urosevic und Dummer, 2003*), TGF- β (*Beck et al., 2001*), Prostaglandin E2 (*He und Stuart, 1999*), lösliches Phosphatidylserin (*Kim, R. et al., 2005*), löslicher Fas (*Erdogan et al., 2005*), löslicher FasL (*Kim et al., 2004*) und lösliches MICA (*Holdenrieder et al., 2006*) führen zu einer lokalen und regionalen Immunsuppression (*Kim et al., 2007*). Lösliche Faktoren spielen eine wichtige Rolle bei der Kommunikation von Tumorzellen und dem Tumormikromilieu. Neben den tumorfördernden Faktoren gibt es ebenfalls tumorhemmende Faktoren wie z.B. CXC-Chemokine, deren Bedeutung in dieser Arbeit näher untersucht wird (vergleiche Abschnitt 1.5).

1.4 Chemokinfamilien und ihre Rezeptoren

Das Immunsystem beschreibt im allgemeinen alle Gewebe, Moleküle und Zellen, die sowohl zur angeborenen als auch zur adaptiven Immunantwort beitragen (*Murphy et al., 2009*). Hierbei besteht das angeborene Immunsystem aus verschiedenen zellulären Faktoren wie den natürlichen Killerzellen, Neutrophilen und Makrophagen, aber auch löslichen Komponenten (*Medzhitov und Janeway, Jr., 2002*). Diese signalisieren unter anderem den Lymphozyten des adaptiven Immunsystems das Bestehen einer Infektion (*Matzinger, P., 1994a; Matzinger, P., 1994b*). Die Kommunikation dieser verschiedenen Zelltypen ist sowohl durch den Zell-Zell-Kontakt mit deren Oberflächenmolekülen, als auch durch lösliche Faktoren möglich. Die Kommunikation mittels dieser löslichen Moleküle ermöglicht eine Signalgebung über große Distanzen und ist nicht wie beim Zell-Zell-Kontakt lokal begrenzt. Dieses Signal ist amplifizierbar und ermöglicht es einer Zytokin produzierenden Zelle mehr Zellen anzusprechen, als es über direkten Kontakt möglich wäre. Diese Form der Kommunikation birgt allerdings das Risiko einer ungewollten und systemischen Aktivierung (*cytokine storm*), was durch die Induktion von Multiorganversagen zum Tod des Individuums führen kann (*Murphy et al., 2009; Vitetta und Ghetie, 2006*).

Chemokine sind lösliche Faktoren des Immunsystems. Es handelt sich hierbei um chemotaktisch aktive Zytokine (*Murphy et al., 2009*). Sie sind in der Regel 8 - 10 kDa groß, wobei es ungefähr 50 verschiedene Chemokine und 19 unterschiedliche Rezeptoren gibt (*Murphy et al., 2000*). Die Signalgebung der Chemokine steuert viele Prozesse wie z.B. die Regulation der Angiogenese und die Rekrutierung von Tumorzellen (*Keeley et al., 2010*). Weiterhin können sie die Verbindung zwischen Tumorzellen und dem umgebenden Stroma herstellen (*Mukaida und Baba, 2012; Oladipo et al., 2011*). Durch die Expression der Chemokinrezeptoren auf unterschiedlichen Zelltypen sind diese nach Bindung ihrer Liganden dazu in der Lage, Einfluss auf unterschiedlichste Prozesse zu nehmen. Sie können sowohl hemmend als auch fördernd wirken, je nach Chemokin und Rezeptor. So nehmen sie beispielsweise Einfluss auf die Neovaskularisierung, Produktion von Wachstumsfaktoren und auch die Immunantwort (vergleiche Abbildung 6 *Mukaida und Baba, 2012*).

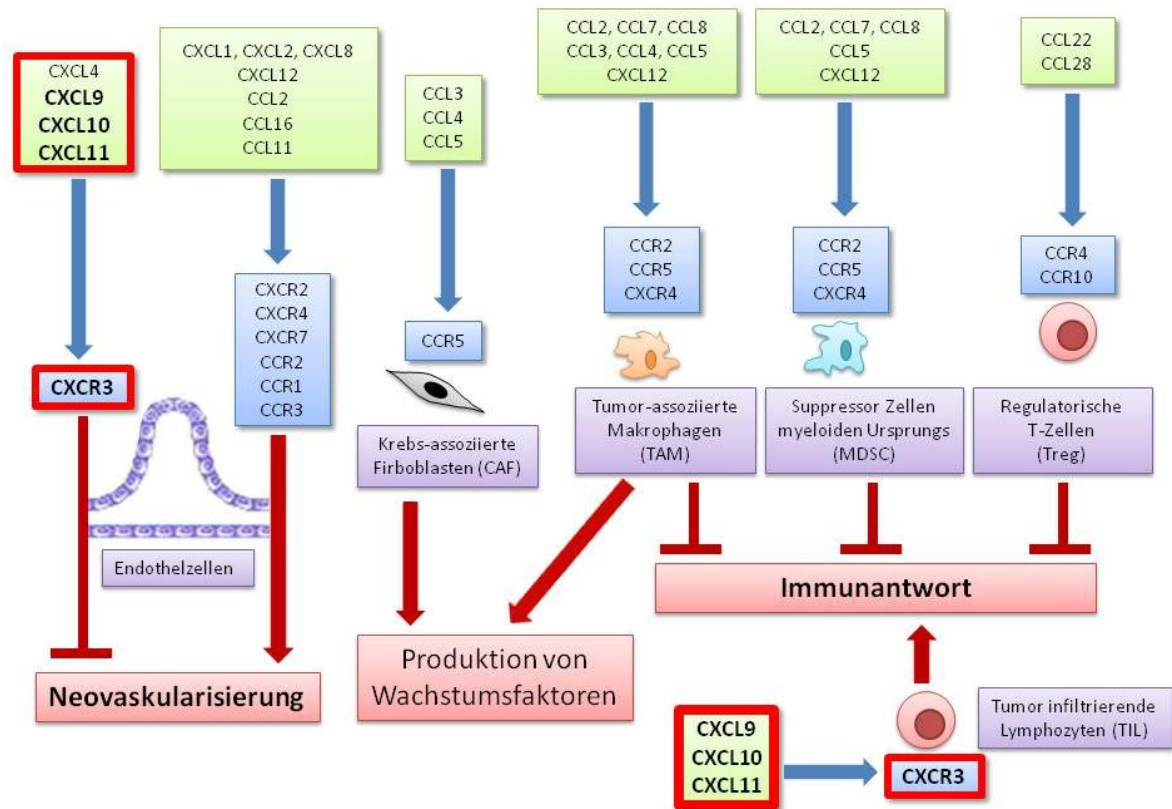


Abbildung 6: Chemokine und deren Rezeptoren. Chemokinvermittelte Interaktion von Tumor- und Stromazellen (modifiziert nach Mukaida und Baba, 2012).

Chemokine und deren Rezeptoren lassen sich in vier Gruppen einteilen, die verwandt, aber doch unterschiedlich sind. Diese Einteilung basiert auf der strukturellen Positionierung ihrer Cysteinreste (Baggiolini et al., 1997; Liu et al., 2005; Mukaida und Baba, 2012; Rollins, 1997; Zlotnik und Yoshie, 2000). Es gibt die Gruppe der CC-Chemokine, die beim Menschen hauptsächlich auf Chromosom 4 kodiert sind und im aminoterminalen Bereich aus zwei nebeneinanderliegenden Cysteinresten bestehen. CXC-Chemokine hingegen beinhalten noch eine weitere beliebige Aminosäure zwischen diesen beiden Cysteinresten und werden weitgehend in Chromosom 17 kodiert. Eine weiterführende Unterteilung dieser Chemokine ermöglicht das ELR-Motiv (Aminosäuretriplett bestehend aus Glutaminsäure, Leucin und Arginin), was direkt vor dem ersten Cysteinrest vorhanden ist oder fehlt. Das Vorhandensein dieses Triplets ist erforderlich für das Anlocken von neutrophilen Zellen und fehlt den meisten CXC-Chemokinen, wie den Liganden der Rezeptoren CXCR3, 4 und 5. Die dritte Gruppe der chemotaktisch aktiven Zytokine bilden die C-Chemokine mit nur einem Cystein im aminoterminalen Bereich, wie beispielsweise Fraktalin (CX3C-Chemokin). Alle Chemokine interagieren ihrerseits mit einem oder mehreren spezifischen Rezeptoren, was

wiederum einen oder mehrere Zelltypen beeinflussen kann (*Kunkel und Butcher, 2002; Luster, 2002; Matsukawa et al., 2000; Ono et al., 2003; Scapini et al., 2000; Yoshie, 2000*). Diese transmembranen und G-Protein gekoppelten Chemokinrezeptoren werden auf der Oberfläche einer Vielzahl von Zellen exprimiert (*Colvin und Thomson, 2002; Murphy, 1994; Rossi und Zlotnik, 2000; Wong und Fish, 2003; Yoshie et al., 1997*).

Ebenso wie die Chemokine sind auch deren Rezeptoren in vier Hauptfamilien unterteilt. Die Einteilung erfolgt äquivalent zu deren Liganden. Hierbei gibt es CR-, CCR-, CXCR- und CX3CR-Rezeptoren, die mit ihren Liganden, den C-, CC-, CXC- und CX3C-Chemokinen interagieren. Sechs dieser Rezeptoren (CXCR1-6) binden selektiv CXC-Chemokine, wohingegen CC-Rezeptoren (CCR1-10) lediglich mit CC-Chemokinen eine Bindung eingehen. Aus den weiteren beiden Rezeptorfamilien wurde bisher jeweils nur ein Rezeptor identifiziert; für Fraktalin (CX3CR1) und Lymphoaktin (XCR1) (*Liu et al., 2005; Mukaida und Baba, 2012; Murdoch und Finn, 2000; Zlotnik und Yoshie, 2000*). Die Rezeptor-Liganden-Bindung induziert intrazelluläre Signale wie Protein-Phosphorylierung, Lipidhydrolyse und die Mobilisierung von Kalzium (*Bacon et al., 1996; Bonacchi et al., 2001; Curnock et al., 2002; Fernandis et al., 2003; Jinquan et al., 2001; Kremer et al., 2003; Rabin et al., 1999; Smit et al., 2003; Thelen, 2001; Ticchioni et al., 2002; Wong und Fish, 2003*). Dadurch wird eine Vielzahl von biologischen Prozessen wie beispielsweise die Leukozytenmigration, Wundheilung, Angiogenese, Metastasierung, Entzündung und Lymphopoese im Knochenmark ausgelöst (*Agostini et al., 2001; Fernandis et al., 2003; Hancock et al., 2000; Loetscher et al., 1996; Qin et al., 1998*).

Betrachtet man die chemokinvermittelte Interaktion von Tumor- und Stromazellen, so wird deutlich, dass die meisten Chemokine der Tumorprogression zuträglich sind. Durch die Förderung der Neovaskularisierung wird es dem Tumor möglich, ausreichend Blutgefäße auszubilden, die diesen mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen. Durch die vermehrte Produktion von Wachstumsfaktoren wird die Tumorprogression unterstützt. Des Weiteren wird die Immunantwort gehemmt, was das Eliminieren der Tumorzellen durch das Immunsystem vermindert. Lediglich die Expression von CXCR3 auf Endothelzellen und die Bindung seiner Liganden CXCL4, 9, 10 und 11 hemmt die Neovaskularisierung. Weiterhin fördert die Bindung von CXCR3, exprimiert auf tumorinfiltrierenden Lymphozyten, an CXCL9, 10 und 11 die Immunantwort (vergleiche Abbildung 6 *Mukaida und Baba, 2012*).

1.5 CXCR3 und seine Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11

CXC-Chemokine sind von enormer Bedeutung, was die Rekrutierung und Aktivierung verschiedener Leukozyten Subpopulationen betrifft (Trotta et al., 2009). Sie sind auf struktureller Ebene verwandt und allen fehlt das ELR-Motiv (Glutaminsäure-Leucin-Arginin-Motiv) (Muller et al., 2010). Diese Chemokine sind alle Liganden des CXCR3 Rezeptors, der bevorzugt auf aktivierten T_H1-Zellen exprimiert wird (Groom und Luster, 2011; Liu et al., 2005; Liu et al., 2011).

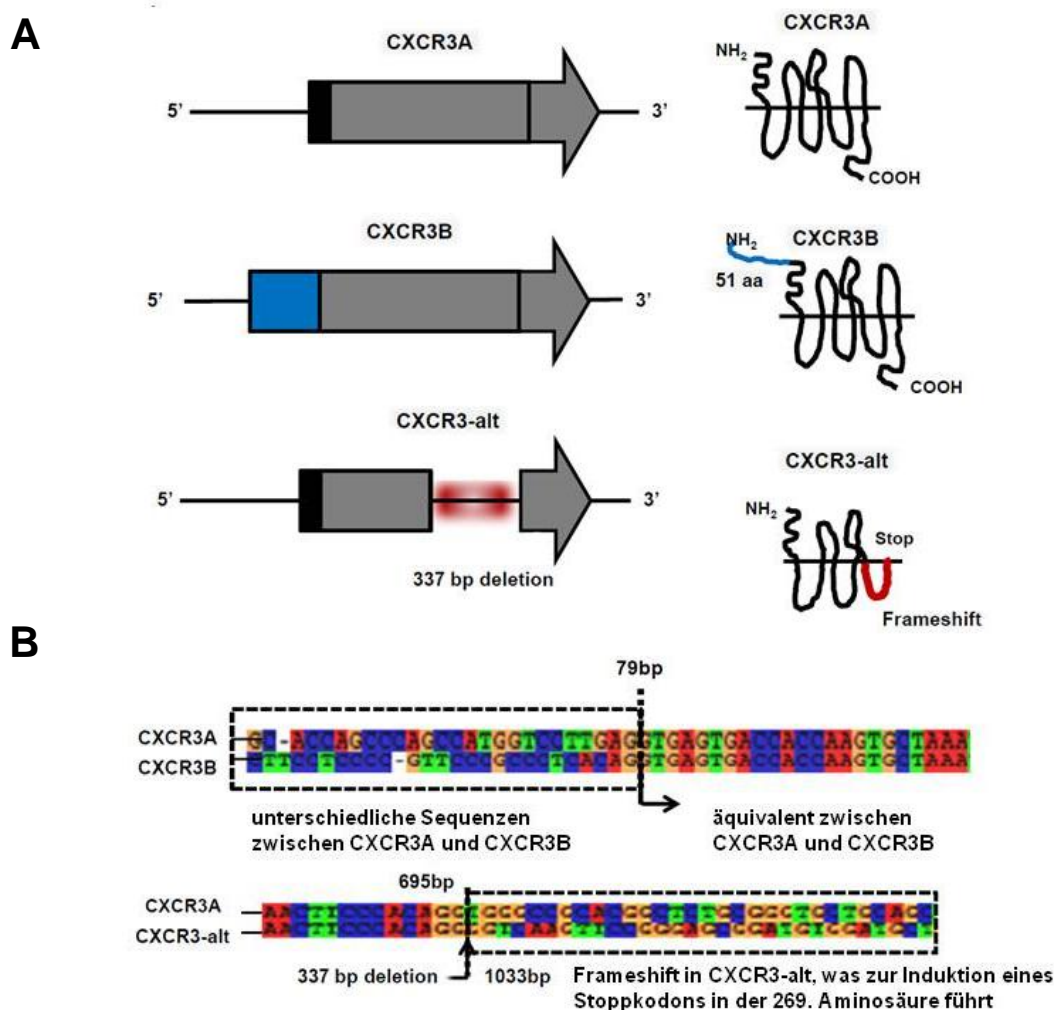


Abbildung 7: Schematische Darstellung der verschiedenen Spleißvarianten des CXCR3 Rezeptors. A: N-terminal besitzt CXCR3B eine 51 Aminosäuren längere Domäne als CXCR3A und CXCR3-alt, wohingegen CXCR3-alt am C-Terminus 337 bp kürzer ist als CXCR3A und CXCR3B. B: Sequenzielle Darstellung der Basenabfolge der drei CXCR3 Spleißvarianten mit den jeweiligen Sequenzhomologien bzw. Sequenzdifferenzen (Furuya et al., 2011).

Der Rezeptor liegt in verschiedenen Spleißvarianten vor. Hierbei gibt es drei bekannte Ausprägungen CXCR3A, CXCR3B und CXCR3-alt (vergleiche Abbildung 7) (Ehlert et al., 2004; Furuya et al., 2011; Liu et al., 2005; Liu et al., 2011). Er wird zwar präferentiell, jedoch nicht ausschließlich, auf T_H1-Zellen

exprimiert (Liu et al., 2005; Mendel et al., 1995; Sallusto et al., 1998). CXCR3 ist ebenfalls auf Endothelzellen (Romagnani et al., 2001; Salcedo et al., 2000), NK-Zellen, Monozyten, dendritischen Zellen und Microglia zu finden (Liu et al., 2005; Liu et al., 2011), wobei nur die mRNA Spleißvariante CXCR3B in Endothelzellen exprimiert wird. CXCR3A und CXCR3B mRNA wird in Herz, Niere, Leber und Skelettmuskeln ausgeprägt, wohingegen in der Plazenta lediglich die Spleißvariante CXCR3A zu finden ist (Lasagni et al., 2003).

Bei diesem Rezeptor handelt es sich um ein G-Protein gekoppeltes heptahelikales Transmembranprotein (Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptor), das aus 368 Aminosäuren besteht und 40,6 kDa groß ist. Die Homologie zwischen murinem und humanem CXCR3 beträgt 86% (Liu et al., 2005) und ist sowohl in der Maus als auch im Menschen auf Chromosom X kodiert (Liu et al., 2005; Lu et al., 1999; Soto et al., 1998). Folgende Liganden binden an CXCR3: CXCL9 oder Mig (*monokine induced by gamma-interferon*), CXCL10 oder IP-10 (*interferon-inducible protein of 10 kDa*) und CXCL11 oder I-TAC (*interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant*) (Groom und Luster, 2011). CXCR3 reagiert auf die Bindung von CXCL9, CXCL10 oder CXCL11, was in der Regulation der Migration von T_H1^+ T-Lymphozyten resultiert. CXCL10 ist zur Rekrutierung von T_H1^+ T-Zellen fähig und in entzündetem Darmgewebe hochreguliert (Hoermannsperger et al., 2009; Hormannsperger et al., 2013). CXCL9, CXCL10 und CXCL11 sind Interferon- γ regulierte Gene, die zudem eine angiostatische Wirkung haben (Cox et al., 2008; Loetscher et al., 1996; Luster, 1998; Moser, 2001; Naschberger et al., 2008; Qin et al., 1998; Rabin et al., 1999).

Die lokale Produktion von $IFN\gamma$ in Entzündungsherden induziert einen Kreislauf, der sowohl die Expression der drei Chemokine als auch die Rekrutierung $CXCR3^+$ Zellen fördert, welche wiederum als $IFN\gamma$ Quelle dienen. Dieser kombinierte Effekt wird auch als "Immunangiostase" beschrieben, durch die der Patient im Zusammenhang mit einer Antitumorimmunität profitiert (Keeley et al., 2008; Pan et al., 2006; Strieter et al., 2004). Die CXCR3 Expression wird mit $CD4^+$ T-Helferzellen und $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen assoziiert. $CXCR3^+$ Zellen machen zwischen 60% und 90% der $CD8^+$ Gedächtnis-T-Lymphozyten sowie 40% der $CD4^+$ Gedächtnis-T-Lymphozyten aus. Des Weiteren wird CXCR3 auf innatens Lymphozyten wie natürlichen Killerzellen und NKT-Zellen, plasmazytoiden dendritischen Zellen und Subgruppen von B-Zellen exprimiert. Durch die Bindung seiner Liganden wird der

CXCR3 Rezeptor rasch auf naiven T-Zellen induziert, was deren Aktivierung zur Folge hat. Diese Expression bleibt bevorzugt und in hohem Maße bei T_H1 $CD4^+$ T-Zellen, $CD8^+$ T- Effektorzellen und NK sowie NKT-Zellen bestehen. Die Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 sind *in vivo* dazu in der Lage sowohl redundant, synergistisch, kollaborativ als auch unter bestimmten Umständen antagonistisch zusammen zu wirken. Ihre Trivialnamen deuten bereits darauf hin, dass alle drei CXCR3 Liganden durch $IFN-\gamma$ Typ II induziert werden können. Dies ist allerdings nicht die einzige Möglichkeit und variiert von Chemokin zu Chemokin. CXCL10 wird sowohl durch eine Vielfalt von innatem Stimuli, die Typ I $IFN-\alpha/\beta$ Produktion bewirken, als auch das adaptive Immunzell Cytokin $IFN-\gamma$ induziert. CXCL9 Induktion hingegen beschränkt sich lediglich auf $IFN-\gamma$ (Groom und Luster, 2011). Bei CXCL11 führen sowohl $IFN-\gamma$ als auch $IFN-\beta$ zu einer Induktion, wohingegen $IFN-\alpha$ keinen Effekt zu haben scheint (Rani et al., 1996). Weiterhin hat TNF einen synergetischen Effekt auf die Stimulation von allen drei CXC-Chemokinen in Kombination mit $IFN-\gamma$ (Farber, 1997; Groom und Luster, 2011; Ohmori et al., 1997; Rani et al., 1996). Diese differentielle Steuerung wird durch spezifische Promotoren ermöglicht, die die klaren Expressionsmuster der CXC-Chemokine regulieren. So beinhaltet der CXCL10 Promotor ein funktionelles IRSE und ein $NF-\kappa B1$ Element (Majumder et al., 1998; Ohmori und Hamilton, 1993; Ohmori und Hamilton, 1997). Der Promotor für CXCL9 enthält hingegen ein γ IRE-1 und ein schwaches $NF-\kappa B2$ Element (Ohmori und Hamilton, 1997; Wong et al., 1994; Wright und Farber, 1991). Der CXCL11 Promotor wiederum zeigt Ähnlichkeiten mit CXCL9 und CXCL10 Promotoren, da dieser eine IRSE und eine $NF-\kappa B2$ Komponente enthält (Tensen et al., 1999). Neben den Unterschieden in den Expressionsmustern der CXC-Chemokine gibt es ebenfalls eine Hierarchie, mit der diese an CXCR3 binden. CXCL11 hat hierbei die höchste Bindungsaffinität an CXCR3, gefolgt von CXCL10 mit einer mittleren Affinität und CXCL9, das die geringste Affinität bei der Rezeptorbindung aufweist (Cole et al., 1998; Cox et al., 2001; Groom und Luster, 2011; Weng et al., 1998).

Diese drei Chemokine sind weiterhin dazu in der Lage an negativ geladene Glykosaminoglykan-Moleküle (GAG) an der Zelloberfläche und in der extrazellulären Matrix zu binden (Campanella et al., 2003; Groom und Luster, 2011; Luster et al., 1995; Severin et al., 2010). Diese Bindung ist *in vivo* sehr wichtig, um die Chemokine

deren Rezeptoren zu präsentieren. *In vitro* hingegen konnte gezeigt werden, dass die chemotaktische Aktivität von CXCL10 und CXCL11 unabhängig von der Bindung an GAGs ist. Die Fähigkeit dieser Chemokine eine CXCR3 abhängige T-Zellmigration *in vivo* auszulösen war wiederum abhängig von deren Fähigkeit an GAG-Moleküle zu binden (Campanella et al., 2006; Groom und Luster, 2011; Severin et al., 2010). CXCL10 ist durch die Fähigkeit an GAGs zu binden ebenso geeignet das Verhalten gewisser "nicht Immunzellen", wie z.B. Endothelzellen und Fibroblasten, die nicht den CXCR3 Rezeptor exprimieren, zu beeinflussen (Angiolillo et al., 1995; Campanella et al., 2010; Groom und Luster, 2011; Jiang, D. et al., 2010; Luster et al., 1998; Proost et al., 2001; Tager et al., 2004). Weiterhin konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass trotz der promotorspezifischen differentiellen Expression der CXC-Chemokine und der daraus resultierenden unterschiedlich vorliegenden Konzentrationen, CXCL9-11 gleich effizient in der Rekrutierung aktivierter CD4⁺ und CD8⁺ Zellen sind (Campanella, G. S. et al., 2008). Außerdem ist CXCL10 dazu in der Lage über die Bindung an CXCR3B eine antiproliferative Wirkung zu entfalten. In Östrogenrezeptor-positivem Brustkrebs ist CXCL10 durch die Inhibition von VEGF (*vascular endothelial growth factor*) dazu in der Lage die Tumorlast zu reduzieren (Liu et al., 2011).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Sowohl die Entstehung solider Tumore als auch die Tumorprogression werden stark durch das Tumormikromilieu beeinflusst. Hierbei sind besonders verschiedene Komponenten des Immunsystems hervorzuheben. In der Literatur wurde unlängst beschrieben, dass eine hohe Anzahl intratumoraler T-Zellen mit einer guten Prognose von Patienten mit kolorektalem Karzinom korreliert (*Camus et al., 2009; Galon, J. et al., 2006a*).

In laboreigenen Vorarbeiten konnte mittels einer Transkriptom-Analyse gezeigt werden, dass zahlreiche Gene, die Einfluss auf die Regulation des Immunsystems haben, in kolorektalen Tumoren stadienspezifisch gegenüber dem Normalgewebe unterschiedlich exprimiert werden (*Doll et al., 2010; Friederichs et al., 2005*). Durch Gegenüberstellung von zwei Patientengruppen, die ein identisches Tumorstadium (T3N0M0) aufwiesen, sich jedoch stark in ihrem Krankheitsverlauf unterschieden (29 Patienten waren nach 5 Jahren noch am Leben, während 26 Patienten tumorbedingt innerhalb von 5 Jahren post-operativ verstorben waren) wurden 19 Gene identifiziert, die als Überlebensprediktoren eingesetzt werden konnten. Dies wurde an einem unabhängigen Patientenkollektiv (n=146) bestätigt. Die meisten dieser Gene standen in Verbindung mit dem Immunsystem, es handelte sich unter anderem um CXCL9, CXCL10, CXCL11 und Granzym B (*Lin et al., 2007*).

Diese Chemokine werden in der Literatur als lösliche Faktoren beschrieben, die sowohl chemotaktisch auf T-Zellen wirken, als auch eine angiostatische Wirkung besitzen. Bei Granzym B handelt es sich um eine Serinprotease, die sowohl auf zytotoxischen T-Lymphozyten als auch natürlichen Killerzellen exprimiert wird. Diese besitzen die Fähigkeit, Apoptose zu induzieren, und somit MHC-I-exprimierende Zellen zu eliminieren (*Dahl et al., 1990*).

Des Weiteren haben die Arbeitsgruppen um Guido Kroemer und Jérôme Galon beschrieben, dass den Chemokinen CXCL9 und CXCL10 die höchste Relevanz in der positiven Prognose für Patienten mit einem kolorektalen Karzinom beigemessen werden kann (*Fridman et al., 2011*).

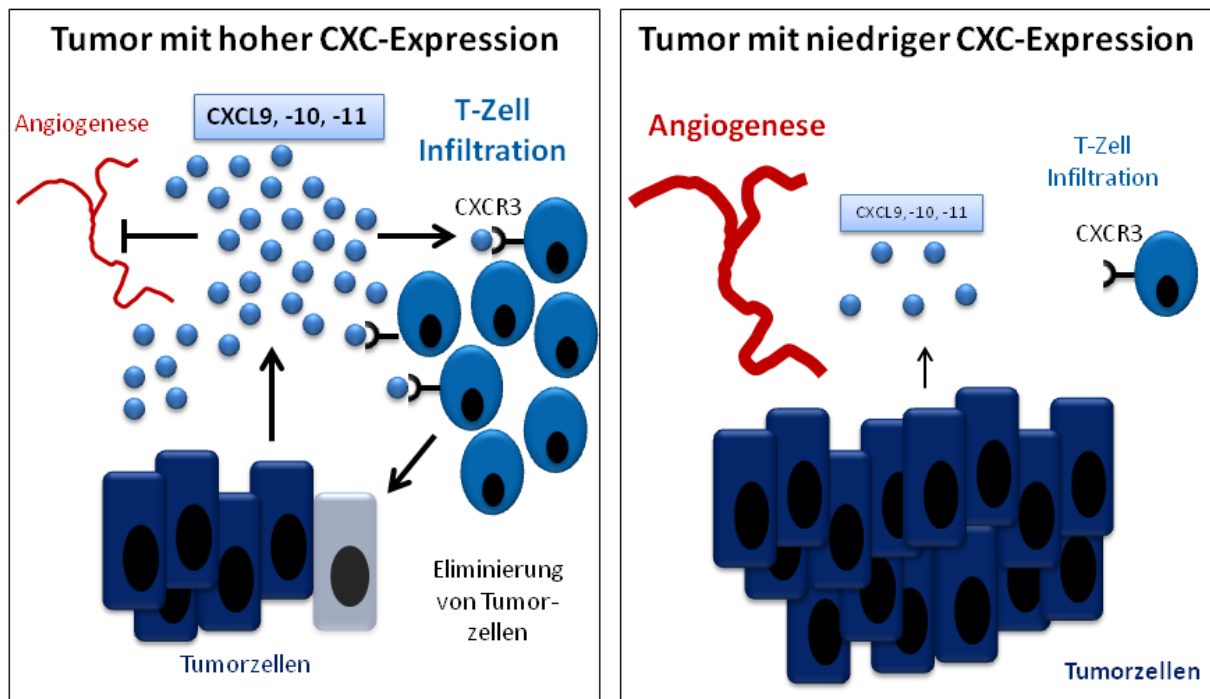


Abbildung 8: Modell der Immunmodulation durch interferon-regulierte Chemokine. Linke Seite: Tumor mit hoher Chemokinexpression und günstiger Prognose. Die gute Prognose setzt sich aus der angiostatischen Wirkung der Chemokine und der Rekrutierung von T-Zellen mit der daraus resultierenden Eliminierung von Tumorzellen zusammen. Rechte Seite: Tumor mit niedriger Chemokinexpression und schlechter Prognose, da die geringe Menge an Chemokinen nicht ausreicht die Angiogenese des Tumors zu blockieren und es nur zu einer minimalen Infiltration des Tumorgewebes mit T-Zellen kommt.

In der vorliegenden Arbeit sollte die These untersucht werden, wonach ein Patient mit einer hohen intratumoralen CXC-Chemokinexpression eine günstigere Prognose hat als ein Patient mit einer geringen CXC-Expression (vergleiche Abbildung 8). Des Weiteren sollte untersucht werden, ob diese protektive Wirkung der Chemokine auf die aktive Rekrutierung von T-Zellen ins Tumorgewebe, und/oder eine Blockade der Ausbildung intratumoraler Blutgefäße zurückzuführen ist. Die intratumorale T-Zellinfiltration könnte hierbei eine Eliminierung der Tumorzellen, vermittelt durch zytotoxische Effektor-T-Zellen, zur Folge haben. Zusätzlich würde die Blockade der Angiogenese verhindern, dass der Tumor mit ausreichend Sauerstoff und Nährstoffen versorgt wird, was eine Nekrose im Tumorzentrum fördern würde. Der vermutete kausale Zusammenhang von CXC-Chemokinexpression und Tumorprogression sollte durch ein orthotopes Mausmodell untersucht werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Chemikalien

10x Fast Digest® Buffer	Fermentas, St. Leon-Rot
10x Fast Digest® Green Buffer	Fermentas, St. Leon-Rot
2x DynAmo™ Color Flash Probe	Biozym, Hessisch Oldendorf
Master Mix (UPL Puffer)	
40x Sample Buffer (UPL Farbstoff)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Aceton	Merck, Darmstadt
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumchlorid (reinst)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Antibiotic Antimycotic (ABAM)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Antibody Diluent	Dako, Glostrup, DK
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kalziumchlorid	Caelo & Loretz GmbH, Hilden
Chloroform	Merck, Darmstadt
Recombinant human IP-10	Biosource, Invitrogen, Karlsruhe
Desoxynukleotide (dNTP)	Fermentas, St. Leon-Rot
Diethylether	Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
DynAmo™ Color Flash Probe Master Mix	Biozym, Hessisch Oldendorf
EGF <i>epidermal growth factor</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Eisessig	Merck, Darmstadt
Eosin Y	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Eukitt	O. Kindler GmbH & Co KG, Freiburg
FailSafe™ PCR 2X Pre Mix E	Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Gelatine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GeneRuler™ 1 kb DNA Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 100bp DNA Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
Gentamycin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Glycerol	Roth, Karlsruhe
H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt
Hämatoxilin	Apotheke des MRI, München
HBSS + Ca ²⁺ + Mg ²⁺	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Hepes	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
IFN- γ	Biosource, Ratingen
Insulin Actrapid®	Novo Nordisk Pharma GmbH, Mainz
Isofluran	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Isopropanol	Apotheke des MRI, München
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Lipofektamin™	Invitrogen, Karlsruhe
LPS Serotyp 0127:B8	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Marker 1 kb DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
Mc Coy's 5A, GlutaMAX™	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
O ₂	Apotheke des MRI, München
Oligo-dT Primer	Fermentas, St. Leon-Rot
Orange G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Parafilm M	American National Can™, Chicago, IL, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

PBS Dulbecco (<i>Phosphate buffered saline</i>)	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Phenol-Chloroform	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Random Hexamer Primer	Fermentas, St. Leon-Rot
rekombinantes IP-10	Biosource, Invitrogen, Karlsruhe
RiboLock™ RNase Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase-ExitusPlus™	AppliChem GmbH, Darmstadt
Saccharose	Merck, Darmstadt
Saures Hämalaun	Apotheke des MRI, München
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SyBr®Green I PCR Mastermix	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Taq-Puffer + (NH ₄) ₂ SO ₄ (10x)	Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-Puffer + KCl (10x)	Fermentas, St. Leon-Rot
Tissue Tek	Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL
TNF _α	Biosource, Ratingen
Trireagenz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	BioRad, München
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Trypsin-EDTA (1x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
Tween 20	Merck, Darmstadt
Universal Probe Library, (UPL)	Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA
VLE RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin
Xylol	Hedinger, Stuttgart
Zeocin™	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Goat Serum</i> (Ziegenserum)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Zitronensäure	Roth, Karlsruhe

2.1.2 Geräte

7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
ABI Prism™ 7300 Sequence Detector	
-80°C Schrank	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Autoklav D-65	Systec, Wetztenberg
AxioCam MRcr5	Zeiss, Jena
Brutschrank (BBD 6220)	Heraeus, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Elektrophoresekammer für DNA	Fischer Scientific, Ingolstadt
ELISA Reader MithrasLB 940	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Feinwaage BP 210S	Sartorius, Göttingen
Gel Doc XR System	Bio-Rad, München
GeneAmp PCR System 7900	Perkin Elmer, Boston, MA, USA
GeneAmp PCR System 9700	Perkin Elmer, Boston, MA, USA
GenePulser® II	Bio-Rad, München
Heizblock MBT 100	Kleinfeld, Gehrden
Heizblock	Liebisch, Bielefeld
Inkubator Innova 4230	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Kryostat	Leica, Wetzlar
Kühlschrank	Siemens, München
Kühlzentrifuge Biofuge 28RS	Heraeus, Hanau
Lightcycler 480 II	Roche, Mannheim
N ₂ -Tank (Ohrons 80)	Messer Griesheim, Euteneuen
Megafuge 2.0 R	Heraeus, Hanau
Mikroskop Axiolab	Zeiss, Jena
Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Jena
Mikroskop Stemi 2000-C	Zeiss, Jena
NanoDrop ND-1000	Nanodrop Techn., Montchanin, DE, USA
Narkoseanlage für Kleintiere	Volker GmbH, Kaltenkirchen
Neubauerzählkammer	Brandt, Berlin
pH-Meter	inoLab, Weilheim
Pipetboy	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Reinstwasseranlage	Millipore, Eschborn

Messschieber 150 mm, Monoblockausführung DIN-862	MW-Import, Hamburg
Mithras LB 940	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Sterilbank Herasafe	Kendro, Langensebold
Stromquellen Power Pack P25	Biometra, Göttingen
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermoschüttler MB-102	BioER Memmert, Schwabach
Tischzentrifuge Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifugen Biofuge 15	Heraeus, Hanau
Tissue Lyser	Qiagen GmbH, Hilden
Trockenschrank	Binder GmbH, Tuttlingen
Vortexer Genie 2	Scientific Industries, Portland, OR, USA
Vortexer	Scientific Industries, Portland, OR, USA
Waagen	Satorius, Göttingen
Wasserbad E 1000	Lauda, Lauda-Königshofen
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Wasserbad	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge Megafuge 2.OR	Heraeus Instruments, Hanau

2.1.3 Software

Adobe Photoshop CS3 und CS5	Adobe, San Jose, CA, USA
AxioVision Rel. 4.7 05-2008	Zeiss, Jena
GraphPad InStat [®] 3	GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA
GraphPad PRISM [®] Version 4	GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA
IBM [®] SPSS [®] Statistics Version 19	SPSS, Inc., Corpus Christi, TX, USA
LightCycler [®] 480 SW 1.5	Roche, Mannheim
MS Excel	Microsoft, Redmond, WA, USA
MS Word	Microsoft, Redmond, WA, USA
R version 2.14.0	The R Foundation for Statistical Computing, (www.R-project.org)

Reference Manager 12	Thomson ISI ResearchSoft, Adept Scientific GmbH, Frankfurt
REviewer™ Calculators	Fermentas, St. Leon-Rot
Sequence Detection Software v.1.4	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
SPSS 16.0	SPSS, Chicago, IL, USA
WimScratch	Wimasis GmbH, München

2.1.4 Enzyme

BglII Fast Digest	Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsendonuklease	
DNase I RNase-free (1u/µl)	Fermentas, St. Leon-Rot
HindIII Fast Digest	Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsendonuklease	
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Proteinase K (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RevertAid™ H-Minus M-MuLV	Fermentas, St. Leon-Rot
Reverse Transkriptase	
RNasin	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Taq DNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
XbaI Fast Digest	Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsendonuklease	

2.1.5 OP-Besteck

Fadenhalter	Plazotta GmbH, München
Gefäßklemme	World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA
Ohrlochstecher	Tri-City Tool & Die Inc, Bay City, MI, USA
Pinzette	World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA
Schere	Gebrüder Martin GmbH & Co KG, Tuttlingen
Skalpelle	Feather Safety, Razor Co., Osaka, Japan
Stieltupfer	Lohmann & Rauscher Int. GmbH & Co. KG, Rengsdorf

2.1.6 Verbrauchsmaterial

30 μ -Dish 35 mm, low Culture Insert	Ibidi, München
Chirurgisches Nahtmaterial (5-0)	Johnson & Johnson Intl., Neuss
Cryomold Biopsy #4565	Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL
Cryomold Intermediate #4566	Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL
Deckgläser (20x20)	Josef Reske GmbH & Co KG, Aindling-Arnhofen
Dexpanthenolsalbe	Apotheke des MRI, München
Dispenserkugeln, Stahl, rostfrei (5 mm)	Qiagen GmbH, Hilden
Einmalhandschuhe	Semper Care, Wien, AT
Einmalspritze 1 ml Omnifix-F	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Filterpipettenspitzen	Kisker Biotech GmbH Co. KG, Steinfurt
Katheter (Venenverweilkanüle)	Becton Dickinson, Helsingborg, SE
Kleenex	Kimberly Clark Worldwide, Roswell, FL, USA
Kryoröhrchen	Alpha Laboratories Ltd, Eastleigh, Hampshire, UK
Leukoplast	Beiersdorf AG, Hamburg
Petrischalen	Greiner-bio-one, Frickenhausen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Star Lab, Lübeck
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Serumröhrchen Microtainer SST	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Superfrost Objektträger	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Tissue-Tek	Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL
Wiegeschalen	Roth, Karlsruhe

2.1.7 Molekularbiologische Kits und sonstiges

Cell Proliferation Kit II (XTT)	Roche, Basel, CH
DAB-Kit	Dako, Glostrup, DK
FailSafe™ PCR PreMix Selection Kit	Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA
Kunststoffwaren	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA BD Falcon™, Franklin Lakes, NJ, USA CORNING, Corning, NY, USA Eppendorf, Hamburg Nunc, Naperville, IL, USA Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Microtainer SST	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAprep Spin MiniPrep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAshredder (50)	Qiagen GmbH, Hilden
Quantikine human CXCL10 ELISA (DIP100)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
Quantikine human CXCL11 ELISA (DCX110)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
Quantikine murine CXCL10 ELISA (MCX100)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
Quantikine murine CXCL9 ELISA (MCX900)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
RNase-ExitusPlus™	AppliChem, Darmstadt
RNeasy Mini Kit (50)	Qiagen GmbH, Hilden
SYBR®Green Polymerase Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

2.2 Medien und Puffer

2.2.1 Stammlösungen und Puffer

10x Trispuffer	60,5 g TRIZMA (Sigma T1503) in 700 ml H ₂ O _{dd} lösen 2N HCl pH = 7,6 90 g NaCl
3 % Paraformaldehyd (PFA)	100 ml PBS (pH 7,4) 3 g PFA auf 80°C erhitzen, abkühlen lassen, 10 µl CaCl ₂ (1 M) 10 µl MgCl ₂ (1 M) pH auf 7,4 einstellen und steril filtrieren Aliquots bei -20°C lagern
50x TRIS-Acetat-EDTA (TAE)	2 M TRIS, pH = 8,0 1 M Eisessig 0,1 M EDTA
AFA-Fixierungspuffer	75% Ethanol 20% Formaldehyd (Formalin) 5% Eisessig
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O _{dd} , steril filtrieren
Citratpuffer	8 ml 0,1 M Zitronensäure 17 ml 0,1 M Natriumcitrat 25 ml H ₂ O _{dd}
Diethylpyrocarbonat (DEPC) - H ₂ O	0,1% DEPC in H ₂ O _{dd} , 12-24 h rühren und im Anschluss autoklavieren
DNA-Auftragungspuffer (6x)	1 ml 10x TAE 1 ml Orange G (10 mg/ml) 5 ml Glycerol 3 ml H ₂ O _{dd}

DNA-Auftragspuffer grün (6x)	1 ml 10x TAE 1 ml Orange G (10 mg/ml) 0,5 ml Xylencyanol (20 mg/ml) 5 ml Glycerol 3 ml H ₂ O _{dd}
Eosin Färbelösung	50 ml Eosin Stock 150 ml EtOH 80% 1 ml Eisessig
Eosin Stammlösung	1 g Eosin 20 ml H ₂ O _{dd} erwärmen und lösen 80 ml EtOH 96-100%
LB-Medium 1/2 NaCl (<i>Low Salt</i> für Zeocin-Selektion)	1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt 0,5% (w/v) NaCl (1,5% (w/v) Agar bei Herstellung fester Nährböden)
LB-Medium, pH 7,0	1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt 1% (w/v) NaCl (1,5% (w/v) Agar bei Herstellung fester Nährböden)
Lysepuffer	100 mM NaCl 50 mM Tris/HCl (pH 7,5) 0,5% (w/v) SDS (<i>sodium dodecyl sulfate</i>) 5 mM EDTA
PBS	9,55 g PBS Dulbecco mit H ₂ O _{dd} auf 1 Liter auffüllen

SOC Medium	2% (w/v) Trypton
	0,5% (w/v) Hefe-Extrakt
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	20 mM Glukose
	im Anschluss steril filtrieren

2.2.2 Medien für die Zellkultur

Fötales Kälberserum wurde zur Inaktivierung von Komplementfaktoren vor Gebrauch 30 Minuten auf 56°C erhitzt.

Main Culture Media (MCM) (<i>Falguieres et al., 2008</i>)	FKS 20% (v/v)
	Pen/Strep 1% (v/v)
	Gentamycin 1% (v/v)
	ABAM 1% (v/v)
	Glutamin 1% (v/v)
	Insulin 0,5% (v/v)
	EGF 0,02% (v/v)
	Auf 100% (v/v) mit DMEM auffüllen
Tissue Collection Medium (TCM) (<i>Falguieres et al., 2008</i>)	FKS 2,5% (v/v)
	Pen/Strep 1% (v/v)
	Gentamycin 1% (v/v)
	ABAM 1% (v/v)
	Glutamin 1% (v/v)
	Auf 100% (v/v) mit DMEM auffüllen
DMEM ⁺⁺⁺	DMEM
	7% (v/v) fötales Kälberserum
	1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
	1% (v/v) L-Glutamin

DMEM ¹⁰⁺⁺⁺	DMEM 10% (v/v) fötales Kälberserum 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin 1% (v/v) L-Glutamin
DMEM ^{Z10+++}	DMEM 0,4% (v/v) Zeocin [100 mg/ml] 10% (v/v) fötales Kälberserum 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin 1% (v/v) L-Glutamin
GlutaMAX	Mc Coy`s 5A, GlutaMAX™ 7% (v/v) fötales Kälberserum 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin

Zum Ablösen der adhärennten Zellen wurde Trypsin-EDTA (1x) verwendet.

2.3 Zelllinien und Versuchstiere

2.3.1 Zelllinien

Name der Zelllinie	Medium	Eigenschaften	Referenz
CaCo2	DMEM ⁺⁺⁺	Humane Kolorektal-Adenokarzinom-Zelllinie, ATCC: HTB-37 TM	<i>Adachi et al., 1987; Didier et al., 1996; Jumarie und Malo, 1991</i>
DLD1	DMEM ⁺⁺⁺	Humane Kolorektal-Adenokarzinom-Zelllinie, ATCC: CCL-221 TM	<i>Dexter et al., 1979</i>
HCT116	GlutaMAX	Humane Kolorektal-Adenokarzinom-Zelllinie, ATCC: CCL-247 TM	<i>Brattain et al., 1981</i>
HT29	DMEM ⁺⁺⁺	Humane Kolorektal-Adenokarzinom-Zelllinie, ATCC: HTB-38 TM	<i>Fogh et al., 1977; Pollack et al., 1981</i>
SW480	DMEM ⁺⁺⁺	Humane Kolorektal-Adenokarzinom-Zelllinie, ATCC: CCL-228 TM	<i>Fogh et al., 1977; Trainer et al., 1988</i>
CT26	DMEM ¹⁰⁺⁺⁺	Murine Kolonkarzinom-Zelllinie, induziert durch N-nitroso-N-methylurethan, gewonnen aus C3H/HeJ Mäusen	<i>Bharhani et al., 2006; Griswold und Corbett, 1975; Lerner et al., 1983</i>

Tabelle 1: Zelllinien

Bakterien:

Bakterienstamm	Genotyp
<i>E.coli</i> TOP10	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL (Str [®]) endA1 nupG

Tabelle 2: Bakterien

2.3.2 Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden im spezifisch pathogenfreien (SPF/SOPF) Bereich des Zentrums für präklinische Forschung am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München gezüchtet und gehalten.

Mausstamm	Hintergrund	Eigenschaften	Herkunft
Ras (pVillin-K-ras ^{V12G})	C57BL/6N	Transgen, onkogenes K-rasV12G unter Kontrolle des murinen Villin-Promotors (Expression im Darmepithel)	Inst. Curie, Paris, FR (<i>Janssen et al., 2002</i>)
Apc (Apc ^{1638N})	C57BL/6N	Knock-in im Tumorsuppressorgen Apc (adenomatous polyposis coli), Allel Apc1638N, heterozygot	R. Fodde, Rotterdam, NL (<i>Fodde et al., 1994</i>)
Rag1 ^{-/-} (C.129S7(B6)-Rag ^{<tm1Mom>} /J)	Balb/c	Fehlen von T- und B-Zellen sowie von CD3 ⁺ und T-Zellrezeptor (alpha-beta) positiven Zellen.	Charles River, Sulzfeld
wt	C57BL/6N	Wildtyp	Charles River, Sulzfeld
Balb/c (BALB/cAnNCrl)	Balb/c	Wildtyp	Charles River, Sulzfeld
Kreuzungen verschiedener Mausstämme (eigene Zucht)			
RasApc	pVillin-K-ras ^{V12G} xApc ^{1638N}	Kreuzung von pVillin-K-ras ^{V12G} und Apc ^{1638N} -Mäusen	(<i>Janssen et al., 2006</i>)

Tabelle 3: Mausstämme

2.3.3 Patienten

2.3.3.1 Patientenkollektiv

Das untersuchte Patientenkollektiv umfasste 163 Patienten mit kolorektalem Karzinom (vergleiche Tabelle 11), die zwischen 1987 und 2011 an der chirurgischen Klinik des Klinikums rechts der Isar der TU München operiert wurden. Die Krankengeschichte wurde nach der Operation im Durchschnitt 96 Monate verfolgt (0-180 Monate). Während dieser Zeit starben 39 der Patienten tumorbedingt. Zu Kontrollzwecken wurden 29 Normalschleimhautgewebeproben aus operativ reseziertem Gewebe und 11 kolorektale Lebermetastasen untersucht. Patienten mit Resektionsstatus R1, R2 oder Rx wurden von der Überlebensanalyse ausgeschlossen (n=43). Keiner der Patienten litt an einem Zweitkarzinom, multizentrischem Auftreten des Karzinoms oder erhielt eine neoadjuvante Vorbehandlung. Eine schriftliche Einwilligung der Patienten zur Verwendung der Gewebeproben zu Forschungszwecken und eine Zustimmung der Ethikkommission liegt vor. Die Bestimmung des histologischen Typs, des pathologischen Tumorstadiums sowie die Einteilung nach TNM-Klassifikation erfolgten anhand der UICC Kriterien durch das Institut für Pathologie der TU München. Des Weiteren wurden neben den TNM-Stadien, R-Status, Lymph- und Blutgefäßinvasion, Anzahl der entnommenen Lymphknoten und Zahl der positiven Lymphknoten für Tumorinvasion als klinische Parameter erfasst. Nach der Tumorresektion wurden die Gewebeproben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Weiterverarbeitung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.3.3.2 *Ex vivo* Organkultur

Die für die *ex vivo* Organkultur verwendeten Kolonkarzinome (n=23) und nicht vorbehandelten Rektumkarzinome (n=2) wurden den Patienten (16 männliche und 9 weibliche) im Alter von 28 bis 88 Jahren (Medianes Alter = 64 Jahre) chirurgisch entfernt. Die Patienten wurden zuvor über die weitere Verwendung ihres Gewebes informiert und haben dieser zugestimmt. Des Weiteren wurde die Nutzung durch die Ethikkommission des Klinikums rechts der Isar der TU München geprüft und bewilligt. Das Gewebe wurde direkt nach der Entnahme vom pathologischen Dienst beurteilt und in Tumor- bzw. Normalgewebe unterteilt. Die zugewiesenen Gewebestücke wurden sofort in TCM (2.2.2) gegeben und bei 4°C gelagert. Dies dient dem Erhalt der Vitalität des Gewebes. Um Kontaminationen zu verhindern wurden die

Gewebestücke direkt vor der weiteren Verwendung dreimal mit sterilem PBS gewaschen. Um die Diffusion zu maximieren wurde das Gewebe möglichst dünn geschnitten. Vom Gewebe wurden jeweils 10-50 mg eingewogen und in MCM (2.2.2) gegeben. Die Zusammensetzung des MCM wurde dahingehend optimiert, dass die Gewebeprobe über einen Zeitraum von mindestens 24 Stunden darin überleben konnten. Wahlweise wurden als Stimulanzen hIFN γ [10 μ g/ml], mTNF α [10 ng/ml] oder eine Kombination aus hIFN γ [10 μ g/ml] und mTNF α [10 ng/ml] zugegeben. Das Gewebe wurde daraufhin in Mikrotiterplatten mit 48 Vertiefungen für 22 Stunden bei 37°C und 7% CO $_2$ inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Überstände abgenommen, und um jegliche Verunreinigungen durch Zellen auszuschließen, wurde 15 Minuten bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert und erneut der Überstand abgenommen. Das Sediment wurde verworfen. Bis zur weiteren Verwendung wurde der Überstand bei -80°C gelagert.

2.4 Antikörper und Oligonukleotide

2.4.1 Antikörper für Immunfluoreszenz

Antikörper gegen / Färbereagenz	Herkunft (Spezies)	Verdünnung/ Konzentration	Fixierung	Referenz
CD4 (BC/1F6)	Maus	1:50 0,5 µg/ml	PFA/10 min in Citratpuffer kochen/Block mit Ziegen Serum	Abcam, Cambridge, UK
CD8 (RAVB3)	Maus	1:100	PFA	Abcam, Cambridge, UK
FoxP3	Maus	1:100 10 µg/ml	PFA	Abcam, Cambridge, UK
CXCL11	Kaninchen	3 µg/ml	PFA	Abcam, Cambridge, UK
CD62L (DREG-56)	Maus	1:100	Aceton/ Block mit Ziegen Serum	Abcam, Cambridge, UK
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	-	1:2000 10 µg/ml	PFA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ki67 (MIB1)	Kaninchen	1:300	PFA	Dako, Glostrup, DK
Von-Willebrand-Faktor (VWF)	Kaninchen	1:100 10 µg/ml	PFA	Millipore, Eschborn
Zweitantikörper gegen				
Maus-IgG-Cy3	Ziege	1:300 4,7 µg/ml	-	Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA
Maus-IgG-Alexa488	Ziege	1:300 6,7 µg/ml	-	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Kaninchen-IgG-Cy3	Ziege	1:300 5 µg/ml	-	Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA
Kaninchen-IgG-Alexa488	Ziege	1:300 3,3 µg/ml	-	Molecular Probes, Eugene, OR, USA

Tabelle 4: Antikörper für die Immunfluoreszenz

2.4.2 Antikörper für Immunhistochemie (IHC)

Antikörper gegen	Herkunft (Spezies)	Verdünnung/ Konzentration	Fixierung	Referenz
CD3	Kaninchen	1:300 0,7 µg/ml	PFA	Neomarkers, Fremont, CA, USA
CD31 (PECAM)	Maus	1:500 4,2 µg/ml	PFA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
CD45R0 (Ab2(Clone OPD4))	Maus	1:100	PFA	Neomarkers, Fremont, CA, USA
Zweitantikörper gegen				
Maus-IgG (H+L)	Ziege	1:1000	-	Dianova, Hamburg
Kaninchen-IgG (H+L)	Ziege	1:1000	-	Dianova, Hamburg

Tabelle 5: Antikörper für die Immunhistochemie

2.4.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion GmbH (Planegg/Martinsried) synthetisiert.

2.4.3.1 Oligonukleotide für die Genotypisierung

Oligo- nukleotid	Sequenz	PCR- Programm	Besonderheiten
Apc-A2	TCA GCC ATG CCA ACA AAG TCA	94° 5min 94° 30s } 35x 55° 45s } 72° 45s } 72° 5min	Apc Genotypisierung <i>HOT START</i>
Apc-C2	GGA AAA GTT TAT AGG TGT CCC TTC T	94° 5min 94° 30s } 35x 55° 45s } 72° 45s } 72° 5min	Apc Genotypisierung <i>HOT START</i>
Apc-PN3	GCC AGC TCA TTC CTC CAC TC	94° 5min 94° 30s } 35x 55° 45s } 72° 45s } 72° 5min	Apc Genotypisierung <i>HOT START</i>

Villin - 2kb seq	CAA GCC TGG CTC GAC GGC C	94° 5min 94° 45s } 55° 45s } 35x 72° 45s } 72° 5min	Ras Genotypisierung
Ras 340 as	CTA GGA CCA TAG GTA CAT CCT C	94° 5min 94° 45s } 55° 45s } 30x 72° 45s } 72° 5min	Ras Genotypisierung
Rag1 wt	GAG GTT CCG CTA CGA CTC TG	94° 2min 94° 30s } 58° 45s } 35x 72° 45s } 72° 2min	Rag1-/- (C57/Bl6) Genotypisierung
Rag1 rev	CCG GAC AAG TTT TTC ATC GT	94° 2min 94° 30s } 58° 45s } 35x 72° 45s } 72° 2min	Rag1-/- (C57/Bl6) Genotypisierung
Rag1 mut	TGG ATG TGG AAT GTG TGC GAG	94° 2min 94° 30s } 58° 45s } 35x 72° 45s } 72° 2min	Rag1-/- (C57/Bl6) Genotypisierung

Tabelle 6: Oligonukleotidtablelle für Genotypisierungen

2.4.3.2 Oligonukleotide für die qRT-PCR

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Roche UPL probe Nr.
hHPRT fwd	TGA CCT TGA TTT ATT TTG CAT ACC	73
hHPRT rev	CGA GCA AGA CGT TCA GTC CT	73
hFoxP3 fwd	ACC TAC GCC ACG CTC ATC	50
hFoxP3 rev	TCA TTG AGT GTC CGC TGC T	50
hGATA3 fwd	CTC ATT AAG CCC AAG CGA AG	71
hGATA3 rev	GTC TGA CAG TTC GCA CAG GA	71
hGranzym B fwd	AGA TGC AAC CAA TCC TGC TT	18
hGranzym B rev	CAT GTC CCC CGA TGA TCT	18
hT-bet fwd	CAC CTG TTG TGG TCC AAG TTT	9
hT-bet rev	TGA CAG GAA TGG GAA CAT CC	9
hROR γ t fwd	GCC CCA CAG AGA CAG CAC	24
hROR γ t rev	TTG TGA GGT GTG GGT CTT CTT	24
m β Aktin fwd	AAG GCC AAC CGT GAA AAG AT	56

mβAktin rev	GTG GTA CGA CCA GAG GCA TAC	56
mCD3ε fwd	CTT GTA CCT GAA AGC TCG AGT G	10
mCD3ε rev	GAT GAT TAT GGC TAC TGC TGT CA	10
mFoxP3 fwd	GCG AAA GTG GCA GAG AGG TA	92
mFoxP3 rev	CCA CAG CAT GGG TCT GTC T	92
mGATA3 fwd	TTA TCA AGC CCA AGC GAA G	108
mGATA3 rev	TGG TGG TGG TCT GAC AGT TC	108
mGranzym B fwd	ACA TGG CCT TAC TTT CGA TCA	66
mGranzym B rev	GCC CCC AAA GTG ACA TTT ATT	66
mT-bet fwd	TCA ACC AGC ACC AGA CAG AG	19
mT-bet rev	AAA CAT CCT GTA ATG GCT TGT G	19

Tabelle 7: Oligonukleotidtablelle für Roche UPL qRT-PCR. Die Temperatur betrug bei allen probes in der qRT-PCR 60°C. Die Abkürzung h steht für human, m für murin, fwd für forward und rev für reverse.

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'
hHPRT fwd	GCT TTC CTT GGT CAG GCA GTA TAA T
hHPRT rev	AAG CGC ATA TCC TAC AAC AAA CTT
hCXCL9 fwd	TGC AAG GAA CCC CAG TAG TGA
hCXCL9 rev	GGT GGA TAG TCC CTT GGT TGG
hCXCL10 fwd	CGC TGT ACC TGC ATC AGC ATT
hCXCL10 rev	GCT CCC CTC TGG TTT TAG GAG
hCXCL11 fwd	GCT ATA GCC TTG GCT GTG ATA TTG TG
hCXCL11 rev	CTG CCA CTT TCA CTG CTT TTA CC
mCXCL9 fwd	GAG CTA GAT AGA CCT CAC CAA G
mCXCL9 rev	CCA TTA GCA CCA TCT CTG A
mCXCL10 fwd	TCA CAT CAG CTG CTA CTC CT
mCXCL10 rev	ACA GTA CAG AGC TAG GAC AG
mCXCL11 fwd	AGG AAC CTG ACC CTC TGC TG
mCXCL11 rev	GAA CAG TTT AGA TGT ATC GGG ACC TTC
mβ-Aktin fwd	ACC CAC ACT GTG CCC ATC TAC
mβ-Aktin rev	AGC CAA GTC CAG ACG CAG G

Tabelle 8: Oligonukleotidtablelle für Sybr green qRT-PCR. Die Temperatur betrug bei allen Oligonukleotiden in der qRT-PCR 60°C. Die Abkürzung h steht für human, m für murin, fwd für forward und rev für reverse.

2.4.3.3 Oligonukleotide für die Klonierung und Sequenzierung

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Besonderheiten
mCXCL10 BglII fwd	CGA GAT CTA TGA ACC CAA GTG CTG CC	Klonierung von mCXCL10 in pBudCE4.1+LacZ Vektor
mCXCL10 BglII rev	GCG GCA GAT CTT TAA GGA GCC CTT TTA G	Klonierung von mCXCL10 in pBudCE4.1+LacZ Vektor
hITAC BglII fwd	CCA GAT CTA TGA GTG TGA AGG GC	Klonierung von hITAC in pBudCE4.1+LacZ Vektor
hITAC BglII rev	GCG GCA GAT CTT TAA AAA TTC TTT CTT TCA AC	Klonierung von hITAC in pBudCE4.1+LacZ Vektor
hIP10 KpnI fwd	GCG GTA CCA TGA ATC AAA CTG CC	Klonierung von hIP10 in pBudCE4.1+LacZ Vektor
hIP10 XhoI rev	GCT CGA GTT AAG GAG ATC TTT TAG ACC TTT C	Klonierung von hIP10 in pBudCE4.1+LacZ Vektor
mITAC BglII fwd	CGA GAT CTA TGA ACA GGA AGG TCA CAG CC	Klonierung von mITAC in pBudCE4.1+LacZ Vektor
mITAC BglII rev	CCG GCA GAT CTT CAC ATG TTT TGA CGC	Klonierung von mITAC in pBudCE4.1+LacZ Vektor

Tabelle 9: Oligonukleotide für Klonierungen. Die Abkürzung h steht für human, m für murin, fwd für forward und rev für reverse.

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Besonderheiten
BGH rev	TAG AAG GCA CAG TCG AGG	Sequenzierung
EF-1a fwd	TCA AGC CTC AGA CAG TGG TTC	Sequenzierung

Tabelle 10: Oligonukleotidtablelle für Sequenzierungen. Die Abkürzung fwd steht für forward und rev für reverse.

2.5 Methoden

2.5.1 Molekularbiologische Methoden

2.5.1.1 Isolierung von DNA für die Genotypisierung

Zur Ermittlung des Genotyps wurde den Jungtieren Schwanzproben entnommen. Diese Proben wurden über Nacht in 500 µl Lysepuffer (2.2.1) und 7,5 µl Proteinase K [10 mg/ml] bei 56°C und 350 rpm verdaut. Anschließend wurde die DNA mit 500 µl Isopropanol gefällt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurden die Proben für 30 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment zweimal mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Die DNA wurde in 400 µl H₂O_{dd} gelöst und bei 4°C gelagert, bevor sie für die Genotypisierungs-PCR verwendet wurde.

2.5.1.2 Restriktionsverdau zum Ausschneiden spezifischer DNA Fragmente aus Vektoren und PCR-Produkten

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische 4 bis 10 bp lange DNA-Sequenzmotive und spalten den DNA-Doppelstrang innerhalb der Erkennungssequenz hydrolytisch, wobei die Schnittstellen je nach Enzym glatte Enden („*blunt ends*“) oder überstehende Enden („*sticky ends*“) bilden können. Diese können anschließend wieder mit anderen DNA-Bruchstücken mit komplementären Enden verbunden werden. Der Restriktionsverdau kann zum Nachweis oder zur Umklonierung von bestimmten DNA-Fragmenten verwendet werden. Zur Klonierung von Plasmiden, für die stabile Transfektion und anschließende Implantation im orthotopen Modell, wurden die Ausgangsplasmide sowie die zu integrierenden DNA-Fragmente (Inserts) mit denselben „*sticky end*“-bildenden Restriktionsenzymen geschnitten. Plasmid und Insert besaßen dadurch komplementäre Enden und konnten so später zusammengefügt werden. Das Enzym wurde in einer Konzentration von 1 U/µg DNA mit dem entsprechenden Puffer in einem Volumen von 20-80 µl angesetzt. Die Reaktionszeit lag bei dem verwendeten FastDigest® (FD) Enzymen zwischen 10 und 30 min bei 37°C.

2.5.1.3 Ligation von DNA-Molekülen

Mit Hilfe des Enzyms Ligase können 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Enden von Nucleinsäuren miteinander verknüpft werden. Der Vektor und das Insert wurden hierfür mit denselben Restriktionsenzymen verdaut und in einem Verhältnis von 1:3, 1:5 bzw. 1:10 mit dem entsprechenden Puffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (ca. 5 U) in einem Gesamtvolumen von 20 µl in die Ligation eingesetzt. Die Reaktion wurde 20 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Die Berechnung der einzusetzenden Mengen wurden über einen Online-Rechner "REviewer™ Calculators" ermittelt.

2.5.1.4 Aufreinigung von DNA für die Sequenzierung

DNA für die Sequenzierung wurde über das "QIAprep Spin Miniprep Kit" nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die anschließende Sequenzierung wurde von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt.

2.5.1.5 Isolierung von RNA

Für die Arbeiten mit RNA wurden ausschließlich RNase-freie Lösungen, Pipettenspitzen und Geräte verwendet. Die Geräte wurden vor Gebrauch mit einer 5 M NaOH-Lösung oder mit "RNase-Exitus Plus" behandelt, um eventuell vorhandene RNasen zu denaturieren. Die RNA wurde kurzfristig bei -20°C oder langfristig bei -80°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch die Messung mit einem Photometer (NanoDrop ND-1000).

2.5.1.5.1 *Isolierung gesamtzellulärer RNA aus Gewebeproben*

Für die Isolierung von RNA wurden in flüssigem Stickstoff schockgefrorene und bei -80°C gelagerte Gewebeproben verwendet. Das Gewebe wurde in gefrorenem Zustand abgewogen (ca. 50-100 mg), mit 1 ml Trireagenz (je 100 mg Probe) versetzt, und anschließend mit dem *Tissue Lyser* homogenisiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurde 200 µl Chloroform (je 100 mg Probe) zugegeben und homogenisiert. Zur Abtrennung der RNA wurden die Proben bei 14.000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und die RNA mit 500 µl Isopropanol (je 100 mg Probe) gefällt. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wurde erneut bei 14.000 rpm und 4°C für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Die RNA wurde mit

50 µl (Probe < 70 mg) bzw. 100 µl (Probe > 70 mg) RNase-freiem H₂O_{dd} versetzt und 10 min bei 56°C gelöst.

2.5.1.5.2 RNA Isolierung von Zellen

Zur Isolierung gesamtzellulärer RNA aus Zellen wurde zunächst die Zellzahl ermittelt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt nach Anfärben der toten Zellen mit 0,2% Trypanblau und 0,9% NaCl in PBS in einer Neubauer Zählkammer. Unter Berücksichtigung der Zellzahl wurden die Proben mit dem "QIAshredder" und daraufhin mit dem "RNEasy Mini Kit" nach Anleitung des Herstellers weiterverarbeitet. Hierbei war es wichtig, das Zellpellet bei weniger als 5x10⁶ Zellen in 350 µl RLT Puffer und ab 5x10⁶ Zellen in 600 µl RLT Puffer aufzunehmen.

2.5.1.6 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm. Die optische Dichte von 1,0 entspricht einem RNA-Gehalt von 40 µg/ml. Die Reinheit der RNA lässt sich über den Quotienten aus der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm berechnen. Bei reiner RNA liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2,0.

2.5.1.7 Aufreinigung von PCR-Produkten für die Klonierung

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das "PCR Purification Kit" verwendet. Die Aufreinigung erfolgte für PCR-Proben, die nach der Amplifizierung sequenziert wurden. Mehrere parallele PCR-Ansätze wurden vereinigt und nach Anleitung des Herstellers über Qiagen-Säulen aufgereinigt.

2.5.1.8 cDNA Synthese (Reverse Transkription)

Die reverse Transkription dient der Umschreibung von mRNA in komplementäre DNA (cDNA). Dieses Verfahren beruht auf den aus der Replikation von Retroviren gewonnenen Erkenntnissen (*Gerard et al., 1986; Houts et al., 1979; Kotewicz et al., 1985*). Für einen 40 µl Ansatz wurden 2 µg RNA eingesetzt. Als Primer dienten folgende synthetische Oligonukleotide: der Oligo-dT-Primer der sich an den poly-A-Schwanz der mRNA anlagert und der *random*-Primer (Hexamer-Oligonukleotid), welcher aus sechs zufällig zusammengesetzten Nukleotiden besteht. In einem ersten Schritt wurde die mRNA mit jeweils 1 µl [10 µM] Oligo-dT- und Random-Primern für 10 min auf 70°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt, um Sekundärstrukturen in der RNA aufzulösen. Nach Zugabe von 8 µl 5x Transkriptionspuffer, 2 µl dNTP-Mix

[10 mM], 1 µl Ribonuklease Inhibitor und 1 µl Reverse Transkriptase (RevertAid H-minus M-MuLV) wurde die mRNA während einer einstündigen Inkubation bei 42°C in cDNA umgeschrieben. Die Reaktion wurde nach einer Stunde durch Denaturierung des Enzyms gestoppt, indem der Ansatz für fünf Minuten auf 95°C erhitzt wurde. Die so erhaltene cDNA wurde als Matrize für die qRT-PCR eingesetzt.

2.5.1.9 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR (*Saiki et al., 1986*) können definierte DNA-Abschnitte mittels spezifischer Oligonukleotide, genannt Primer, amplifiziert werden. Nach Hitzedenaturierung der doppelsträngigen DNA erfolgt die Anlagerung (*annealing*) der Primer an die einzelsträngige DNA. Dieser kurze Doppelstrang wird durch eine spezielle hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) verlängert, wobei aus einem Doppelstrang zwei neue synthetisiert werden. Bei zyklischer Wiederholung von Hitzedenaturierung, Primerhybridisierung und Primerverlängerung kann der jeweilige DNA-Abschnitt exponentiell vervielfältigt werden. In einem 50 µl-Ansatz wurden 3 µl DNA, 5 µl Reaktionspuffer Taq-Puffer + KCl (10x), 1,0 µl dNTPs [5 mM], 1,5 µl MgCl₂ [25 mM], jeweils 1 µl [25 µM] Primer *forward* und *reverse* und 2,0 µl Taq-Polymerase (1:4 verdünnt) gemischt und mit H₂O_{dd} auf 50 µl aufgefüllt. Zur Gewinnung des murinen CXCL10 wurde das "FailSafe™ PCR PreMix Selection Kit" nach Anweisung des Herstellers eingesetzt. Bei der Genotypisierung der Apc^{1638N}-Mäuse wurde ein „Hotstart“ durchgeführt, d.h. die Taq-Polymerase wurde erst nach der anfänglichen Denaturierung (5 min bei 94°C) zum PCR-Ansatz gegeben. Der Reaktionszyklus wurde auf jedes Primerpaar abgestimmt und ist unter 2.4.3.1 für alle Reaktionen aufgeführt. Nach dem letzten Zyklus blieb das Reaktionsgemisch für 2-5 Minuten auf 72°C zur vollständigen Verlängerung des PCR-Produktes. Anschliessend wurde auf 4°C heruntergekühlt, um das Reaktionsprodukt bis zur Weiterverarbeitung zu lagern. Für längere Lagerzeiten wurde die DNA bei -20°C bzw. -80°C aufbewahrt.

2.5.1.10 Real-time PCR

Mit Hilfe der qRT-PCR (*quantitative real-time PCR*) erhält man mit Hilfe der Menge an gebildeter cDNA eine direkte quantitative Aussage über die im Ausgangsmaterial vorhandene Menge an mRNA. Zur Durchführung der qRT-PCR wurde das SYBR® Green System, bzw. das UPL System verwendet. Beim SYBR® Green System handelt es sich um einen in die DNA interkalierenden Farbstoff. Durch dessen

Bindung in die kleine Furche der doppelsträngigen DNA wird die emittierte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein Vielfaches verstärkt und man erhält ein Signal, dessen Intensität direkt proportional zur Zahl der vorhandenen Doppelstränge ist. Nach einer bestimmten Zyklenzahl (Ct) wird ein Fluoreszenzsignal messbar. Dieses Signal ist direkt proportional zur Menge an gebildeter DNA und steigt, wie auch die DNA-Menge, exponentiell bis zum Erreichen eines Maximums an. Korreliert man nun den logarithmischen Anstieg mit dem entsprechenden Zyklus, setzt dies in Verhältnis zur Transkription eines „*Housekeeping*“-Gens wie β -Aktin oder HPRT, so erhält man eine quantitative Aussage.

In einem 30 μ l Ansatz wurden 3 μ l H₂O_{dd}, je 1 μ l [25 μ M] Primer *forward* bzw. *reverse*, 15 μ l SyBr®Green I PCR Mastermix und 10 μ l cDNA [10 ng/ μ l] gemischt. Ein Reaktionszyklus umfasste die folgenden Schritte: 50°C für 2 min, 95°C für 10 min, 95°C für 15 s und 60°C für 1 min, wobei die letzten beiden Schritte 40 mal durchlaufen wurden. Um die Spezifität der Fluoreszenz zu überprüfen, wurde nach dem Lauf zusätzlich der Schmelzpunkt der PCR-Produkte bestimmt. Der Reaktionszyklus dieser Dissoziationsreaktion umfasste die folgenden Schritte: 95°C für 15 s, 60°C für 20 s und 95°C für 15 s. Die Reaktionen wurden mit dem 7300 Real-Time PCR System durchgeführt und mit Hilfe des Programms Sequence Detection Software v.1.4 ausgewertet.

Die *Universal Probe Library* (UPL) wird für die qRT-PCR mittels Probenhydrolyse verwendet. Der *Hydrolysis Probe Assay* ist eine weitere Methode, um cDNA mittels qRT-PCR quantitativ nachzuweisen. Technisch kann die Methodik beschrieben werden als homogener 5'-Nuklease Assay, da das 3' Ende der Probe phosphoryliert ist, welches durch die 5'- Exonuklease Aktivität der Polymerase abgespalten wird. Die Einzelprobe enthält zwei Labels, einen Fluoreszenzreporter und einen "Quencher", die räumlich nahe beieinander sind. Wenn die Probe intakt ist, ist der Quencher Farbstoff nah genug, um das Reporter Fluoreszenzsignal zu unterdrücken. In der durch die Exonuklease-Aktivität abgespaltenen Probe ist der Reporter nicht länger inhibiert und emittiert ein Fluoreszenzsignal.

In einem 20 μ l Ansatz wurden 4,4 μ l H₂O_{dd}, je 0,2 μ l Primer *forward* bzw. *reverse* [20 μ M], 10 μ l 2x DynAmo™ Color Flash Probe Master Mix, je 0,2 μ l UPL-Sonde [10 μ M] und 10 μ l cDNA [10 ng/ μ l] gemischt. Die Selektion von *probe* und Primer erfolgte mittels Internet (<http://www.universalprobelibrary.com>). Ein Reaktionszyklus

umfasste die folgenden Schritte: 95°C für 10 min, 95°C für 15 s und 60°C für 1 min, wobei die letzten beiden Schritte 40 mal durchlaufen wurden.

2.5.1.11 Auftrennung von PCR-Produkten im Agarosegel

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht es, DNA-Fragmente nach Größe aufzutrennen, zu analysieren, zu reinigen und deren Menge abzuschätzen. Die PCR-Produkte wurden in 1% (w/v) Agarosegelen mit einen Trennbereich von 0,5-10 kb in TAE-Puffer (2.2.1) aufgetrennt. Der Gellösung wurden nach dem Aufkochen 0,1 µg/ml Ethidiumbromid unter dem Abzug zugesetzt. Die DNA wurde mit dem entsprechenden Volumen 6x DNA-Auftragspuffer (2.2.1) gemischt und aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100-125 V. Als Größenstandard dienten GeneRuler™ 100 bp oder 1 kb DNA Marker, entsprechend der zu erwartenden Produktgröße. Die DNA konnte nach Einbau des Ethidiumbromids in die Doppelhelix unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht und fotografiert werden (Gel Doc XR System).

2.5.1.12 Plasmidisolation aus E.coli K12

Zur Isolation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab wurden die Zellen von 5-500 ml einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur geerntet (8000 rpm, 5 min, 4°C) und die Plasmide mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Mini bzw. Maxi Kit nach Anleitung des Herstellers isoliert und aufgereinigt. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erfolgte durch die Messung der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm mit dem Photometer NanoDrop® ND-1000. Der Reinheitsgrad sollte hierbei $\geq 1,70$ betragen. Dieser ergibt sich aus dem Quotienten der beiden Werte ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$). Im Anschluss wurden alle weiteren Arbeiten auf Eis durchgeführt und die DNA bei -20°C gelagert.

2.5.1.13 Transformation von kompetenten E.coli K12

Die Transformation von TOP10-Bakterien wurde mittels Hitzeschock durchgeführt. Hierfür wurden 200 µl der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und ca. 50 ng Plasmid-DNA zugegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde der Hitzeschock für 90 s im 42°C Wasserbad durchgeführt und die Zellen im Anschluss daran für weitere 2 min auf Eis gestellt. Nachfolgend wurden 600 µl SOC-Medium ohne Antibiotika zugegeben und die Zellen 30-60 min bei 37°C und 350 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Die Transformation diente lediglich der Amplifikation eines charakterisierten

Plasmides, es wurden 250 ml antibiotikaenthaltendes LB-Medium (100 µl/ml Ampicillin) in 1 l Kolben vorgelegt, der Transformationsansatz überführt und die Bakterienkultur über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Um den Erfolg einer Ligation zu überprüfen, wurde der Transformationsansatz auf LB/Amp-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einige der angewachsenen Bakterienkulturen gepickt und steril in Flüssigmedium (LB-Medium mit 100 µl/ml Ampicillin) überführt und bei 37°C inkubiert. Weitere 24 Stunden später wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep nach Angaben des Herstellers Plasmid-DNA aufgereinigt und mit den zuvor verwendeten Restriktionsendonukleasen verdaut. Nach Auftrennung der verdauten DNA auf einem 1% Agarosegel konnte der Erfolg der Ligation durch die Analyse der Bandenverteilung im Gel nachgewiesen werden.

2.5.1.14 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Gelstücken

Nach der elektrophoretischen Auftrennung von Restriktionsansätzen wurde die Bande des gewünschten DNA-Fragments unter möglichst kurzer Bestrahlung mit UV-Licht mit einem Skalpell exakt aus dem Gel ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte unter Zuhilfenahme des QIAquick Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers. Die hierbei gewonnenen DNA-Fragmente wurden direkt für die Ligation eingesetzt bzw. bei -20°C gelagert.

2.5.2 Tierexperimentelle Methoden

2.5.2.1 Orthotope Zellimplantation

Diese Methode wurde in Zusammenarbeit mit PD Dr. Gertraud Orend, Universität Strasbourg, INSERM U682, in Übereinstimmung mit den lokalen Ethikrichtlinien etabliert und durchgeführt. Mit Hilfe der orthotopen Zellimplantation können Tumorzellen aus einem bestimmten Organ in den natürlichen Tumorsitus in einem Versuchstier eingebracht werden. Durch diese Technik wird es möglich, einen Tumor in seiner natürlichen Umgebung zu betrachten sowie Tumor- und Stromainteraktionen zu analysieren. Alle Tiere wurden mittels Gasanästhesie (Isofluran) operiert. Das Isofluran (2% Isofluran in 2 l/min Sauerstoff) wurde den Mäusen mittels einer Gesichtsmaske zugeführt. Um Augenschäden der Mäuse während der OP zu verhindern, wurde Dexpanthenolsalbe auf die Augen aufgetragen. Des Weiteren lagen die Mäuse während der gesamten Operation auf

einer Wärmeplatte, um ihre Körpertemperatur möglichst konstant zu halten. In der Medianlinie des Abdomens wurde ein Scheitel gezogen und entlang dessen geöffnet. Zum Öffnen der Bauchhaut wurde entlang der Linia Alba geschnitten, um Einblutungen in den Bauchraum zu vermeiden bzw. möglichst gering zu halten. Mit Hilfe eines in HBSS getauchten Stieltupfers wurden Zökum und der Dünndarm lateralisiert, um den Kolon freizulegen. In den distalen Kolon wurde eine nichttraumatische Gefäßklemme 2 cm proximal des Rektums gesetzt und ein Katheter (16 GA) rektal 1,9 cm tief eingeführt. Dieser definierte Bereich des Kolon wurde dreimal mit jeweils 1 ml HBSS (37°C) gespült. Eine zweite nicht traumatische Gefäßklemme wurde 1 cm proximal des Rektums gesetzt um einen 1 cm langen Bereich für die Zellimplantation zu definieren. Dort wurde mit Hilfe des Katheters das Trypsin eingebracht, bis ein prall gefüllter "Loop" (Darmabschnitt) entstanden war, und für 30 Minuten inkubiert. Während dieser Inkubationsphase wurde der geöffnete Bauchraum immer wieder mit HBSS beträufelt, um die Organe feucht zu halten. Zusätzlich wurde der eröffnete Bereich mit einem in HBSS getränkten Stück sterilem Verbandmaterial bedeckt, um einer Verunreinigung und daraus resultierenden Infektion entgegen zu wirken. Nach 30 Minuten Trypsininkubation wurde die Klemme 1 cm proximal des Rektums geöffnet, um das Kolon erneut mit HBSS zu spülen. In den trypsinierten Bereich wurden im Anschluss 1×10^6 CT26-, CT26^{+CXCL10}- oder CT26^{-CXCL10}-Zellen in HBSS eingebracht, bis ein prall gefüllter "Loop" entstanden war. Nach einer erneuten Inkubation von 30 Minuten wurden beide Klemmen entfernt und die Muskelschicht sowie das Peritoneum mit einer fortlaufenden Naht und die Cutis sowie die Subcutis mit einer Einzelknopfnahnt verschlossen.

2.5.2.2 Blutentnahme im Finalversuch

Zur Bestimmung der systemischen Konzentration der CXC-Chemokine wurde allen Mäusen Blut abgenommen. Die Mäuse wurden durch die Gabe von Diethylether mittels Inhalationsnarkose betäubt. Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion des retrobulbären Venenplexus oder mittels Herzpunktion. Die verwendeten Serumröhrchen (Microtainer SST) wurden 30 min bei RT inkubiert und im Anschluss daran 2 min bei 10.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80°C gelagert.

2.5.2.3 Organentnahme

Zur Entnahme des Gewebes von Mäusen wurden diese durch Genickbruch schmerzfrei getötet und die jeweiligen Organe nach Desinfektion des Operationsgebietes mit 70% EtOH steril entnommen. Die entnommenen Organe wurden direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren bzw. in Tissue Tek eingebettet und bei -80°C gelagert.

2.5.2.4 Murine *ex vivo* Organkultur

Die für die *ex vivo* Organkultur verwendeten Normal- und Tumorgewebe wurden chirurgisch entfernt. Die Gewebestücke wurden sofort in TCM (2.2.2) gegeben und bei 4°C gelagert. Die Lagerung bei 4°C unterstützt den Vitalitätserhalt des Gewebes. Die Gewebe wurden direkt vor der weiteren Verwendung dreimal mit sterilem PBS gewaschen, um mögliche Kontaminationen zu vermeiden. Zur Maximierung der Diffusion wurde das Gewebe so dünn wie möglich geschnitten. Vom Gewebe wurden jeweils 7-40 mg eingewogen und in MCM (2.2.2) gegeben. Im MCM können die Gewebeproben über einen Zeitraum von mindestens 24 Stunden überleben. Wahlweise wurden als Stimulanzen hIFN γ [10 μ g/ml], mTNF α [10 ng/ml] oder eine Kombination aus hIFN γ [10 μ g/ml] und mTNF α [10 ng/ml] zugegeben. Die "48-well" Platte wurde hierauf 22 Stunden bei 37°C und 7% CO $_2$ inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Überstände abgenommen. Zur Vermeidung möglicher Verunreinigungen durch Zellen wurde 15 Minuten bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert und erneut Überstand abgenommen. Das Sediment wurde verworfen und der Überstand bei -80°C gelagert.

2.5.2.5 Gewebefixierung (*Tissue Fix*)

Das entnommene murine Gewebe wurde in 3% PFA fixiert und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde es dreimal mit PBS gewaschen und in 30% Saccharose in PBS gegeben. Das Gewebe wurde über Nacht bei 4°C gelagert und am nächsten Tag kurzzeitig auf Filterpapier gelegt, um es anschließend in Tissue Tek einzubetten. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.5.2.6 Kryoschnitte

Das von der Maus entnommene Gewebe wurde in Tissue Tek eingebettet und bei -80°C gelagert. Das Gewebe wurde mit einem Kryostat 6-8 μ m dick geschnitten und

auf Superfrost Objektträger übertragen. Die Kryoschnitte wurden für einige Stunden luftgetrocknet und direkt für Färbungen verwendet oder bei -80°C gelagert.

2.5.2.7 Paraffinschnitte

Das von der Maus entnommene Gewebe wurde in Einbettkassetten gelegt und zunächst in AFA-Fixierungspuffer (vergleiche 2.2.1) fixiert. Das Entwässern, Einbetten in Paraffin und Ausgießen der Probe wurde am Institut für Pathologie der TU München durchgeführt. Die fertigen Paraffinblöcke wurden bei Raumtemperatur gelagert. Das Gewebe wurde mit einem Mikrotom $2\ \mu\text{m}$ dick geschnitten, auf Superfrost Objektträger überführt und bei Raumtemperatur gelagert.

2.5.3 Immunhistochemische Methoden

Während der immunhistochemischen Färbung musste darauf geachtet werden, dass die Schnitte stets feucht gehalten wurden, um ein Austrocknen zu verhindern.

2.5.3.1 Hämatoxylin und Eosin Färbung (HE)

Für die histologische Beurteilung des Gewebes wurden die Schnitte mit Hämatoxylin (Zellkernfärbung) und Eosin (Zytoplasmafärbung) gefärbt. Dafür wurden die Objektträger zunächst 1 min in 4% Formalin fixiert und anschließend in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gewaschen. Für die Zellkernfärbung wurden die Schnitte für 5 min mit Hämatoxylin gefärbt und dann 5 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Daraufhin folgte die einminütige Gegenfärbung mit Eosin. Nach kurzem Waschen in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100% Ethanol) dehydriert. Zur Verdrängung des Alkohols wurden die Objektträger daraufhin in Xylol inkubiert und anschließend in Eukitt eingedeckelt. Die Paraffinschnitte mussten vor der

HE-Färbung zunächst entparaffiniert werden (Xylol, absteigende Alkoholreihe).

2.5.3.2 Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten

Die Gewebeschnitte wurden über Nacht bei 60°C fixiert. Die Entparaffinierung der Proben erfolgt mittels einer absteigenden Alkoholreihe. Hierfür wurden die Schnitte zweimal für 10 min in Xylol inkubiert, daraufhin zweimal für 5 min in Isopropanol getaucht und anschließend je 5 min in 96% und 70% Ethanol gegeben. Die Proben wurden anschließend in Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6,7 gegeben und für 7 min im Dampfdruckkochtopf oder einer Mikrowelle gekocht. Im Anschluss wurden

die Proben dreimal mit Trispuffer gespült und für 10 min in 6% (v/v) H₂O₂ inkubiert. Anschließend wurden die Proben erneut dreimal mit Trispuffer gewaschen. Zur Färbung des Gewebes wurde der primäre Antikörper in entsprechender Verdünnung (siehe 2.4.2) aufgetragen und für eine Stunde inkubiert. Vor Zugabe des Sekundärantikörpers (siehe 2.4.2) erfolgten drei weitere Waschschriffe mit Trispuffer und eine weitere Inkubation von 30 min. Nachdem weitere dreimal mit Trispuffer gespült wurde, wurde die Peroxidase (DAB Kit) aufgetragen und 30 min inkubiert. Abschließend wurde das Chromogen aufgetragen, 9 min inkubiert und mit H₂O_{dd} gespült. Die Proben wurden für 5 min in saurem Hämalaun inkubiert und zum Bläuen 2 min unter fließendes, lauwarmes Wasser gehalten. Zur Gewährleistung brillanter Farben erfolgte abschließend eine aufsteigende Alkoholreihe zur Dehydrierung der Proben. Die Analyse der Färbung erfolgte mittels des Axiolab Mikroskops.

2.5.3.3 IHC Färbung von Kryoschnitten

Die Immunhistochemische Färbung von Kryoschnitten erfolgte äquivalent zur Färbung von Paraffinschnitten, allerdings ohne Deparaffinierung.

2.5.3.4 Immunfluoreszenz Färbung von Kryoschnitten

Für die spezifische Detektion von Proteinen wurden die Gewebeschnitte mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpern gefärbt. Dafür wurde das Gewebe zunächst mit 3% PFA für 20 min bzw. mit eiskaltem Aceton für 10 min fixiert (abhängig vom Antikörper) und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Für die Färbung mit dem CD4-spezifischen Antikörper wurden die Schnitte zusätzlich für 10 min in 10 mM Citratpuffer aufgeköcht (*Epitop-Retrieval*). Um das PFA vollständig zu inaktivieren wurden die Proben für 20 min in 50 mM NH₄Cl bei RT inkubiert (nur bei PFA Fixierung). Nach erneutem Waschen wurden unspezifische Bindungsstellen durch 20-minütige Blockierung mit 2% BSA/PBS bzw. Ziegen Serum/PBS abgesättigt. Der primäre, in 2% BSA/PBS bzw. Ziegen Serum/PBS verdünnte Antikörper wurde dann für 1 Stunde bei RT auf den Schnitten inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit 2% BSA/PBS erfolgte dann die Bindung des sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörpers für 1 Stunde bei RT. Für die Färbung der Zellkerne wurde in diesem Schritt zusätzlich mit DAPI gefärbt. Nach einem letzten Waschschriffe der Schnitte wurden diese mit Gelatine eingedeckelt und mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M) ausgewertet.

2.5.4 Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter der Sterilbank durchgeführt.

2.5.4.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Zellen wurden in einer Dichte bis ca. 5×10^6 Zellen/ml bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 7% CO₂ kultiviert. Das Umsetzen der Zellen erfolgt durch Ablösen mittels Trypsin/EDTA. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in der gewünschten Dichte in Medium aufgenommen und ausgesät.

2.5.4.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt nach Anfärben der toten Zellen mit 0,2% Trypanblau und 0,9% NaCl in PBS in einer Neubauer Zählkammer (siehe 2.1.2).

2.5.4.3 Generierung von stabilen Klonen für die orthotope Zellimplantation

Die Generierung von stabilen Klonen für die orthotope Zellimplantation erfolgte durch Lipofectamine™ Transfektion mit anschließender Antibiotikaselektion. Am Vortag der Transfektion wurden 1×10^6 CT26-Zellen in 10 cm Zellkulturschalen ausgebracht. Nach Gabe der Transfektionslösung (20 µl Lipofectamine™ (100 mg/ml), 16 µg DNA und 5 ml DMEM) wurden die Zellen für 5 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurde das Medium durch DMEM^{Z10+++} ersetzt und wöchentlich gewechselt. Nach ca. sechs bis acht Wochen konnten klonale Kolonien gepickt und expandiert werden. Die Überstände dieser Klone wurden verwendet, um mittels ELISA die abgegebene Menge an CXCL10 im Medium zu quantifizieren.

2.5.4.4 Präparation von Zellen zur orthotopen Zellimplantation

Vor der orthotopen Zellimplantation mussten die benötigten Zellen in Zellkulturschalen expandiert und zur Implantation vorbereitet werden. Sowohl parentale CT26 als auch die generierten stabilen CT26^{+CXCL10} und CT26^{-CXCL10} Klone waren nur leicht adhärent. Dies ermöglichte das Lösen der Zellen durch Abspülen mit Medium ohne vorangegangene Trypsininkubation. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in HBSS gelöst und mittels einer Venenverweilkanüle transanal in den distalen Kolon eingebracht (siehe 2.5.2.1).

2.5.4.5 Auftauen von Zellen

Das Auftauen der Zellen erfolgte möglichst rasch bei 37°C mit vorgewärmtem Medium. Im Anschluss wurden die Zellen gewaschen und schnellstmöglich in Kulturmedium ausgesät.

2.5.4.6 Einfrieren von Zellen

Zur Konservierung verschiedener Zelllinien und erzeugter stabiler Klone wurden diese expandiert und daraufhin eingefroren. Die gewonnenen Zellpellets wurden in FKS mit 5% (v/v) DMSO gelöst und bei -80°C langsam eingefroren, bevor sie in flüssigen Stickstoff zur Langzeitlagerung überführt wurden.

2.5.4.7 Stimulation von Zellen

Die Stimulation der Zellen erfolgte wahlweise durch Zugabe von 5 ng/ml mTNF α oder 10 ng/ml mIFN γ . Im Anschluss daran wurden die Zellen für weitere 22 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die Überstände 15 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und erneut der Überstand abgenommen, bevor sie bei -80°C bis zur weiteren Verwendung für ELISA Analysen eingefroren wurden. Aus den gewonnenen Zellpellets hingegen wurde RNA isoliert (siehe 2.5.1.5.2).

2.5.4.8 Proliferationsanalyse verschiedener Zelllinien

Mithilfe des XTT Proliferationstests kann die metabolische Aktivität einer Zelle nachgewiesen werden. Unter Oxidation von NAD(P)H + H⁺ zu NAD(P)⁺ wird das farblose Tetrazoliumsalz XTT (Natrium 3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)-benzolsulfonsäure-hydrat) vorwiegend durch mitochondriale Dehydrogenasen intakter Zellen zu dem wasserlöslichen, orangenen Formazan umgewandelt. Diese Farbstoffbildung wird kolorimetrisch am Mithras LB 940 gemessen, wobei die entstehende Farbintensität mit der Zahl lebender Zellen korreliert. Es wurden 1x10⁴, 2x10⁴ und 3x10⁴ Zellen pro Vertiefung auf einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen ausgesät. Als Referenzwert wurde eine Reihe mit Medium (DMEM, 3% FCS, 1% Pen/Strep, L-Glutamin) belassen. Die Anzucht der Zellen erfolgte im Brutschrank mit DMEM, 0,5% FKS und jeweils 1% Pen/Strep und Glutamin über Nacht. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und daraufhin wurden die Zellen mit neuem DMEM Medium (3% FKS, 1% Pen/Strep, L-Glutamin; 10,2 ml pro Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen) sowie mit der nach Herstellerangaben gefertigten Bestimmungslösung, bestehend aus einem so

genannten *Labeling*- und einem *Electron-coupling*-Reagenz, aufgetragen. Die spektrophotometrische Formazanbestimmung erfolgte sofort nach Reagenzzugabe am Mithras LB 940 bei einer Wellenlänge von 450- 500 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm. Die Messungen erfolgten zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 4, 6, 8, 10, 24 und 48 Stunden).

2.5.4.9 Zellmigrationsassay

Die Migration beschreibt die Wanderung von Zellen, welche mittels eines Migrationsassays untersucht werden kann. Dieser Versuch wird auch als *Wound healing assay* bezeichnet. Er beschreibt die Fähigkeit von Zellen, durch Wanderung beispielsweise eine Wunde schließen zu können. Für diesen Versuch wurden 30µ-Dish 35 mm, low Culture Insert von Ibidi verwendet. Hierfür wurden 1×10^5 Zellen in zwei Zellkammern ausgebracht, die durch einen Einsatz nach allen 4 Seiten abgetrennt waren, und über Nacht bei 37°C und 7% CO₂ inkubiert. Dieser Zellkammereinsatz wurde vorsichtig entfernt, wodurch ein definiert breiter Spalt zwischen beiden konfluenten Zellkompartimenten entstand. Das Medium wurde durch neues ersetzt, wobei den Zellen jeweils Medium mit und ohne rekombinantes IP-10 (10 µg/ml) zugesetzt wurde. Der Fortschritt der Migration wurde mit Hilfe des Axiovert 200M Mikroskops nach 0, 3, 6, 9, 24 und 48 Stunden dokumentiert und durch die WimScratch Software ausgewertet.

2.5.4.10 Nachweis von Chemokinen mittels ELISA

Der Nachweis von Chemokinen erfolgt mittels ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Es handelt sich um ein antikörper basiertes Nachweissystem. Das nachzuweisende Antigen ist an die Mikrotiterplatte gekoppelt welches das gesuchte Protein bindet. Nach Zugabe des enzymgekoppelten Zweitantikörpers erfolgt ein Farbumschlag durch die Enzym-Substrat-Reaktion welche spektrophotometrisch nachgewiesen werden kann.

Es wurden sowohl Zellkulturüberstände als auch Serumproben und Überstände der *ex vivo* Organkultur verwendet. Die Versuchsdurchführung erfolgte jeweils nach Vorschrift des Herstellers. Die Bestimmung der Proteinmengen erfolgte anschließend durch eine spektrophotometrische Messung mit einem Mithras LB 940 Mikroplattenlesegerät bei 450 nm.

2.5.5 Statistische Methoden

Die Daten für die statistischen Analysen wurden mit MS Excel gesammelt. Die Auswertung erfolgte im Anschluss mit Hilfe der Statistikprogramme R, GraphPad PRISM® und SPSS 16.0. Die Ergebnisse wurden als statistisch signifikant erachtet, wenn das Signifikanzniveau $\alpha=0,05$ und dadurch $p<0,05$ war. Das Konfidenzniveau lag hierbei bei 95%. Die Expression von CXCL11 wurde im Bezug auf das Überleben mittels Cox-Regression, einer proportionalen Risikofunktion, unter Verwendung der Uni- und Multivariaten Analyse untersucht. Bei Ergebnissen, die nicht der Normalverteilung unterlagen, wurde der Mann-Whitney-Test herangezogen, um Unterschiede zweier Gruppen in Bezug auf deren Signifikanz zu untersuchen. Für normalverteilte Werte wurde die Signifikanzanalyse mittels Student's t-test durchgeführt. Sowohl der Mann-Whitney als auch der Student's t-test wurden verwendet, um die Genexpressionen zu vergleichen. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde die Alphafehlerkumulierung bei multiplen Paarvergleichen durch die Bonferroni-Korrektur neutralisiert (*Keselman und Leventhal, 1974*). Basierend auf dem *logrank test* wurden die Kaplan-Meier Überlebenskurven zweier Gruppen miteinander verglichen. Die Aufteilung dieser beiden Gruppen bezog sich auf deren Genexpression und wurde durch deren *cut point* bestimmt, der mittels R errechnet worden war.

Das Überleben der Patienten wurde durch den Zeitraum definiert, der zwischen dem Datum der Operation und dem Tod des Patienten bzw. dessen letzten Nachsorgetermin lag.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der Chemokinexpression auf kolorektale Karzinome und hierbei insbesondere auf die mit der Tumorprogression einhergehende Angiogenese und Infiltration mit Lymphozyten untersucht werden. Laboreigene Vorarbeiten konnten bereits zuvor belegen, dass die Ausprägung von CXCL9, CXCL10 und CXCL11 zwischen Tumor- und Normalgewebe unterschiedlich ist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die CXC-Chemokinexpression bei lokal begrenztem Darmkrebs (T3N0M0) von prognostischer Bedeutung ist (*Friederichs et al., 2005; Lin et al., 2007*).

3.1 Teil I: Die Rolle von CXC-Chemokinen beim kolorektalen Karzinom - Befunde an Patientenproben

3.1.1 Übersicht des untersuchten Kollektivs von Patienten mit kolorektalen Tumoren

Zur Validierung der zuvor durch Transkriptomanalysen erhobenen Befunde wurden Expressionsanalysen an einem unabhängigen Patientenkollektiv mit einer unabhängigen Methode, der qRT-PCR, durchgeführt. Das gesamte Kollektiv umfasste 163 Patienten. Keiner der 163 Patienten litt an einem Zweitkarzinom oder einem multizentrischen Auftreten des Karzinoms, weiterhin hatte keiner der Patienten eine neoadjuvante Vorbehandlung erhalten. Zur Analyse des potentiellen Einflusses der Chemokinexpression auf das Überleben der Patienten wurden lediglich 120 Patienten in die Studie eingeschlossen, die eine vollständige chirurgische Entfernung des Tumors aufwiesen (Resektionsstatus R0). Alle Patienten wurden an der Chirurgischen Klinik des Klinikums rechts der Isar der TU München zwischen 1987 und 2011 operiert. Der Altersdurchschnitt betrug 64 Jahre, ihre Krankengeschichte („Follow-Up“) wurde bis zu 96 Monate nach der Operation verfolgt. Tumorbedingt verstarben in dieser Zeit 39 Patienten.

An klinisch-pathologischen Patientendaten wurde der TNM Status, die anatomische Lokalisierung des Tumors, Alter und Geschlecht der Patienten, der R-Status, die Lymph- und Blutgefäßinvasion sowie die Gesamtzahl aller entnommenen und aller positiven Lymphknoten erfasst. All diese Informationen wurden für statistische

Analysen herangezogen, um die Relevanz der CXC-Chemokine als potentielle Prognoseparameter zu analysieren und zu verifizieren.

	Gesamtes Kollektiv n=163 [100%]	
Geschlecht (n[%])	männlich 97 [60,0%]	weiblich 66 [40,0]
Alter (MW +/- SD)	63,22 +/- 12,11 Jahre	64,82 +/- 12,30 Jahre
Alter (Spanne)	23-88 Jahre	34-86 Jahre
Tumorlokalisation	[n]	Prozent
rechts	82	50,3
links	81	49,7
Tumorstadium	[n]	Prozent
T1	3	1,8
T2	19	11,7
T3	107	65,6
T4	34	20,9
Grading	[n]	Prozent
G1	6	3,7
G2	104	63,8
G3	51	31,3
G4	2	1,2
UICC Stadium	[n]	Prozent
Stadium I	13	8,0
Stadium II	75	46,0
Stadium III	36	22,0
Stadium IV	39	24,0
Überleben	[n]	Prozent
Ja	94	57,7
Nein	56	34,4
Tumor bedingter Tod	39	23,9
Fehlende Daten	13	8,0
Resektionsstatus	[n]	Prozent
Komplette Resektion (R0)	120	73,6
Resektion (R1, R2, Rx)	43	26,4
Rückfall	[n]	Prozent
Kein Rückfall	94	57,7
Rückfälle (gesamt)	33	20,3
Fehlende Daten	36	22,1
Metastasen	[n]	Prozent
Nur lokale Rückfälle	2	1,2
Fernmetastasen	47	28,9

Tabelle 11: Übersicht Patientendaten. Bei der Analyse des Zusammenhangs der CXC-Chemokinexpression mit dem Überleben der Patienten wurden lediglich die Patientendaten der 120 Patienten mit dem Resektionsstatus R0 verwendet. Alle Prozentzahlen wurden auf eine Nachkommastelle gerundet.

Tabelle 11 gibt Aufschluss über die Zusammensetzung des hier untersuchten Patientenkollektivs, sowie die patientenspezifischen Daten, die erhoben und für anschließende statistische Analysen herangezogen worden waren.

3.1.2 Trennwertanalyse der CXC-Chemokin und Granzym B Expression zur Einteilung der Patienten in zwei Gruppen

Um die entsprechenden *cut off* Werte des jeweiligen CXC-Chemokins und Granzym B zu berechnen wurde das Statistikprogramm R verwendet. Es wurde der *maximally selected LogRank statistics* Test herangezogen. Neben der Genexpression wurden sowohl das Gesamtüberleben der Patienten in Monaten sowie deren Überlebensstatus mit in die Berechnung einbezogen.

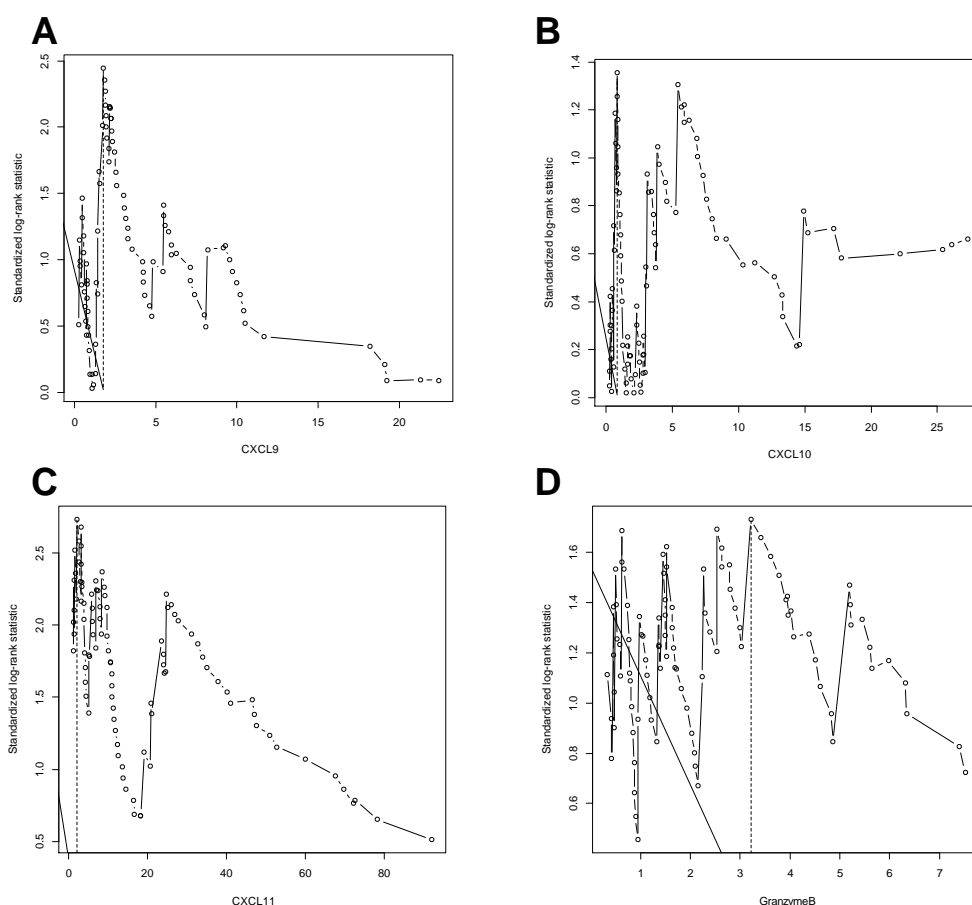


Abbildung 9: Trennwert Analyse. Der voraussichtliche Trennwert wird durch eine senkrechte gestrichelte Linie angegeben. Die standardisierte LogRank Statistik mit den zugehörigen voraussichtlichen Trennwerten beträgt für A: CXCL9 1,77, B: CXCL10 0,849, C: CXCL11 2,05 und D: Granzym B 3,219.

Für das Chemokin CXCL9 ergab sich ein voraussichtlicher Trennwert von 1,77 (M=2.4469, p-Wert=0.1502), für CXCL10 ein Wert von 0,849 (M=1.3561, p-Wert=0.8168), sowie 2,05 für CXCL11 (M=2.7328, p-Wert=0.08108) und 3,219 für Granzym B (M=1.733, p-Wert=0.5626). Diese berechneten Trennwerte (*cut off*)

wurden für alle weiteren Eingruppierungen der Patienten in *high* (hoch Exprimierer) und *low* (niedrig Exprimierer) verwendet.

3.1.3 Multivariate Analyse zur Validierung von CXCL11 als unabhängigen Prognoseparameter

Die errechneten Trennwerte für die Expression der CXC-Chemokine und Granzym B ermöglichten die Einteilung der Patienten in zwei Gruppen. Anhand dieser Eingruppierung war es möglich, die Signifikanz der Menge an exprimierten Chemokinen und Granzym B mit dem Überleben der Patienten in Zusammenhang zu bringen. Um zeigen zu können, dass es sich hierbei nicht um einen synergistischen Effekt handelt, sondern dass diese Faktoren als unabhängige Prognoseparameter betrachtet werden können, wurde eine multivariate Analyse durchgeführt.

-	keine	Alter	Geschlecht	UICC (I/II vs. III/IV)	Histograd (gering vs. hoch)	Lymph- angiosis (Nein vs. Ja)
CXCL9	p=0.019 HR=3.30 (95%CI 1.22-8.95)	p=0.020 HR=3.280 (95%CI 1.21-8.90)	p=0.021 HR=3.27 (95%CI 1.20-8.92)	p=0.076 HR=2.60 (95%CI 0.91-7.48)	p=0.011 HR=3.67 (95%CI 1.34-10.0)	p=0.035 HR=2.98 (95%CI 1.08-8.23)
CXCL10	p=0.193 HR=1.93 (95%CI 0.718-5.18)	p=0.219 HR=1.86 (95%CI 0.69-5.01)	p=0.151 HR=2.07 (95%CI 0.77-5.57)	p=0.499 HR=1.43 (95%CI 0.51-4.00)	p=0.100 HR=2.34 (95%CI 0.85-6.42)	p=0.306 HR=1.69 (95%CI 0.62-4.62)
CXCL11	p=0.008 HR=3.69 (95%CI 1.40-9.76)	p=0.009 HR=3.66 (95%CI 1.39-9.73)	p=0.038 HR=2.82 (95%CI 1.06-7.49)	p=0.027 HR=3.08 (95%CI 1.13-8.34)	p=0.004 HR=4.38 (95%CI 1.62-11.8)	p=0.029 HR=3.16 (95%CI 1.13-8.85)
Granzym B	p=0.105 HR=3.40 (95%CI 0.77-14.9)	p=0.095 HR=3.53 (95%CI 0.80-15.6)	p=0.120 HR=3.27 (95%CI 0.73-14.5)	p=0.128 HR=3.16 (95%CI 0.72-13.9)	p=0.070 HR=3.96 (95%CI 0.90-17.6)	p=0.087 HR=3.64 (95%CI 0.83-16.0)

Tabelle 12: Multivariate Analyse der Patientendaten. In die multivariate Analyse wurden verschiedene Parameter einbezogen, um die Unabhängigkeit eines Parameters von den anderen zu untersuchen. Hierbei steht *p* für den Signifikanzwert, *HR* für den hazard ratio (Risikoquotient) und *CI* für das Konfidenzintervall. Es wurden alle statistisch signifikanten Werte blau hinterlegt.

Die multivariate Analyse wurde mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS umgesetzt und ergab, dass es sich bei CXCL11 um einen unabhängigen Prognoseparameter handelt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass CXCL11 der am besten geeignete Prognoseparameter im Bezug auf die 120 CRC-Patienten war. In diesem Fall war er besser als CXCL9, CXCL10 und Granzym B, ebenso wie *grading*, Alter des Patienten, der angiovaskuläre Status, Vorkommen eines Darmverschlusses, die Tumorlokalisierung sowie Geschlecht des Patienten und dessen UICC Stadium. Dies ist ein sehr interessantes Ergebnis, da zur Eingruppierung in die verschiedenen UICC Stadien die TNM Stadien der Patienten einbezogen werden. Diese sind derzeit ausschlaggebend für die Therapieempfehlung und daraus resultierende Behandlung des Patienten.

3.1.4 Unterschiedliche Expression von CXC-Chemokinen und Granzym B im Vergleich von Normalschleimhaut und Tumorgewebe

Vorangegangene Microarrayanalysen ergaben, dass Granzym B, CXCL9, 10 und 11 als Prognoseparameter im kolorektalen Karzinom herangezogen werden können (*Lin et al., 2007*). Um zu ermitteln, wie sich die Expression dieser Gene auf mRNA Ebene in verschiedenen Tumorstadien sowie dem Ausgangsgewebe verhält, wurde eine Expressionsanalyse durchgeführt und deren Ergebnisse in der unten stehenden Grafik aufgetragen (vergleiche Abbildung 10). Hierbei waren die Werte nicht normalverteilt und wurden mittels Mann-Whitney-Test analysiert. Zur Neutralisation der Alphafehlerkumulierung bei multiplen Paarvergleichen wurde die Bonferroni-Korrektur angewendet. Bei den aufgetragenen p-Werten handelt es sich um die bereits entsprechend korrigierten Signifikanzwerte.

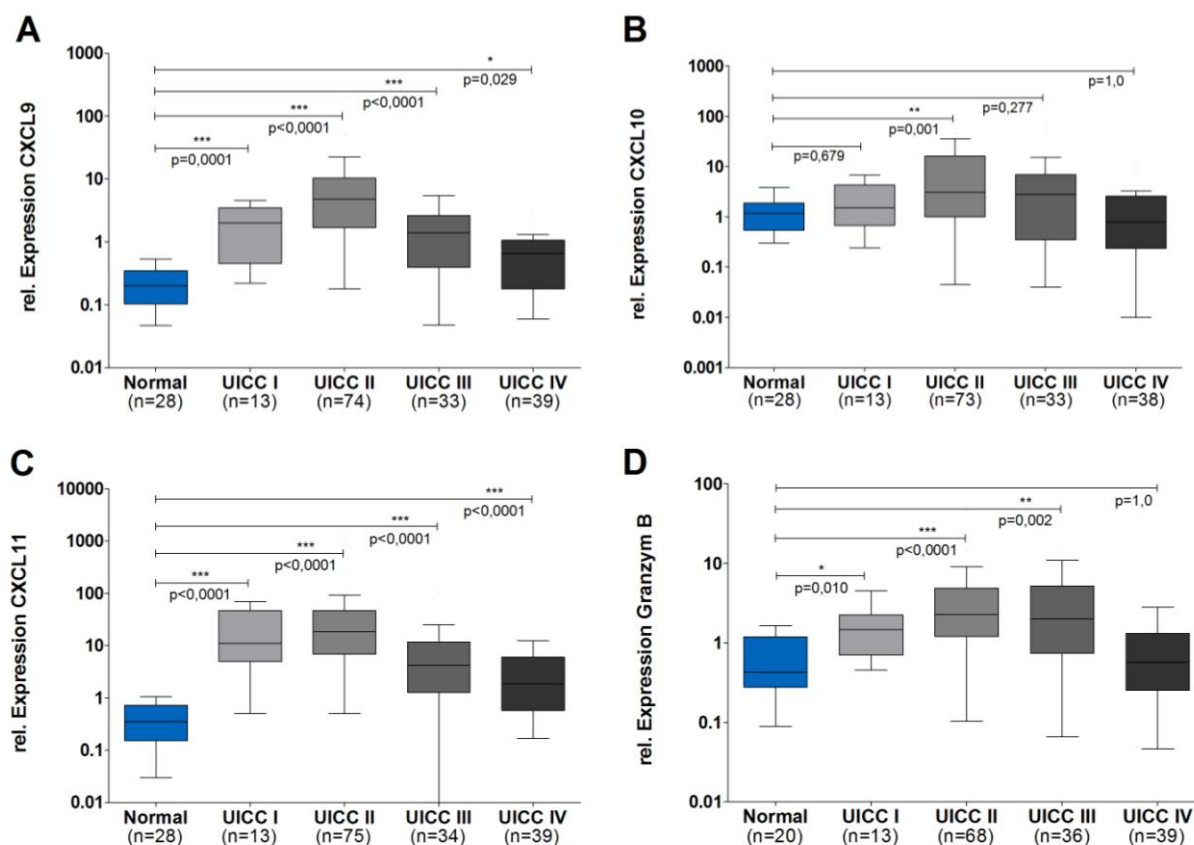


Abbildung 10: Relative Expression von Chemokinen und Granzym B unterteilt nach UICC Stadien im Vergleich zu Normalgewebe. A: CXCL9 Expression; B: CXCL10 Expression; C: CXCL11 Expression; D: Granzym B Expression.

Das Ausgangsniveau der Genexpression im Normalgewebe ist geringer als in den Tumorgeweben der verschiedenen Tumorstadien. Die maximalen Expressionslevel sind durchschnittlich in UICC Stadium II zu beobachten. CRC Tumore, die im Zusammenhang mit Lymphknoteninfiltration (UICC III) und Metastasenbildung (UICC IV) stehen, weisen ein vermindertes Expressionsniveau auf. Dies zeigt, dass Tumore des kolorektalen Karzinoms unseres Kollektivs mit Zunahme des Schweregrades der Krankheit parallel die Genexpression von CXCL9-11 und Granzym B herabsetzen. Diese Abnahme der Expression ist bei CXCL10 und Granzym B tendenziell zu beobachten und sowohl bei CXCL9, als auch bei CXCL11 deutlich erkennbar. Im Falle von CXCL11 ist die unterschiedliche Genexpression von Normalgewebe und Tumoren der UICC Stadien I-IV hochsignifikant.

3.1.5 Vergleich von Normal-, Tumor- und Metastasengewebe der gleichen Patienten

Die Expression der CXC-Chemokine und von Granzym B zwischen Normal- und Tumorgewebe waren unterschiedlich. Es sollte nun untersucht werden, ob es diese Expressionunterschiede ebenfalls zwischen Normal-, Primärtumor- und Metastasengewebe auftreten.

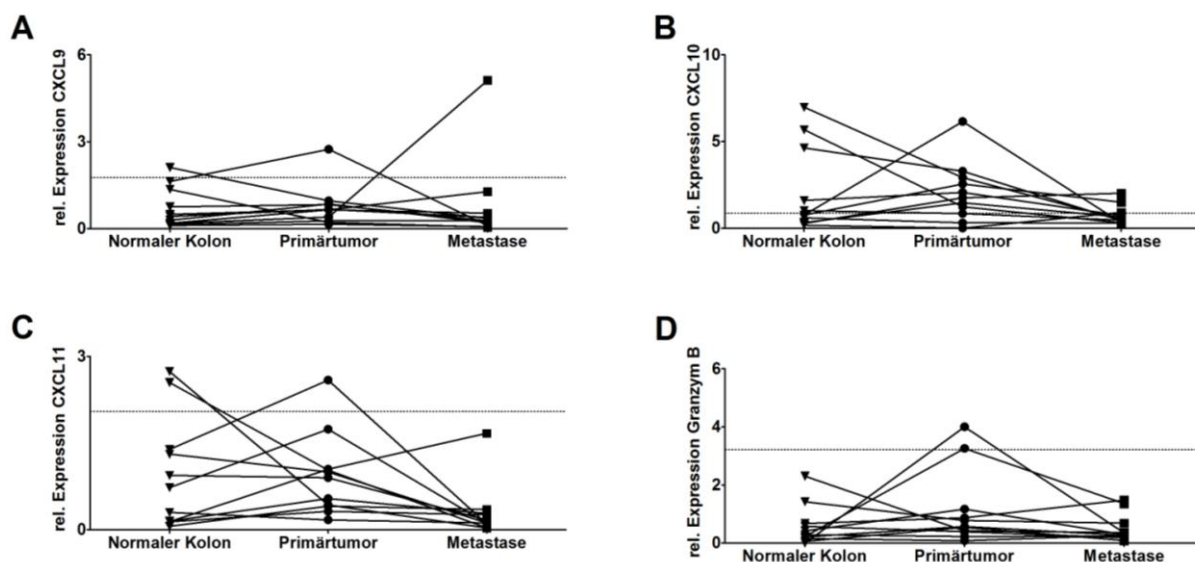


Abbildung 11: mRNA Expressionslevel von CXCL9, 10, 11 und Granzym B in Normal-, Tumor- und Metastasengewebe. Der durch eine Gerade gekennzeichnete y-Achsenabschnitt kennzeichnet den cut-off Wert des jeweiligen Gens. A: Expression von CXCL9; B: Expression von CXCL10; C: Expression von CXCL11; D: Expression von Granzym B.

In Abbildung 11 ist bereits erkennbar, dass die Genexpression mit Zunahme des Schweregrades der Krankheit abnimmt. Die Analyse von 11 zusammenpassenden Normal-, Tumor- und Metastasengeweben von 11 Patienten zeigte, dass die Expressionslevel in den Metastasen im Vergleich zum Primärtumor gesunken sind. Betrachtet man Abschnitt A und B von Abbildung 11, so wird deutlich, dass in 82% (9 von 11) der Tumore die Genexpressionslevel von CXCL9 und 10 mindestens dem der zugehörigen Metastase entsprechen, oder darüber liegen. Lediglich in 18% (2 von 11) der Metastasen konnte mehr CXCL9 ($p=0,9653$) bzw. CXCL10 ($p=0,0413$) mRNA nachgewiesen werden, als im zugehörigen Primärtumor. Bei der Expression von CXCL11 ($p=0,0354$) (vergleiche Abbildung 11 C) ist diese Rate noch niedriger und liegt noch bei lediglich 9% (1 von 11). Im Gegensatz dazu finden sich bei der Granzym B Expression ($p=0,1206$) (vergleiche Abbildung 11 D) am meisten Metastasen 27% (3 von 11), deren Expressionsniveau über dem der Primärtumore liegt. Die Abnahme der Genexpression in Metastasengeweben im Vergleich zu den

zugehörigen Primärtumoren zeigt, dass mit fortschreitender Krankheitsentwicklung die Expression dieser vier Gene gesenkt wird.

3.1.6 Zusammenhang der Ausprägung von Granzym B, CXCL9, CXCL10 und CXCL11 mit Überleben und Rezidivbildung

In vorangegangenen Laborarbeiten konnte bereits ein Einfluss der Menge an exprimierten IL-8 (ELR⁺) auf das Gesamtüberleben der Patienten gezeigt werden (Doll et al., 2010). Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte der Einfluss der ELR⁻ Chemokine CXCL9, 10 und 11 untersucht werden. Vor Durchführung der Kaplan-Meier Überlebensanalyse wurden die Patienten in zwei Gruppen unterteilt. Hierfür waren die zuvor errechneten *cut-off* Werte der Gene Granzym B (3,219), CXCL9 (1,77), CXCL10 (0,849) und CXCL11 (2,05) ausschlaggebend.

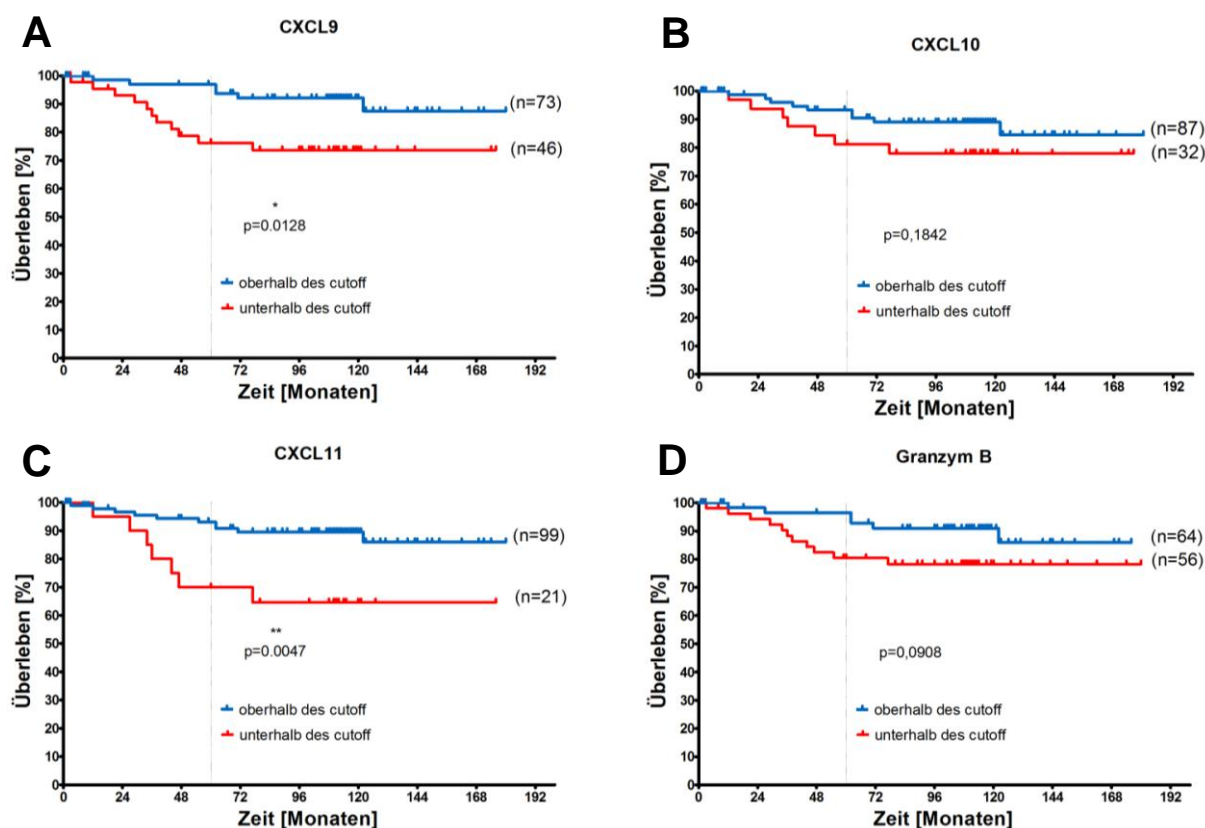


Abbildung 12: Kaplan-Meier Überlebenskurven für das Gesamtüberleben. Es wurde das prozentuale Überleben der Patienten gegen deren Überlebenszeit in Monaten aufgetragen. Hierbei wurden die Patienten anhand ihrer Genexpression und den zugehörigen *cut-off* Werten in zwei Gruppen unterteilt. Die blaue Linie zeigt Patienten, deren Genexpression oberhalb des *cut-off* Wertes lag, die rote Linie Patienten mit einer Genexpression unterhalb des *cut-off* Wertes. A: CXCL9 Expression oberhalb (n=73) und unterhalb (n=46) des *cut-off*; B: CXCL10 Expression oberhalb (n=87) und unterhalb (n=32) des *cut-off*; C: CXCL11 Expression oberhalb (n=99) und unterhalb (n=21) des *cut-off*; D: Granzym B Expression oberhalb (n=64) und unterhalb (n=56) des *cut-off*.

In Abbildung 12 ist deutlich erkennbar, dass eine hohe Genexpression von CXCL9 ($p=0,0128$, HR 3,539) und CXCL11 ($p=0,0047$, HR 6,518) im Tumor mit einem guten Überleben im Zusammenhang steht. Im Gegensatz dazu zeigt die Menge an exprimiertem CXCL10 ($p=0,1842$) und Granzym B ($p=0,0908$) keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten. In diese Analyse flossen Gewebe ($n=120$) aller vier Tumorstadien (UICC I- IV) mit Resektionsstatus R0 ein. Im Zeitraum der Nachverfolgung der Krankengeschichte starben 17 der 120 (14,2%) Patienten. Diese Todesfälle waren alle tumorbedingt. Die Wahrscheinlichkeit die ersten fünf Jahre nach der Operation zu überleben, lag in der Gruppe mit einer niedrigen CXCL9 Expression bei 76,0% \pm 6,6% (Mittelwert \pm Standardabweichung) im Vergleich zu einer hohen Menge an CXCL9 bei 97,0% (\pm 2,1%). In der Gruppe von Patienten, die ein niedriges CXCL11 Expressionsniveau aufwiesen, lag die Überlebenschance der ersten fünf Jahre bei 70,0% (\pm 10,2%). Im Gegensatz dazu überlebten 93,1% (\pm 2,7%) der Patienten mit einer hohen Expression an CXCL11 fünf Jahre postoperativ. Nach der multivariaten Cox Regressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass anhand des Expressionsniveaus von CXCL11 ($p=0,036$; HR 4,651, 95% CI 1,11-9,8) die beste Aussage über den weiteren Verlauf der Krankheit getroffen werden kann. Dieses Gen zeigt am stärksten, dass eine verminderte Expression mit einem kürzeren Gesamtüberleben des Patienten in Zusammenhang steht.

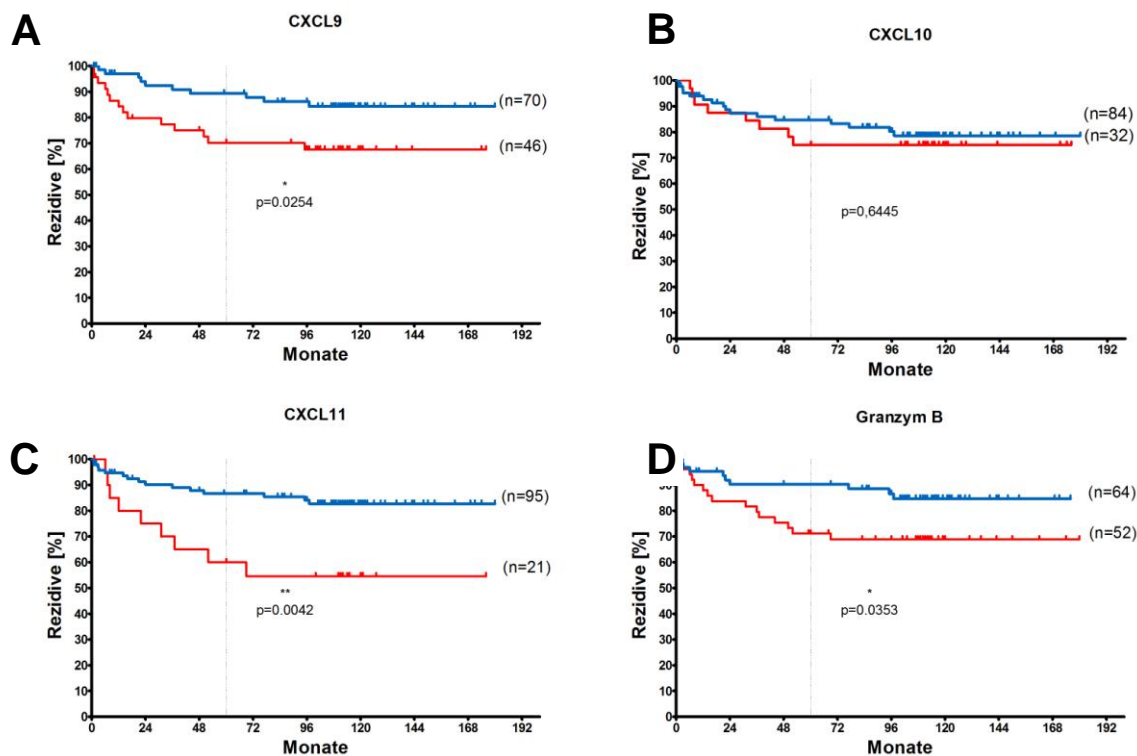


Abbildung 13: Kaplan-Meier Überlebenskurven bezogen auf die Genexpression und Rezidivbildung. Prozentualer Anteil an Rezidiven aufgetragen gegen die Zeit in Monaten bis zum Krankheitsrückfall. Eingruppierung der Patienten erfolgte anhand der jeweiligen cut-off Werte von CXCL9-11 und Granzym B. In blau sind die Überlebenskurven der Patienten mit einer guten und in rot die Patienten mit einer schlechten Prognose zu sehen. A: CXCL9 Expression oberhalb (n=70) und unterhalb (n=46) des cut-off; B: CXCL10 Expression oberhalb (n=84) und unterhalb (n=32) des cut-off; C: CXCL11 Expression oberhalb (n=95) und unterhalb (n=21) des cut-off; D: Granzym B Expression oberhalb (n=64) und unterhalb (n=52) des cut-off.

Nachdem der Einfluss der Genexpression auf das Gesamtüberleben analysiert wurde, sollte ebenfalls dessen Einfluss auf die Rezidivbildung hin untersucht werden. Analog zum Gesamtüberleben (vergleiche Abbildung 12) kann man in Abbildung 13 einen Einfluss der Höhe des Expressionsniveaus auf das krankheitsfreie Überleben erkennen. Die Patienten, deren Genexpression unterhalb des *cut-off* Werts lag, zeigten eine signifikant höhere und frühere Neigung zur Rezidivbildung. Im Bezug auf CXCL10 ($p=0,6445$) gibt es keinen Einfluss der Expression auf einen Krankheitsrückfall des Patienten. Den stärksten Effekt zeigte CXCL11 ($p=0,0042$) gefolgt von Granzym B ($p=0,0353$) und CXCL9 ($p=0,0254$).

Zusammenfassend lässt sich eine positive Korrelation der hohen CXC-Chemokin und Granzym B Expression mit dem rezidivfreien Gesamtüberleben zeigen. Patienten mit einer hohen Expression haben eine bessere Prognose und erleiden seltener einen Krankheitsrückfall als Patienten aus der Gruppe mit einer geringen Expression.

3.1.7 Korrelation der Genexpression der CXC-Chemokine CXCL9-11 und Granzym B

Im Anschluss der Untersuchung des Expressionslevels der Gene und dessen Einfluss auf Gesamt- und krankheitsfreies Überleben der Patienten wurde die Korrelation der Genexpression analysiert. Dies sollte zeigen, ob die hohe Expression eines dieser Gene eine vergleichbare Koexpression der anderen Gene bedingt.

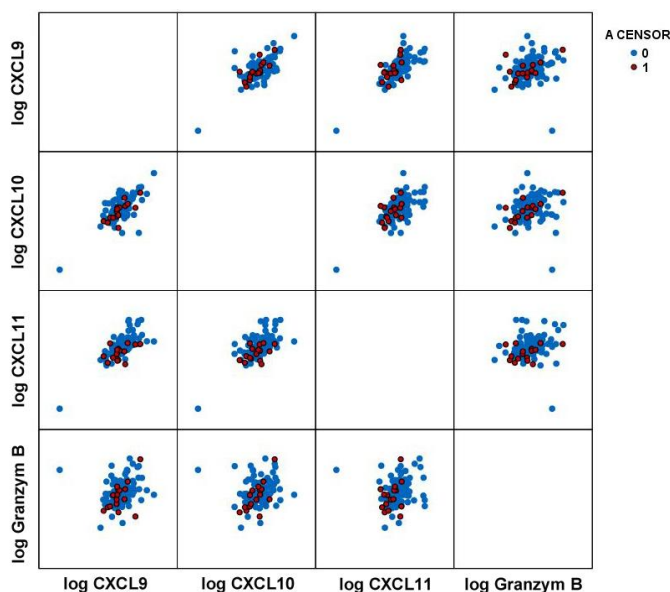


Abbildung 14: Korrelationsmatrix der Granzym B und CXC-Chemokin Expression. Darstellung der Expression von Granzym B, CXCL9, 10 und 11 im Verhältnis zueinander. Hierbei wurde der Überlebenszensor aufgetragen (blau=0=kein Ereignis, rot=1=Tod des Patienten).

In der obigen Korrelationsmatrix wurde die Expression von CXCL9-11 und Granzym B auf mRNA Ebene ermittelt und aufgetragen. Hierbei ist deutlich eine Korrelation der Expression erkennbar. Das hohe Expressionsniveau eines der untersuchten Gene steht in Zusammenhang mit dem der anderen Gene. Obige Matrix lässt darauf schließen, dass alle vier Gene in äquivalenten Mengen koexprimiert werden.

Korrelationen (Spearman-Rho)

		logCXCL9	logCXCL10	logCXCL11	logGranzymB
logCXCL9	Korrelationskoeffizient	1,000	0,619**	0,725**	0,367**
	Sig. (2-seitig)	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	N	126	126	126	119
logCXCL10	Korrelationskoeffizient	0,619**	1,000	0,552**	0,321**
	Sig. (2-seitig)	<0,0001	-	<0,0001	<0,0001
	N	126	126	126	119
logCXCL11	Korrelationskoeffizient	0,725**	0,552**	1,000	0,288**
	Sig. (2-seitig)	<0,0001	<0,0001	-	,001
	N	126	126	127	120
logGranzymB	Korrelationskoeffizient	0,367**	0,321**	0,288**	1,000
	Sig. (2-seitig)	<0,0001	<0,0001	,001	-
	N	119	119	120	122

Tabelle 13: Spearman-Rho Analyse. Die Korrelation wurde durch eine Spearman-Rho Analyse verifiziert. ** Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

In Abbildung 14 ist deutlich erkennbar, dass die Expression der CXCL9, CXCL10, CXCL11 und Granzym B Gene korreliert. Diese Ergebnisse wurden durch die statistische Analyse (Spearman-Rho) bestätigt (vergleiche Tabelle 13). Alle Gene, die miteinander verglichen wurden, korrelieren sehr stark ($p < 0,0001$), mit Ausnahme von CXCL11 zu Granzym B ($p = 0,001$), die geringfügig schwächer in Verbindung stehen.

3.1.8 Die intratumorale CXCL11 Expression in Kolonkarzinomen des UICC Stadium II, sowie Analyse des Prädiktionspotentials für Rezidivbildung

Nach vollständiger Resektion eines kolorektalen Tumors bei Patienten mit UICC Stadium II gelten diese als geheilt. Trotzdem kommt es noch in 20% der Fälle zur Rezidivbildung (Nitsche et al., 2012). Bisher gibt es keine Möglichkeit die Patienten mit Tumoren dieses Stadiums im Bezug auf deren Krankheitsrückfallrisiko zu unterscheiden. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse in Bezug auf die CXCL11 Expression im Tumorgewebe von Patienten aller Tumorstadien sollte deren Einfluss auf die Rezidivausbildung in UICC Stadium II untersucht werden.

Stadium II CRC	Rezidiv	Kein Rezidiv
hohe CXCL11 Expression	10	53
geringe CXCL11 Expression	4	4

* $p = 0,0431$ (Fisher's exact test)

Tabelle 14: Untersuchung der Patientengruppen des Stadiums UICC II mit viel bzw. wenig intratumoralem CXCL11 in Bezug auf Rezidivbildung. Insgesamt wurden 63 Patienten mit viel und 8 Patienten mit wenig CXCL11 analysiert (Fisher's exact test).

Im analysierten Patientenkollektiv erlitten 19,7% (14/71) der Patienten einen Rückfall. Von allen untersuchten Patientenproben wurde in 11,3% (8/71) der Proben nur eine geringe Menge an CXCL11 exprimiert (unterhalb des *cut-off* Wertes). Diese Daten wurden unter Zuhilfenahme des *Fisher's exact test* ausgewertet (vergleiche Tabelle 14). Es konnte gezeigt werden, dass ein niedriges Expressionsniveau von CXCL11 im Tumor, das unterhalb des errechneten *cut-off* Wertes liegt, mit der Rezidivbildung in Verbindung steht ($p = 0,0431$). Dies eröffnet eine neue Möglichkeit in der genaueren Klassifizierung der UICC Stadium II Tumore und kann dabei helfen, diejenigen Patienten zu identifizieren, die eine erhöhte Neigung zur Rezidiventwicklung haben.

3.1.9 Einfluss von CXCL10 auf die Migration und Proliferation *in vitro*

In der Literatur wird die Rolle der ELR⁺ CXC-Chemokine kontrovers diskutiert. Einige Untersuchungsergebnisse deuten hierbei auf einen tumor- und metastasenfördernden Einfluss hin (*Kawada et al., 2007; Zipin-Roitman et al., 2007*). Da diese Ergebnisse im Widerspruch zu unseren Resultaten stehen, wurde ein Wundheilungs- und Proliferationsversuch durchgeführt. Die Fähigkeit zur erhöhten Wundheilung steht ebenfalls mit einem gesteigerten Metastasierungspotential in Verbindung. Eine erhöhte Zellproliferation wirkt sich positiv auf ein schnelleres und stärkeres Tumorwachstum aus, was als protumorigen betrachtet werden kann. In den durchgeführten Experimenten sollte ermittelt werden, ob rekombinantes humanes CXCL10 Einfluss auf das Migrations- und Proliferationsverhalten von humanen CRC-Zelllinien hat.

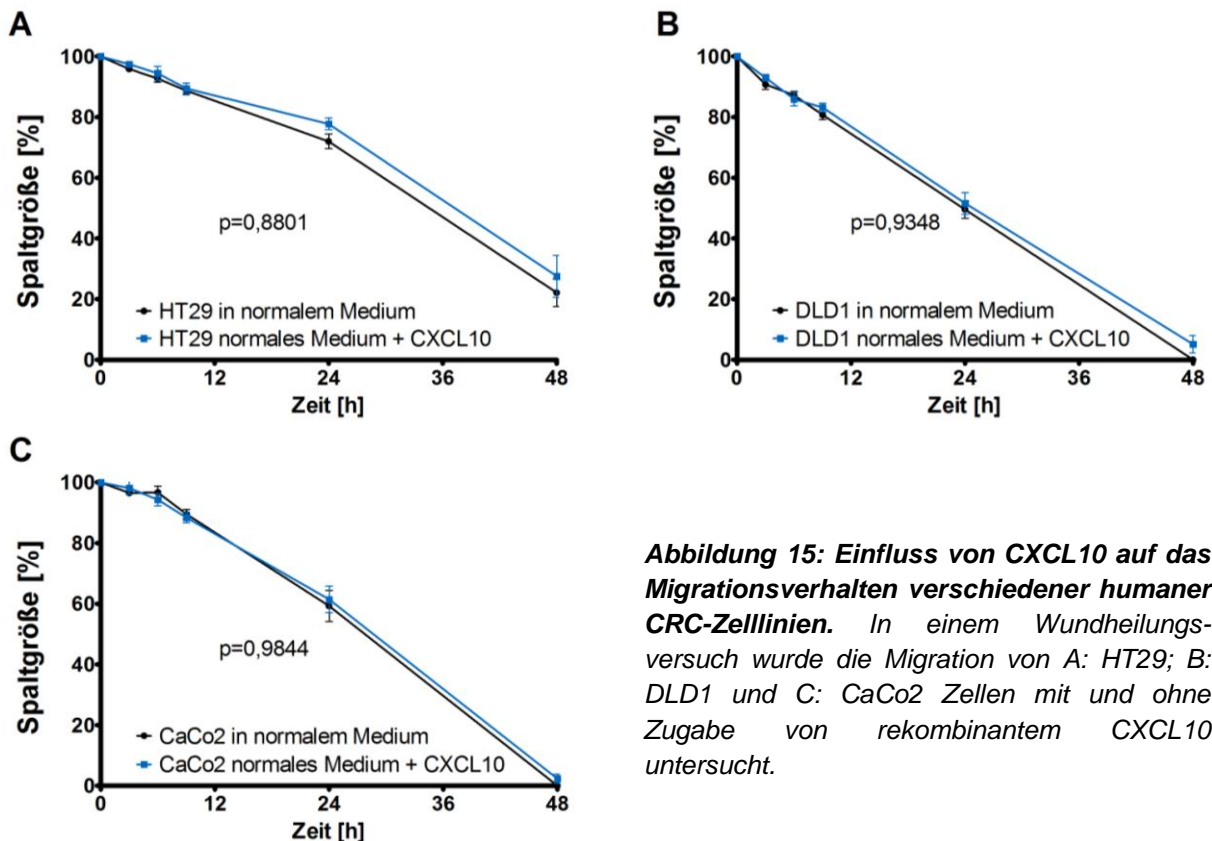


Abbildung 15: Einfluss von CXCL10 auf das Migrationsverhalten verschiedener humaner CRC-Zelllinien. In einem Wundheilungsversuch wurde die Migration von A: HT29; B: DLD1 und C: CaCo2 Zellen mit und ohne Zugabe von rekombinantem CXCL10 untersucht.

Es wurde eine Wundheilungsversuch durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte durch mikroskopische Bestimmung der Spaltgröße, die als Abstand zwischen den konfluenten Zellen definiert wird. Im Wundheilungsversuch wurden humane CRC-Zelllinien mit humanem CXCL10 [100 ng/ml] stimuliert. In diesem Experiment wurde das Verhalten in Bezug auf die Spaltschließung innerhalb von 48 Stunden untersucht (vergleiche Abbildung 15). Die Zugabe von CXCL10 zeigte keine erhöhte

Zellmigrationsfähigkeit. Zellen, die mit humanem CXCL10 stimuliert worden waren, zeigten ein analoges Migrationsverhalten wie die unstimulierten Zellen. Hierbei war es ebenfalls irrelevant, ob die Zellen den Rezeptor CXCR3 exprimieren (HT29 $p=0,8801$) oder nicht (DLD1 $p=0,9348$ und CaCo2 $p=0,9844$) (Kawada *et al.*, 2007).

Die Auswirkung von CXCL10 auf das Proliferationsverhalten von CaCo2, DLD1, HCT116, HT29, und SW480 Zellen wurde mit dem *Cell Proliferation Kit II* (XTT) analysiert. Die metabolische Aktivität der Zellen kann photometrisch verfolgt werden. Hierbei wird durch die Oxidation von $\text{NADH}+\text{H}^+$ zu NAD^+ während des Zellstoffwechsels die Umwandlung des farblosen Tetrazoliumsalz XTT in das orangene Formazan bewirkt.

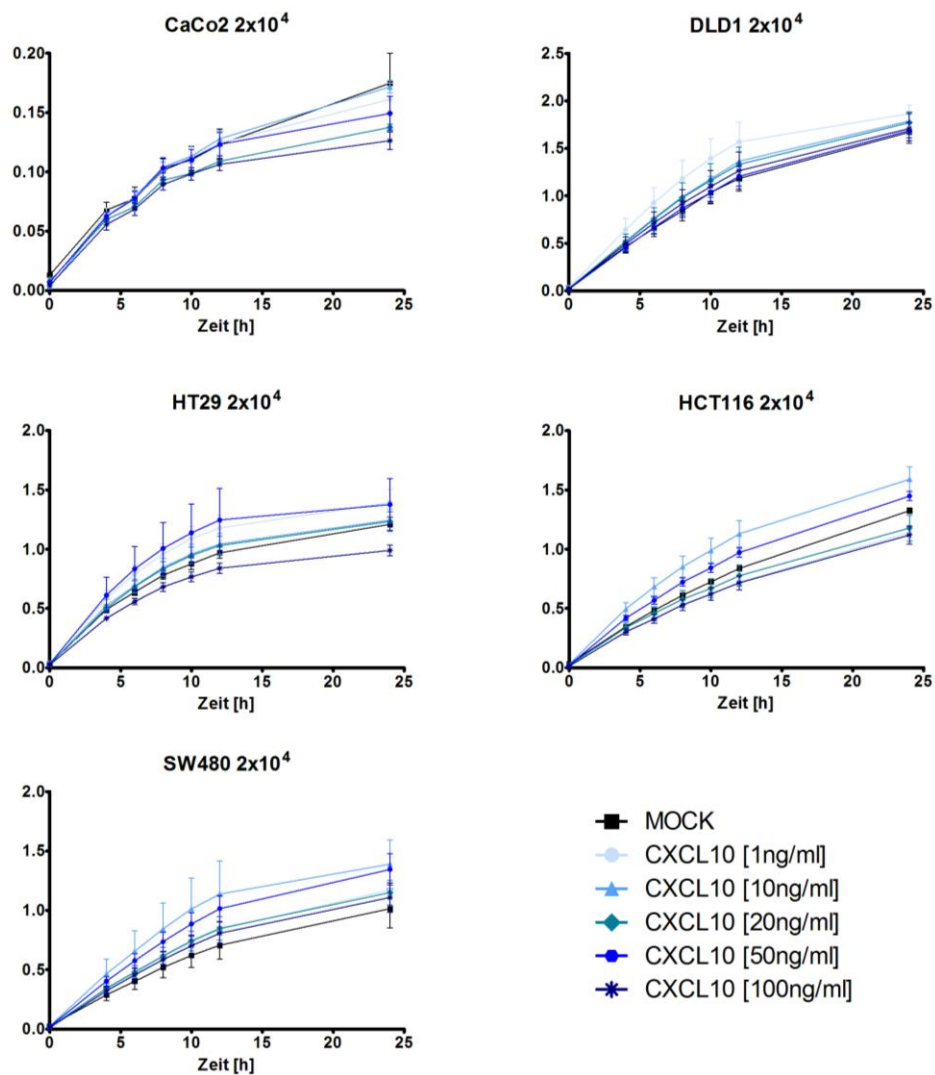


Abbildung 16: Proliferationsanalyse humaner Zelllinien und der Einfluss auf die Proliferation nach Zugabe von CXCL10. Stimulation von 2×10^4 CaCo2, DLD1, HT29, HCT116 und SW480 Zellen mit 1-100 ng/ml bzw. ohne Zugabe von CXCL10 (MOCK).

Um eine Eigenstimulation der Krebszellen durch CXCL10 auszuschließen wurde eine Proliferationsanalyse durchgeführt. Verschiedene humane CRC-Zelllinien wurden mit verschiedenen Konzentrationen von rekombinantem humanen CXCL10 stimuliert. Sollte es zu einer Stimulation der Zellteilung durch das Chemokin kommen, so wäre eine erhöhte Proliferationsrate der Zellen zu erwarten. In diesem Experiment konnte bei keiner der Zelllinien (CaCo2, DLD1, HT29, HCT116 und SW480) ein proliferationsfördernder Effekt des humanen CXCL10 beobachtet werden (vergleiche Abbildung 16). Somit konnte eine autoregulative Stimulation der Tumorzellen durch CXCL10 ausgeschlossen werden.

3.1.10 Ermittlung der CXC-Chemokin Ausprägung in unterschiedlichen Zelltypen

Im Rahmen dieser Dissertation konnte bereits ein Einfluss der Menge an exprimierten ELR⁻ CXC-Chemokinen auf das Überleben von CRC Patienten gezeigt werden. Hierbei stellte sich CXCL11 als bester prognostischer Marker heraus. Aus diesem Grund werden im folgenden die Ergebnisse dieses Chemokins gezeigt und auf CXCL9 und CXCL10 nicht weiter eingegangen.

Die Quelle der CXC-Chemokine ist bisher nicht bekannt. Aus diesem Grund wurden verschiedene humane Zelllinien sowie Gewebeschnitte von kolorektalen Karzinomen untersucht. In Zusammenarbeit mit Dietrich Doll war bereits untersucht worden, ob humane CRC-Zelllinien dazu in der Lage sind, ELR⁺ CXC-Chemokine zu produzieren. Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA Expressionslevel dieser Chemokine in HT29, HCT116 und CaCo2 nach Stimulation mit IL1 α bzw. IFN γ in Kombination mit TNF α stark anstiegen (*Doll et al., 2010*).

3.1.10.1 Expressionsanalyse von CXCL11 in humanen Zelllinien durch qRT-PCR

Die Genexpression von humanem CXCL11 wurde in fünf verschiedenen humanen CRC-Zelllinien untersucht. Hierbei wurde das Expressionsniveau der jeweiligen Kontrolle mit den stimulierten Zellen verglichen. Zur Zellstimulation wurden 5 ng/ml TNF α und zusätzlich 10 ng/ml IFN γ eingesetzt.

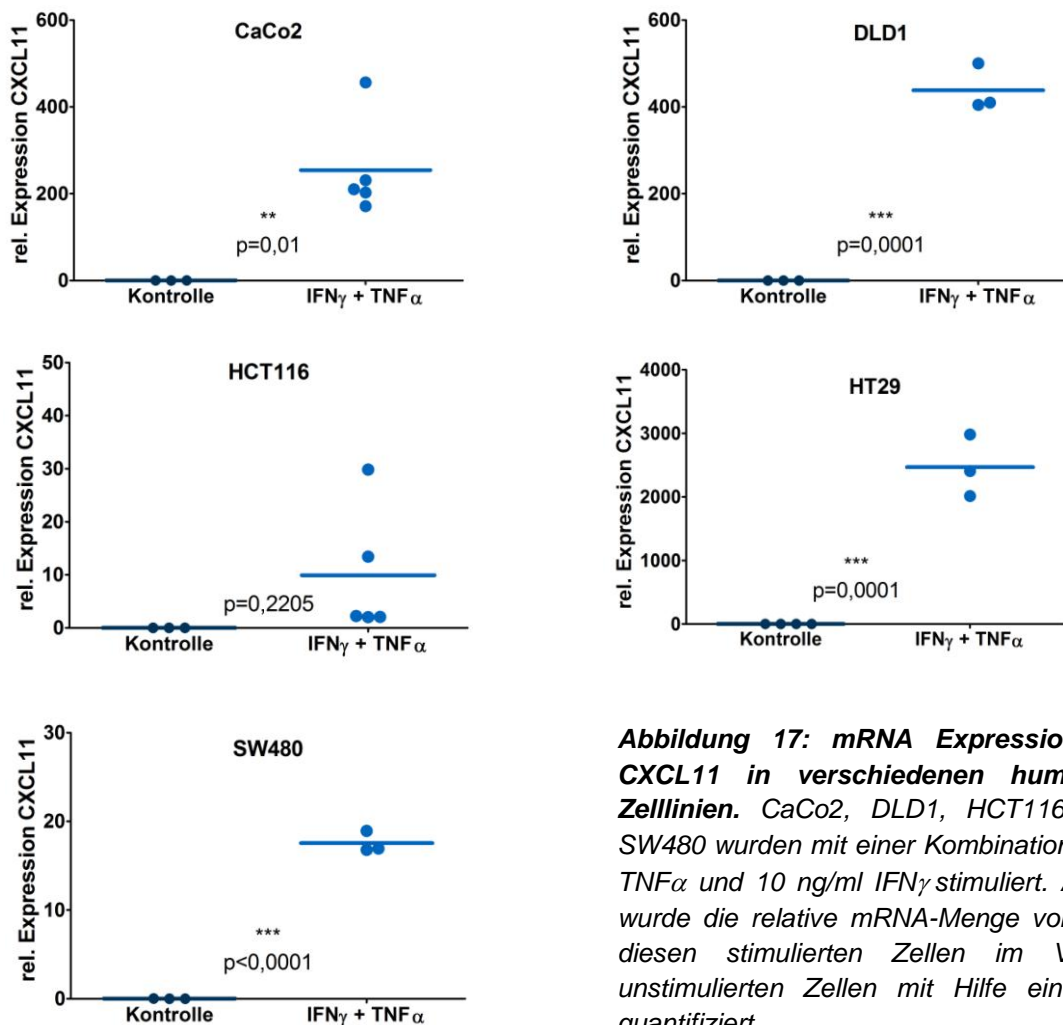


Abbildung 17: mRNA Expressionslevel von CXCL11 in verschiedenen humanen CRC-Zelllinien. CaCo2, DLD1, HCT116, HT29 und SW480 wurden mit einer Kombination von 5 ng/ml TNF α und 10 ng/ml IFN γ stimuliert. Anschließend wurde die relative mRNA-Menge von CXCL11 in diesen stimulierten Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen mit Hilfe einer qRT-PCR quantifiziert.

Weder CaCo2, noch DLD1, HCT116, HT29 oder SW480 Zellen verfügen über nennenswerte Mengen von CXCL11. Nach Gabe der Stimulanzen wiederum kam es in vier der fünf Zelllinien zu einer starken Induktion der mRNA Expression (vergleiche Abbildung 17). HCT116 Zellen, die eine Mikrosatelliteninstabilität aufweisen, konnten nach Stimulation keine signifikant erhöhten Mengen an CXCL11 mRNA exprimieren ($p=0,2205$). Sie sind allerdings dazu in der Lage ELR $^+$ Chemokine zu produzieren (Doll *et al.*, 2010). Im Gegensatz zu HCT116 zeigten die anderen vier Zelllinien (CaCo2 $p=0,01$, DLD1 $p=0,0001$, HT29 $p=0,0001$ und SW480 $p<0,0001$) eine starke Expressionsinduktion des CXCL11 Gens (siehe Abbildung 17).

3.1.10.2 In vitro Analyse der Chemokinexpression auf Proteinebene mittels ELISA

In CaCo2, DLD1, HT29 und SW480 Zellen war durch Zugabe von 5 ng/ml TNF α und 10 ng/ml IFN γ die Expression von CXCL11 induzierbar. Ein gesteigertes

Expressionsniveau dieses CXC-Chemokins auf mRNA Ebene muss allerdings nicht zwangsläufig eine erhöhte Sekretion des CXCL11 Proteins zur Folge haben. Um dies zu untersuchen wurde mit den Überständen dieser Zellen ein CXCL11 ELISA durchgeführt.

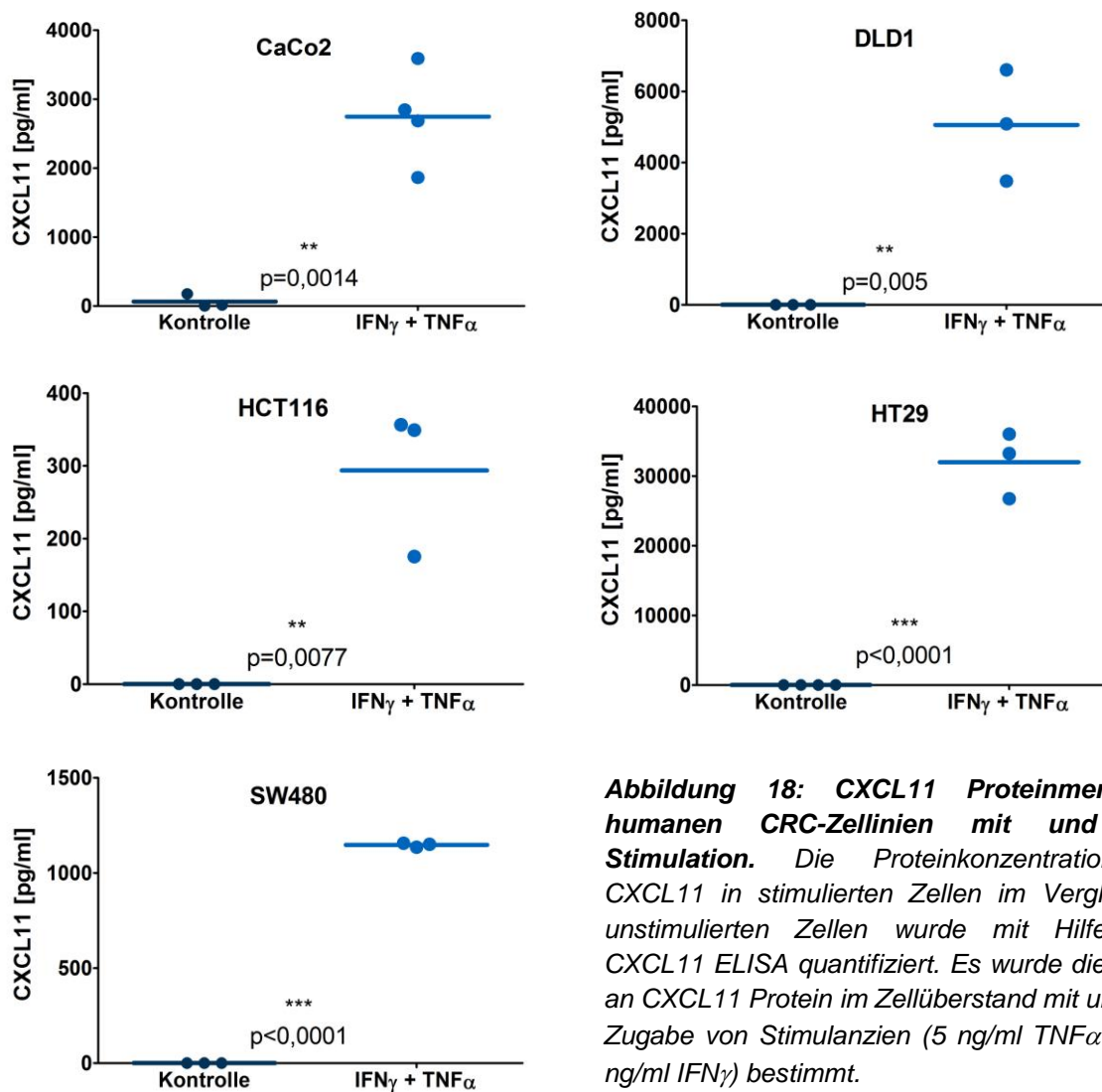


Abbildung 18: CXCL11 Proteinmenge in humanen CRC-Zelllinien mit und ohne Stimulation. Die Proteinkonzentration von CXCL11 in stimulierten Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen wurde mit Hilfe eines CXCL11 ELISA quantifiziert. Es wurde die Menge an CXCL11 Protein im Zellüberstand mit und ohne Zugabe von Stimulanzen (5 ng/ml TNF α und 10 ng/ml IFN γ) bestimmt.

Analog zur gesteigerten CXCL11 Genexpression, nach Stimulation der Zellen, kommt es zu einer erhöhten Konzentration von CXCL11 Protein im Zellüberstand. Auf mRNA Ebene konnte bei HCT116 Zellen lediglich ein Trend zur erhöhten Expression gezeigt werden. Auf Proteinebene hingegen kommt es zu einer signifikanten (p=0,0077) Induktion der Produktion und Sekretion. Sowohl in CaCo2 (p=0,0014) als auch DLD1 (p=0,005) Zellen zieht die Stimulation mit TNF α und IFN γ eine stabile und signifikante CXCL11 Produktion nach sich. Eine besonders starke Initiation der Menge an ausgeschüttetem CXCL11 Protein konnte in HT29 (p<0,0001) und SW480 (p<0,0001) Zellen beobachtet werden. Dieses Ergebnis

zeigt, dass die Expression ELR⁺ CXC-Chemokine nach Stimulation mit TNF α und IFN γ auf Proteinebene stark erhöht ist. Das bedeutet, dass die Zellen der CRC-Zelllinien dazu in der Lage sind CXCL11 zu produzieren und sezernieren.

3.1.10.3 Immunologischer Nachweis von CXCL11 auf Gewebeschnitten

Es handelt sich bei Tumoren um komplexe Gewebestrukturen, die aus einer Vielzahl von verschiedenen Zelltypen bestehen (*Hanahan und Weinberg, 2011*). Aus diesem Grund sollte mittels einer CXCL11 Immunfluoreszenzfärbung ermittelt werden, in welchen Bereichen im Gewebe die größten Mengen dieses Proteins gefunden werden können. Die *in vitro* Versuche mit diversen humanen CRC-Zelllinien konnte zeigen, dass diese Zellen dazu in der Lage sind, CXCL11 sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene in großen Mengen zu produzieren.

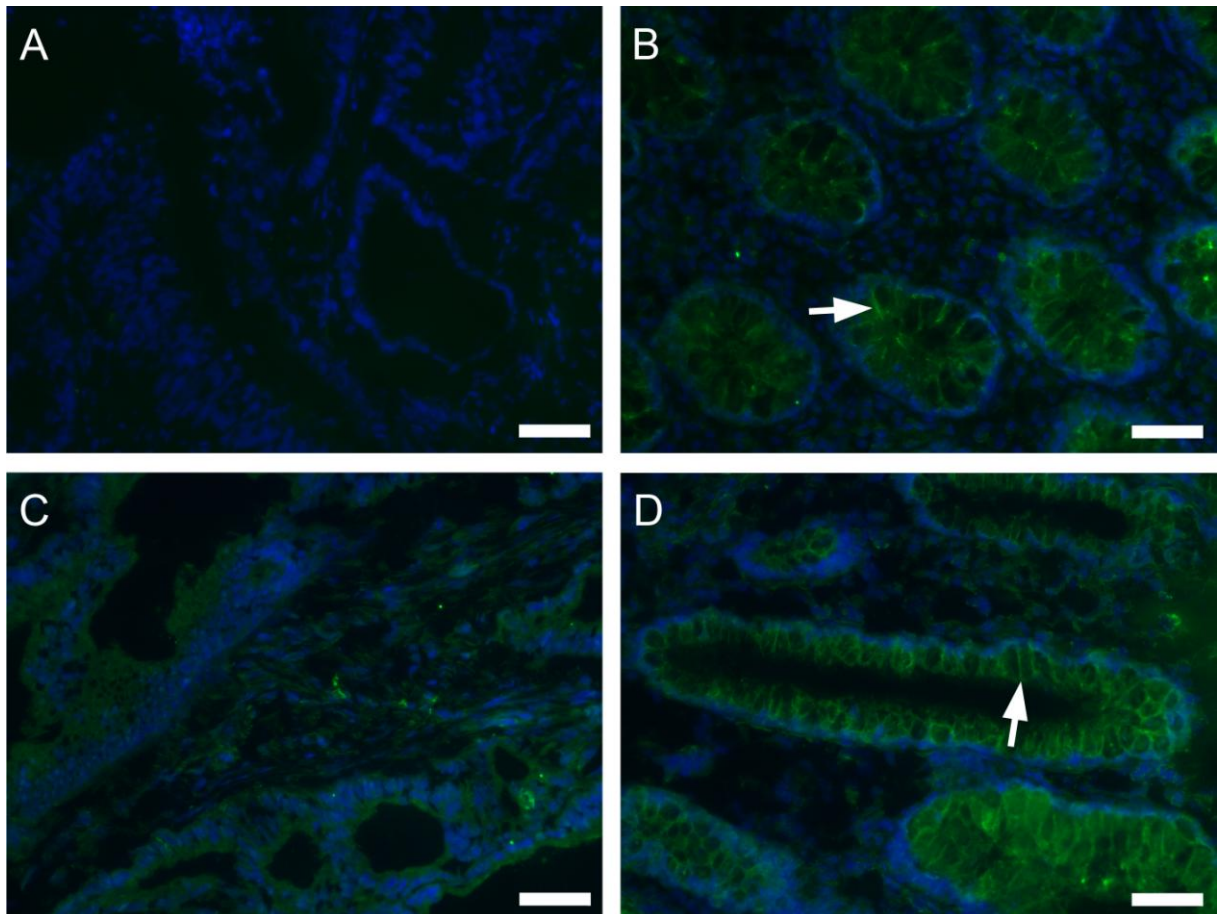


Abbildung 19: Immunfluoreszenz Färbung zweier verschiedener CRC-Gewebe mit einem Antikörper gegen humanes CXCL11 gerichtet. Die Zellkerne sind durch DAPI blau dargestellt. Humanes CXCL11 ist grün angefärbt. Die Pfeile weisen auf Zellen mit einer starken basolateralen Membranfärbung hin. A: Negativkontrolle (nur sekundärer Antikörper), B: Kolonnormalgewebe, C: Gewebeprobe eines Patienten mit einer geringen Expression an CXCL11, D: Tumor eines Patienten mit einer sehr hohen initialen CXCL11 Menge (Maßstabsbalken 50 μ m).

In der Literatur ist bereits beschrieben, dass eine Vielzahl von Zellen dazu in der Lage ist, CXC-Chemokine zu produzieren (*Liu et al., 2005*). Die vereinzelt gefärbten Zellen im Tumormilieu mit nur wenig CXCL11 sind Zellen des Tumorstromas. Aufgrund einer fehlenden Sekundärfärbung kann keine exakte Aussage über die Identität dieser Zellen getroffen werden. Die Tumorprobe eines Patienten mit einer hohen intratumoralen CXCL11 mRNA Konzentration wies eine starke basolaterale Membranfärbung in Tumorzellen epithelialen Ursprungs auf (vergleiche Abbildung 19 D). Die CXCL11 Immunfluoreszenzfärbung unterschiedlicher Patientengewebe zeigte, wie erwartet, keine Färbung in der Negativkontrolle (siehe Abbildung 19 A), wohingegen im Normalgewebe eine Färbung zu beobachten war (siehe Abbildung 19 B). Des Weiteren zeigten Gewebeschnitte, die eine hohe Menge an CXCL11 mRNA aufwiesen, eine starke Färbung (vergleiche Abbildung 19 D). Im Gegensatz dazu konnte in den Tumorproben der Patienten mit einer niedrigen CXCL11 Genexpression nur vereinzelte Zellen gefärbt werden (vergleiche Abbildung 19 C). Die Untersuchung verschiedener CRC-Zelllinien und Tumorproben zeigte, dass Krebszellen, die aus normalen Epithelzellen entstanden, eine Hauptquelle des ELR-Chemokins CXCL11 sind, wobei weitere Zelltypen als Chemokinquelle nicht ausgeschlossen werden können. Hierzu sind weitere Untersuchungen nötig.

3.1.11 Ermittlung der Blutgefäßdichte in Abhängigkeit der Chemokinexpression in Patientenproben

Immunhistochemische CD31 (*Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)*) Färbung an zwei unterschiedlichen Patientengeweben (vergleiche Abbildung 20). In Anbetracht der publizierten Wirkung von ELR⁻ Chemokinen wäre eine höhere Blutgefäßdichte in der Probe mit viel CXCL11 zu erwarten gewesen.

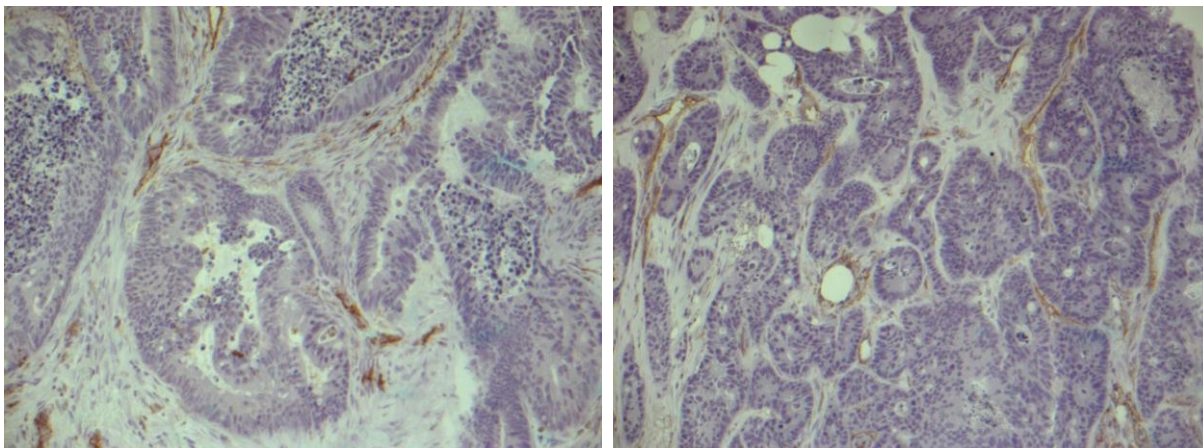


Abbildung 20: CD31 IHC Färbung zweier verschiedener CRC-Gewebe. Linke Seite: Tumor eines Patienten mit viel CXCL11; rechte Seite: Gewebeprobe eines Patienten mit einer geringen Expression an CXCL11.

Diese Erwartung konnte nach Analyse der CD31⁺ Fläche ($p=0,1117$) nicht bestätigt werden (vergleiche Abbildung 21).

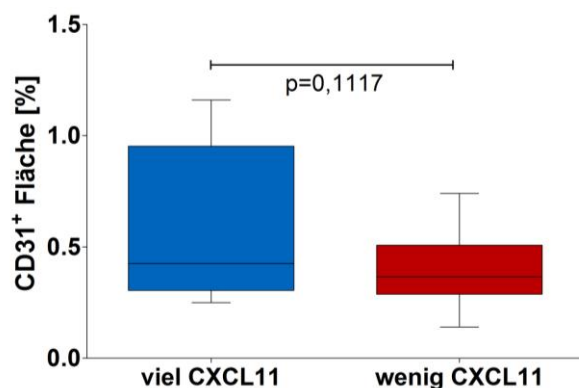


Abbildung 21: CD31⁺ Fläche in Patientenproben. Tumorproben aus zwei verschiedenen Gruppen (viel und wenig CXCL11) wurden immunhistochemisch gefärbt.

In der Literatur wird eine angiostatische Wirkung der ELR⁻ CXC-Chemokine beschrieben (*Liu et al., 2005; Liu et al., 2011*). Eine Blockierung der Angiogenese wäre eine mögliche Erklärung, weshalb Patienten mit einer hohen CXCL11 Expression ein besseres Überleben haben. Dietrich Doll hatte bereits die Dichte an Blutgefäßen in Patientenproben untersucht. Hierbei konnte er einen Trend erkennen, der darauf hindeutet, dass eine erhöhte CXCL11 Expression mit einer gesteigerten Blutgefäßdichte einhergeht. Es konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen Chemokinexpression und der Ausbildung von Blutgefäßen gezeigt werden.

3.1.12 Immuzellinfiltrat in Abhängigkeit der Chemokinexpression in Patientenproben

3.1.12.1 Quantifizierung des intratumoralen Infiltrats von CD3⁺ Zellen auf Gewebeschnitten

Neben der angiostatischen Wirkung von CXCL9-11 wird ebenso eine chemotaktische Wirkung beschrieben. Diese Chemokine sind dazu in der Lage T-Zellen zu rekrutieren (*Liu et al., 2005*). Des Weiteren wurde bereits beschrieben, dass eine hohe Menge an intratumoralen T-Zellen sich positiv auf die Prognose der Patienten auswirkt (*Galon, J. et al., 2006a*). Es ist jedoch bisher nicht bekannt, wie es zur unterschiedlichen T-Zelldichte in Patiententumoren kommt.

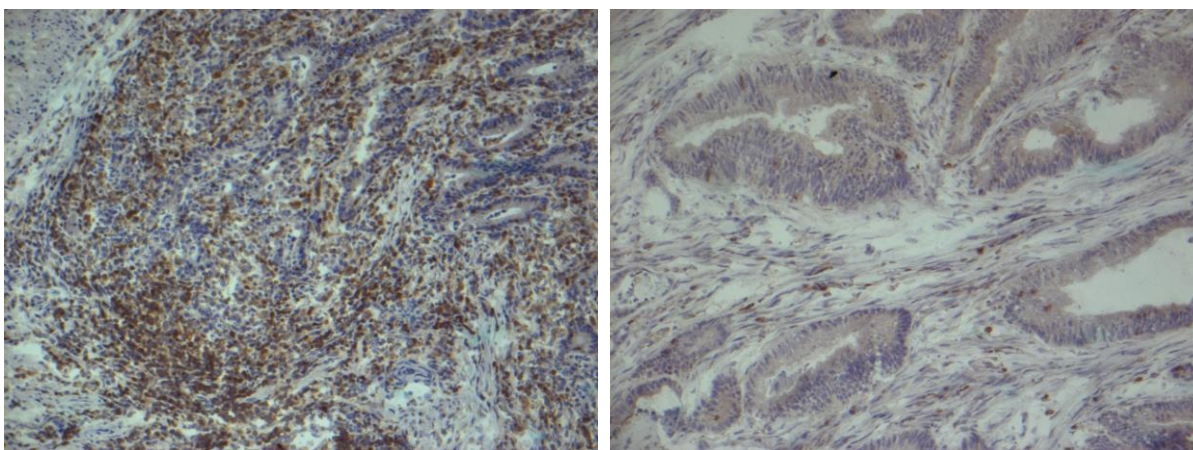


Abbildung 22: IHC Färbung zweier verschiedener CRC-Gewebe gegen CD3. Linke Seite: Tumor, der auf mRNA Ebene viel CXCL11 aufweist; rechte Seite: Gewebeschnitt eines Patienten, der wenig CXCL11 mRNA Transkript enthielt.

Dietrich Doll untersuchte mittels IHC Färbung, ob es unterschiedliche Mengen an CD3⁺ Zellen in den beiden Patientengruppen gibt. Nach der Färbung dieser Zellen wurden pro Gewebeschnitt jeweils 10 Gesichtsfelder ausgezählt.

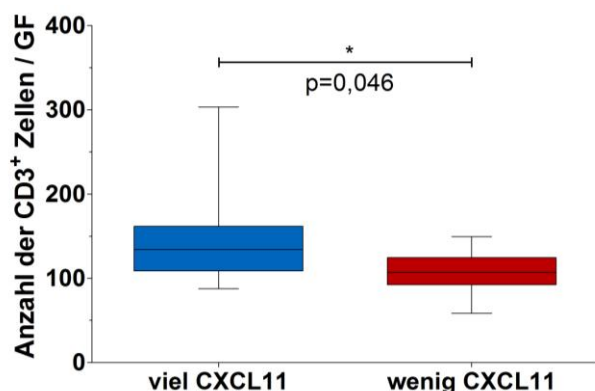


Abbildung 23: CXCL11 Expression in Korrelation zu CD3⁺ Zellen. Patientenproben mit viel und wenig CXCL11 wurden mit einem T-Zellantikörper (CD3) gefärbt und ausgezählt.

Es wurden in allen Proben mehr als 50 CD3⁺ Zellen gefunden. In der Gruppe von Patienten, die hohe intratumorale Mengen an CXCL11 exprimieren, konnten ebenfalls mehr CD3⁺ Zellen gefunden werden als in der Vergleichsgruppe mit nur wenig CXCL11 (p=0,046).

3.1.12.2 IHC Analyse der infiltrierenden T-Zell Subtypen innerhalb des Tumorgewebes

Es war Dietrich Doll möglich einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Menge an CXCL11 mRNA und der Zahl an tumorinfiltrierenden CD3⁺ Zellen aufzuzeigen. Dies deutet darauf hin, dass Patienten mit viel CXCL11 ebenfalls viele intratumorale T-Zellen besitzen. Allerdings gibt es keine Information darüber um welche Art von T-Zell Subtypen es sich handelt. Jeder Subtyp erfüllt spezifische Aufgaben. So regeln FoxP3⁺ Zellen die Immunantwort herab, im Gegensatz zu CD4⁺ T-Helferzellen oder CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (*Fridman et al., 2011; Zitvogel et al., 2010; Zitvogel et al., 2011*).

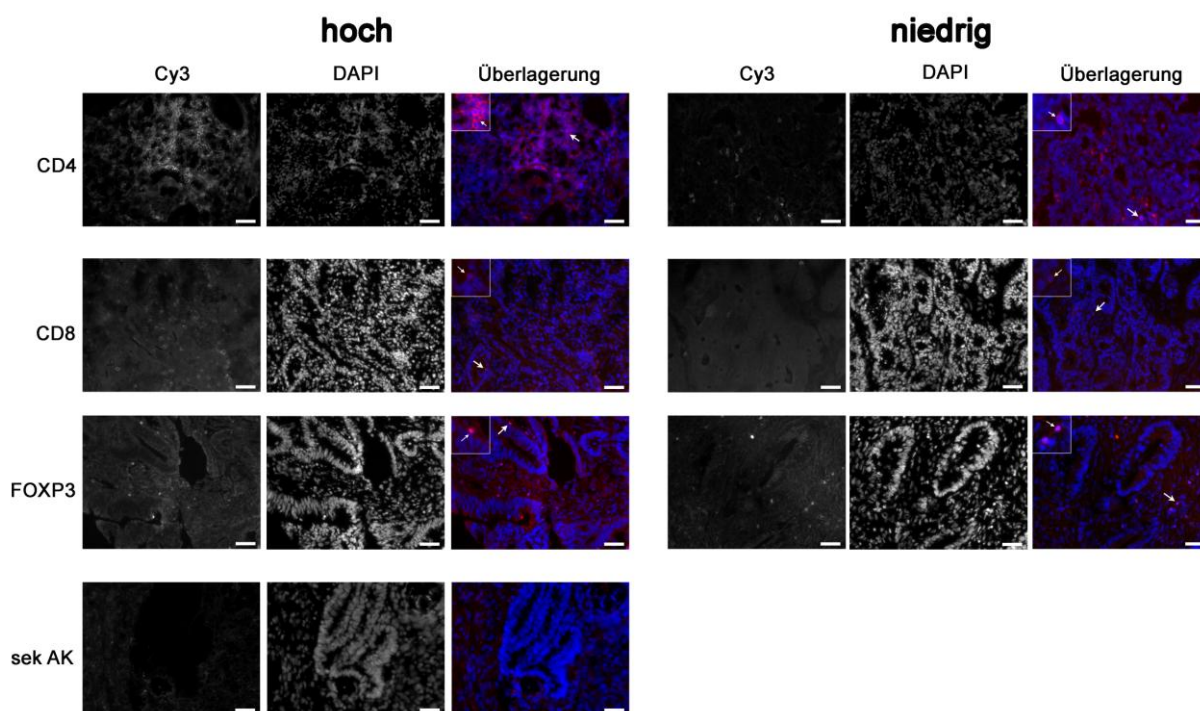


Abbildung 24: Immunfluoreszenzfärbung von Tumorgeweben gegen CD4, CD8 und FoxP3. Linke Seite: Tumorgeweben mit einer hohen intratumoralen CXCL11 Konzentration; rechte Seite: Gewebeschnitte von CRC Tumoren mit einer niedrigen CXCL11 Expression (Maßstabsbalken 50 µm).

Durch die immunhistochemischen Färbungen von Patientengewebe war es möglich T-Zell Subpopulationen innerhalb des Tumors nachzuweisen und zu quantifizieren. Hierzu wurden die Kryoschnitte mittels immunfluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt. Im Anschluss daran wurden pro Patientenprobe 10 Gesichtsfelder zufällig

ausgewählt und fotografiert. Zwei Personen quantifizierten diese ohne hierbei die Probenidentität zu kennen (Doppelblindbestimmung). In Abbildung 24 sind intratumoral bereits mehr CD4⁺ und CD8⁺ Zellen in den Proben mit erhöhten CXCL11 Leveln erkennbar, als vergleichbare Proben mit einem niedrigen CXCL11 Expressionsniveau. Im Gegensatz dazu kann nur anhand der FoxP3 Färbung nicht unterschieden werden welcher Gewebeschnitt von einem Patienten mit viel oder wenig CXCL11 stammt.

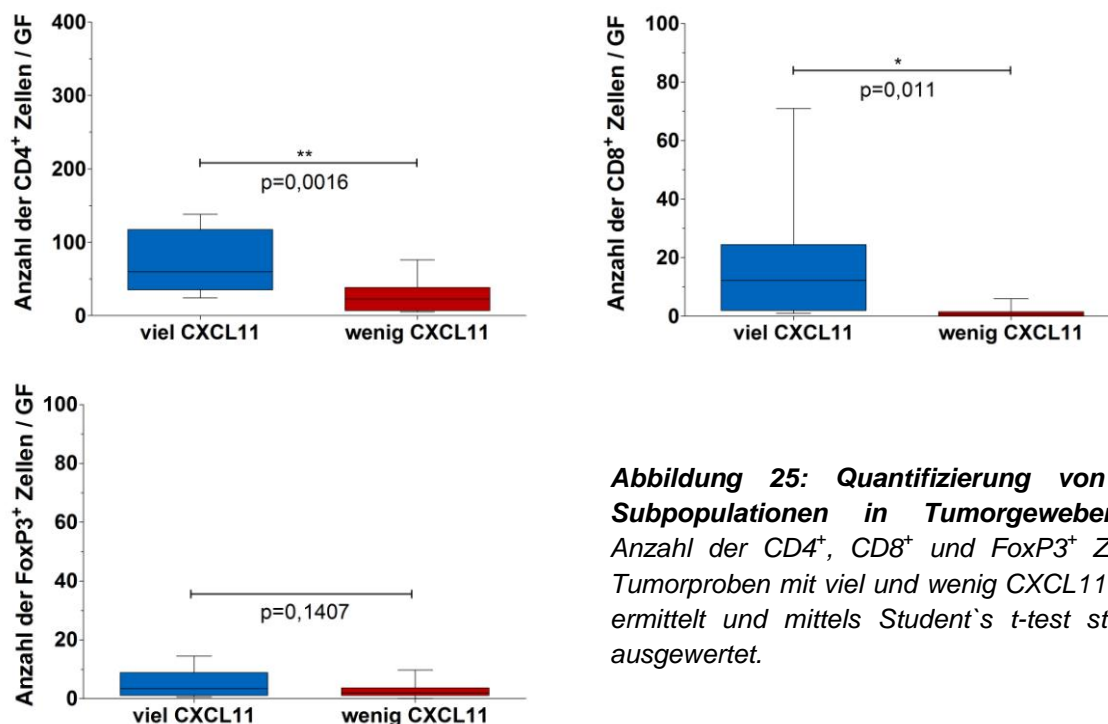


Abbildung 25: Quantifizierung von T-Zell Subpopulationen in Tumorgeweben. Die Anzahl der CD4⁺, CD8⁺ und FoxP3⁺ Zellen in Tumorproben mit viel und wenig CXCL11 wurden ermittelt und mittels Student's t-test statistisch ausgewertet.

Nach der Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung bestätigten sich die bereits subjektiv wahrgenommenen Tendenzen. In Tumorproben, die viel CXCL11 enthielten, waren deutlich mehr CD4⁺ T-Helferzellen ($p=0,0016$) und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen ($p=0,011$) nachweisbar als in Geweben, die nur wenig CXCL11 exprimiert. Andererseits war jedoch kein Unterschied in der Anzahl von FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen ($p=0,1407$) unter diesen Bedingungen erkennbar ist.

3.1.12.3 qRT-PCR Analyse des intratumoralen Infiltrats

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass die ELR⁻ Chemokine dazu in der Lage sind T-Zellen zu rekrutieren. Hierbei wird eine hauptsächlich T_H1 gesteuerte Immunantwort ausgelöst. Die Bedeutung der CD4⁺ T-Helferzellen im Zusammenhang mit viel und wenig intratumoralem CXCL11 konnte bereits durch immunhistochemische Untersuchungen herausgestellt werden. Um die Art der

Immunantwort genauer klassifizieren zu können sollten weitere Experimente durchgeführt werden. Bereits schockgefrorene Patientenproben können nicht mehr in der FACS Analyse verwendet werden. Somit wurde mittels quantitativer rt-PCR eine Transkriptanalyse durchgeführt.

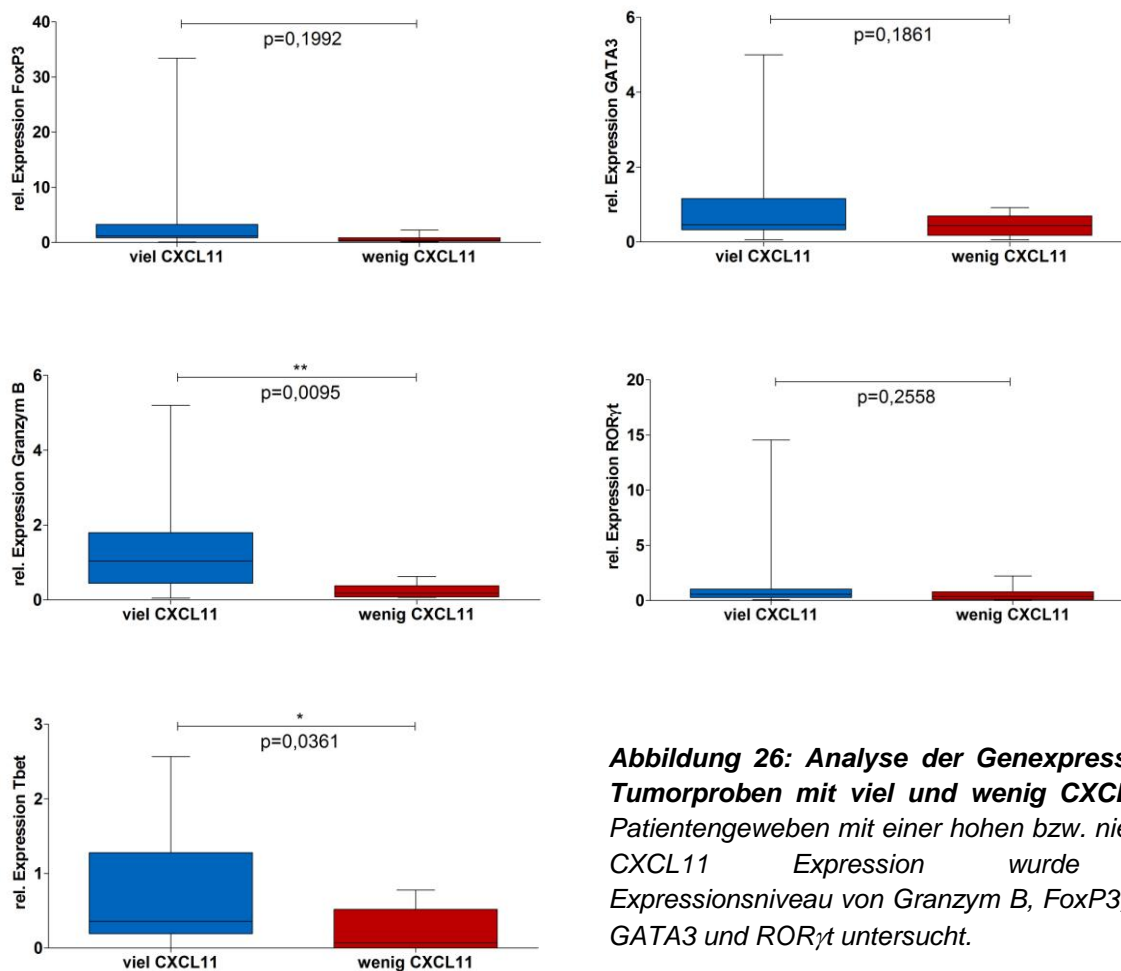


Abbildung 26: Analyse der Genexpression in Tumorbproben mit viel und wenig CXCL11. In Patientengeweben mit einer hohen bzw. niedrigen CXCL11 Expression wurde das Expressionsniveau von Granzym B, FoxP3, Tbet, GATA3 und ROR γ t untersucht.

Die Gewebeproben der beiden Patientengruppen (viel und wenig CXCL11) wurden mittels qRT-PCR auf die relative Expression verschiedener Gene untersucht. Granzym B wurde in diesem Fall als Transkript zytotoxischer T-Zellen verwendet und bestätigte die bereits in der immunhistochemischen CD8 Färbung gewonnenen Ergebnisse. Besitzen die Tumore von CRC Patienten viel CXCL11, gibt es mehr CD8⁺ Zellen und mehr Granzym B Transkript ($p=0,0095$), als in der Vergleichsgruppe. Ebenso verhält es sich mit der Genexpression von Tbet (T_{H1}) ($p=0,0361$), die sich äquivalent zu der des CXCL11 Gens verhält. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei T_{H1} T-Helferzellen um die T-Zellsubpopulationen handelt, die den Tumor infiltrieren. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die FoxP3 Mengen auf mRNA Basis variieren, nachdem sie auf Proteinebene in beiden Gruppen gleichermaßen existierten. Dieser Befund bestätigte sich ebenfalls auf

mRNA Ebene ($p=0,1992$). Zwei weitere Transkripte sollten den möglichen Einfluss der T_H2 (GATA3 Gen) bzw. T_H17 (ROR γ t Gen) Antwort ermitteln. Es konnte weder eine Auswirkung der exprimierten CXCL11 Menge im Patientengewebe auf die T_H2 ($p=0,1861$) noch die T_H17 ($p=0,2558$) Immunantwort nachgewiesen werden.

3.1.13 Ex vivo Organkultur von Normal- und Tumorgewebe

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass eine hohe intratumorale CXCL11 Expression im Patientengewebe sich positiv auf das Überleben von Patienten auswirkt. Weiterhin ermöglicht es diese, Hochrisikopatienten des UICC Stadiums II zu ermitteln. Hierbei ist es wichtig zu wissen, dass die Tumorzellen selbst dazu in der Lage sind dieses ELR⁻ Chemokin zu produzieren. CXCL11 wirkt chemotaktisch auf T-Zellen und rekrutiert diese ins Tumorgewebe. Nicht geklärt ist allerdings, ob die Tumore mit einem niedrigen CXCL11 Expressionsniveau dieses herabregulieren oder die Fähigkeit zu dessen Produktion ganz verloren haben. Eine Möglichkeit zur Untersuchung dieser Fragestellung bietet eine *ex vivo* Organkultur mit frischen Patientenproben aus dem OP.

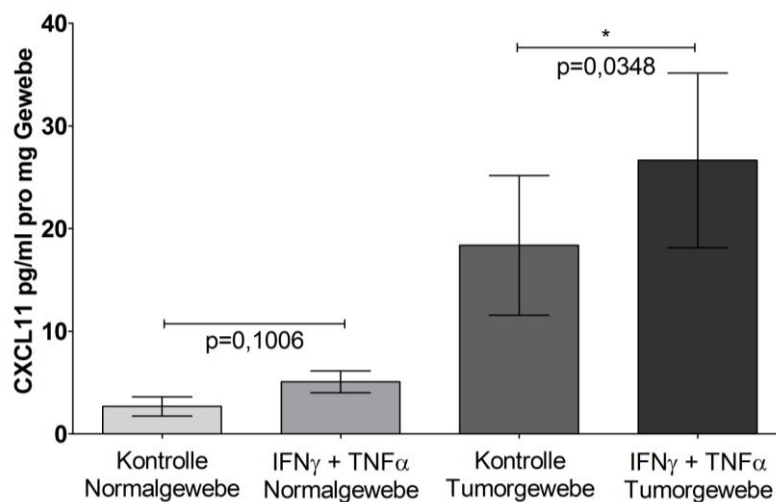


Abbildung 27: Ex vivo Organkultur und der Einfluss von IFN γ und TNF α auf die CXCL11 Proteinproduktion. CXCL11 ELISA des Kulturmediums verschiedener Patientengewebe (Normal und Tumor) mit und ohne Zusatz von Stimulanzen (IFN γ und TNF α).

Frisch entnommenes Tumor- und Normalgewebe von CRC Patienten wurde direkt im OP in Zellkulturmedium überführt. Diese Proben wurden daraufhin sofort in einer *ex vivo* Organkultur eingesetzt. Infolgedessen wurde sowohl das Normal- als auch das Tumorgewebe eines Patienten mit und ohne Zusatz von IFN γ und TNF α im Brutschrank inkubiert. Hierauf folgte die Analyse des Zellkulturüberstandes durch

einen CXCL11 ELISA. Die ermittelten Mengen des CXCL11 Proteins waren im Normalgewebe nach Stimulation tendenziell höher als ohne *IFN γ* und *TNF α* ($p=0,1006$) Zusatz. Im Gegensatz dazu ist das Tumorgewebe nach Gabe der Stimulanzen in der Lage signifikant höhere Mengen CXCL11 zu produzieren, als das Kontrollgewebe ($p=0,0348$).

Dies zeigt deutlich, dass Tumore nicht nur dazu in der Lage sind CXC-Chemokine zu produzieren, sondern durch Stimulation auch die Menge an CXC-Chemokinen erhöht werden kann. Ebenso wird die Fähigkeit zu deren Produktion lediglich stillgelegt, aber geht nicht verloren. So ist es möglich die Produktion durch Stimulation des Gewebes in großen Mengen zu gewährleisten. Patientenproben die laut Genanalyse nur eine schlechte Prognose hatten konnten in 57,14% der Fälle (4/7) durch Stimulation zu einer Steigerung der Chemokinexpression gebracht werden. Bei 50% der Patienten (9/18), die bereits ein hohes intratumorales Ausprägungsniveau besaßen, war eine weitere Steigerung der Menge an CXCL11 Protein nach Stimulation möglich.

3.2 Teil II: Die Rolle der CXC-Chemokinexpression bei Kolonkarzinomen: Befunde an Mausmodellen

3.2.1 Genetische Mausmodelle und Zelllinien

3.2.1.1 Expressionsanalyse der Chemokine in transgenen Modellen für Darmkrebs

Mithilfe quantitativer real-time PCR konnten sowohl Tumor- als auch Normalgewebe verschiedener genetischer Mausmodelle auf deren Expression der Chemokine CXCL9-11 und Granzym B untersucht werden. Hierbei wurden drei verschiedene Mausmodelle verwendet. Es handelt sich um transgene Ras (pVillin-K-ras^{V12G}) Mäuse, die onkogenes K-ras im Darmepithel exprimieren. Sie entwickeln durchschnittlich zwei bis drei Tumore nach 20 Monaten. Dadurch konnte gezeigt werden, dass Ras ausreicht um die Tumorgenese zu initiieren (*Janssen et al., 2002*). Als Modell für das FAP-Syndrom dienen Apc (Apc^{1638N}) knock-in Mäuse. Sie exprimieren geringe Mengen des am C-Terminus deletierten Apc Proteins und entwickeln ab einem Alter von zehn Monaten fünf bis sechs Tumore (*Fodde et al., 1994; Janssen et al., 2006*). Das kombinierte Mausmodell RasApc (pVillin-K-ras^{V12G}xApc^{1638N}) zeigt eine drastische Erhöhung der Tumorgenese und Sterblichkeit der Tiere. Sie exprimieren sowohl onkogenes K-ras als auch mutiertes Apc im Darmepithel, was zu einer durchschnittlichen Entwicklung von 30 Tumoren innerhalb von sechs Monaten führt (*Janssen et al., 2006*).

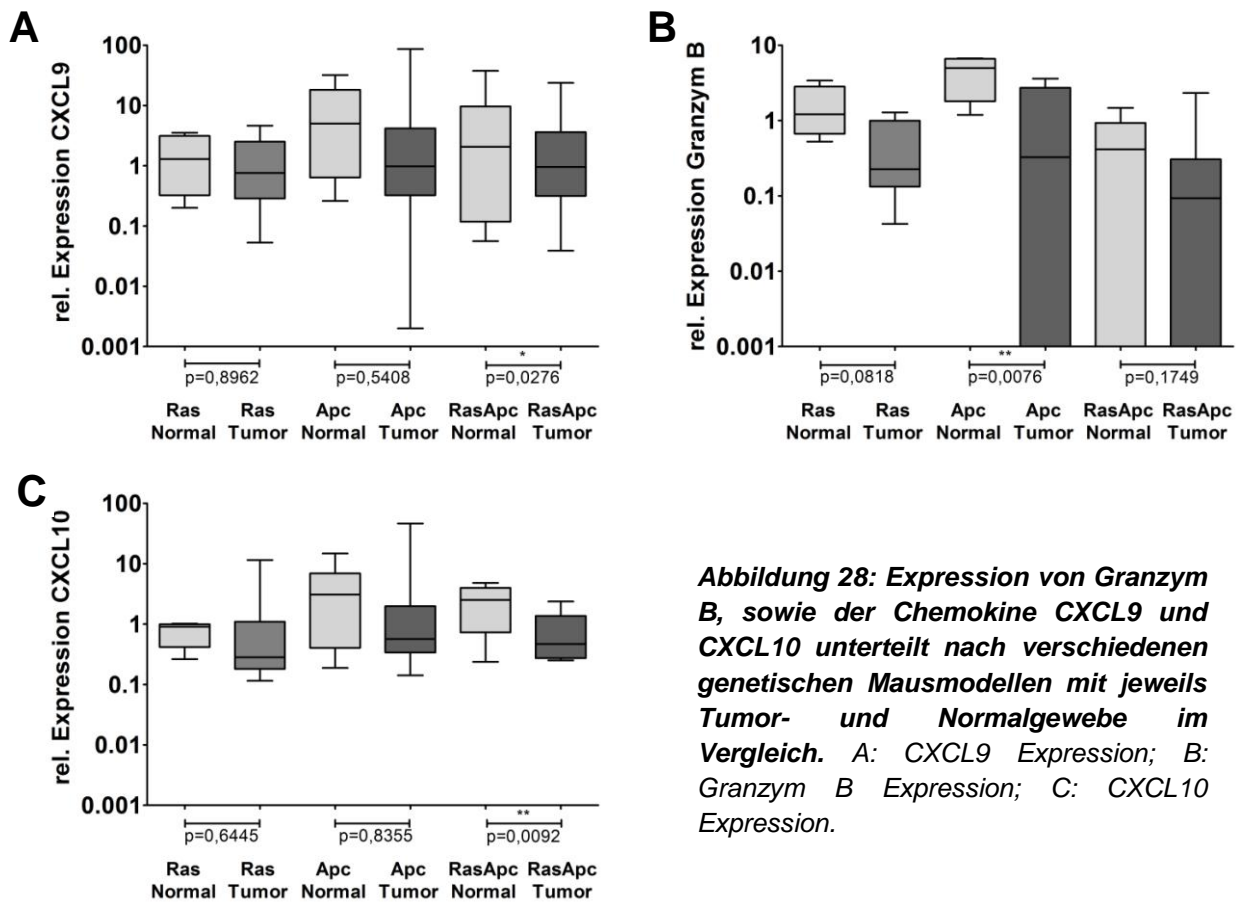


Abbildung 28: Expression von Granzym B, sowie der Chemokine CXCL9 und CXCL10 unterteilt nach verschiedenen genetischen Mausmodellen mit jeweils Tumor- und Normalgewebe im Vergleich. A: CXCL9 Expression; B: Granzym B Expression; C: CXCL10 Expression.

Die Analyse der exprimierten Menge an CXCL9 und CXCL10 ergab, dass weder in Ras noch Apc Mäusen ein Unterschied der CXCL-Menge in Normal- und Tumorgewebe feststellbar war. Die Kreuzung dieser beiden Mausmodelle hingegen, die RasApc Mäuse, zeigte eine verminderte Expression von CXCL9 ($p=0,0276$) und CXCL10 ($p=0,0092$) in Tumoren. Des Weiteren ergaben die Untersuchungen für Granzym B keine Unterschiede in Ras Mäusen oder dem kombinierten Mausmodell RasApc. Eine signifikante Senkung der Granzym B Level ($p=0,0076$) konnte in Tumoren der Apc Mäuse beobachtet werden.

3.2.1.2 Expression von CXC-Chemokinen *in vitro*

Verschiedene murine Zelllinien wurden auf die Fähigkeit, CXC-Chemokine zu exprimieren, untersucht. Es wurde nach einer Zelllinie gesucht, die für die orthotope Zellimplantation verwendet werden kann. Hierbei war es von großer Bedeutung möglichst niedrige initiale Mengen an CXCL10 zu erhalten. Es wurde weiterhin untersucht, ob eine Zugabe von Stimulanzen die Zellen zu einer gesteigerten Produktion und Sezernierung des CXCL10-Proteins ins Kulturmedium veranlasst.

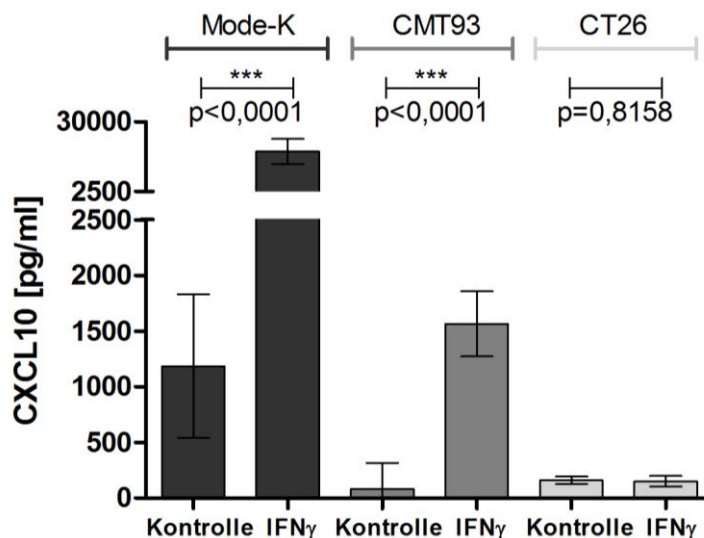


Abbildung 29: Proteinmenge von CXCL10 im Kulturmedium von Mode-K, CMT93 und CT26-Zellen mit und ohne Zugabe von IFN γ . Gesteigerte Menge an CXCL10 Protein im Überstand von Mode-K und CMT93 Zellen nach der Stimulation. Keine Auswirkung durch die Gabe von IFN γ bei CT26-Zellen.

Mode-K ist eine intestinale Epithelzelllinie (Hormannsperger et al., 2010) die nicht aus Karzinomzellen generiert wurde. Sie sezerniert bereits hohe initiale Mengen CXCL10 ins Zellkulturmedium. Dieses Proteinlevel kann durch Zugabe von IFN γ um ein vielfaches ($p < 0,0001$) gesteigert werden. Eine Zunahme der Proteinkonzentration ist ebenfalls bei CMT93 Zellen nach Zugabe von IFN γ erkennbar ($p < 0,0001$). Allerdings ist zu beachten, dass sowohl die initiale CXCL10 Menge als auch die Proteinkonzentration im Überstand nach Stimulation in CMT93 Zellen deutlich geringer ist als in Mode-K Zellen. Eine Steigerung der abgegebenen Menge an CXCL10 Protein konnte in CT26-Zellen auch nach Stimulation mit IFN γ nicht beobachtet werden. Stattdessen ist zu erkennen, dass sowohl mit als auch ohne Stimulation die Menge des sezernierten CXCL10 sehr gering ist (durchschnittlich 155 pg/ml).

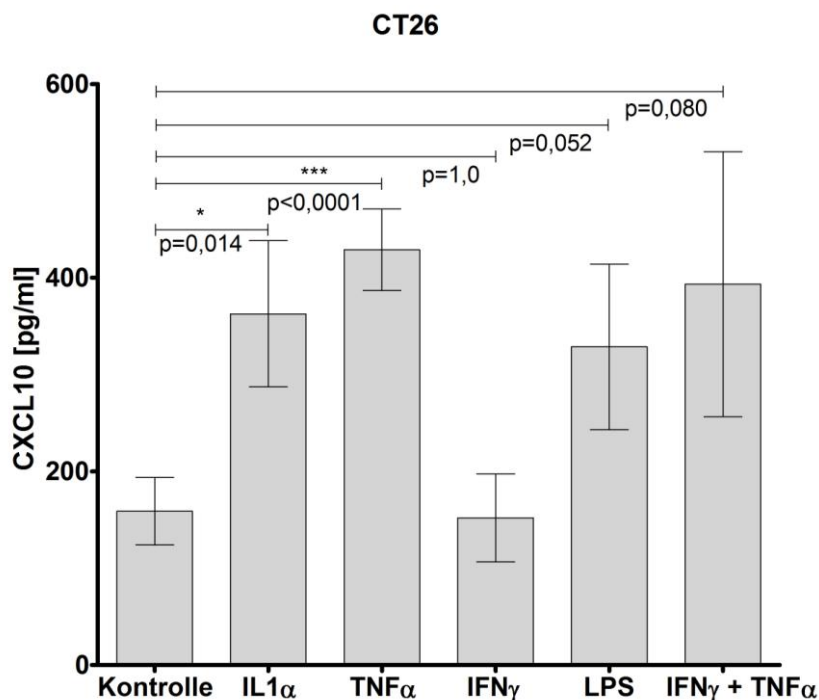


Abbildung 30: Proteinkonzentration von CXCL10 im Zellkulturmedium von CT26-Zellen. Untersuchung der Zelllinie CT26 bezüglich deren Verhalten auf die Sezernierung des CXCL10 Proteins nach Zugabe verschiedener Stimulanzen (IL1 α , TNF α , IFN γ , LPS und IFN γ + TNF α).

Eine Steigerung der sezernierten Menge an CXCL10 Protein (\bar{x} =160 pg/ml) konnte lediglich nach Stimulation mit IL1 α (p =0,014, \bar{x} =360 pg/ml) und TNF α (p <0,0001, \bar{x} =430 pg/ml), nicht jedoch mit IFN γ (p =1,0, \bar{x} =150 pg/ml), LPS (p =0,052, \bar{x} =330 pg/ml) oder der Kombination aus IFN γ und TNF α (p =0,080, \bar{x} =390 pg/ml) erreicht werden. In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die abgegebenen Mengen von CXCL10 einen Durchschnittswert von 430 pg/ml nicht übersteigen.

Zur orthotopen Zellimplantation stehen drei isogene Zelllinien zur Verfügung. Hierbei handelt es sich um Mode-K, CMT93 und CT26-Zellen. Die Stimulationsversuche und Analyse der Maximalmenge an abgegebenem CXCL10 ins Medium zeigen, dass CT26-Zellen die geringste Mengen an CXCL10 sezernieren. Aus diesem Grund eignen sich diese aus den zur Auswahl stehenden isogenen Zellen hierfür am Besten.

3.2.1.3 Identifizierung der intratumoralen Immunzellinfiltrate auf m-RNA Ebene

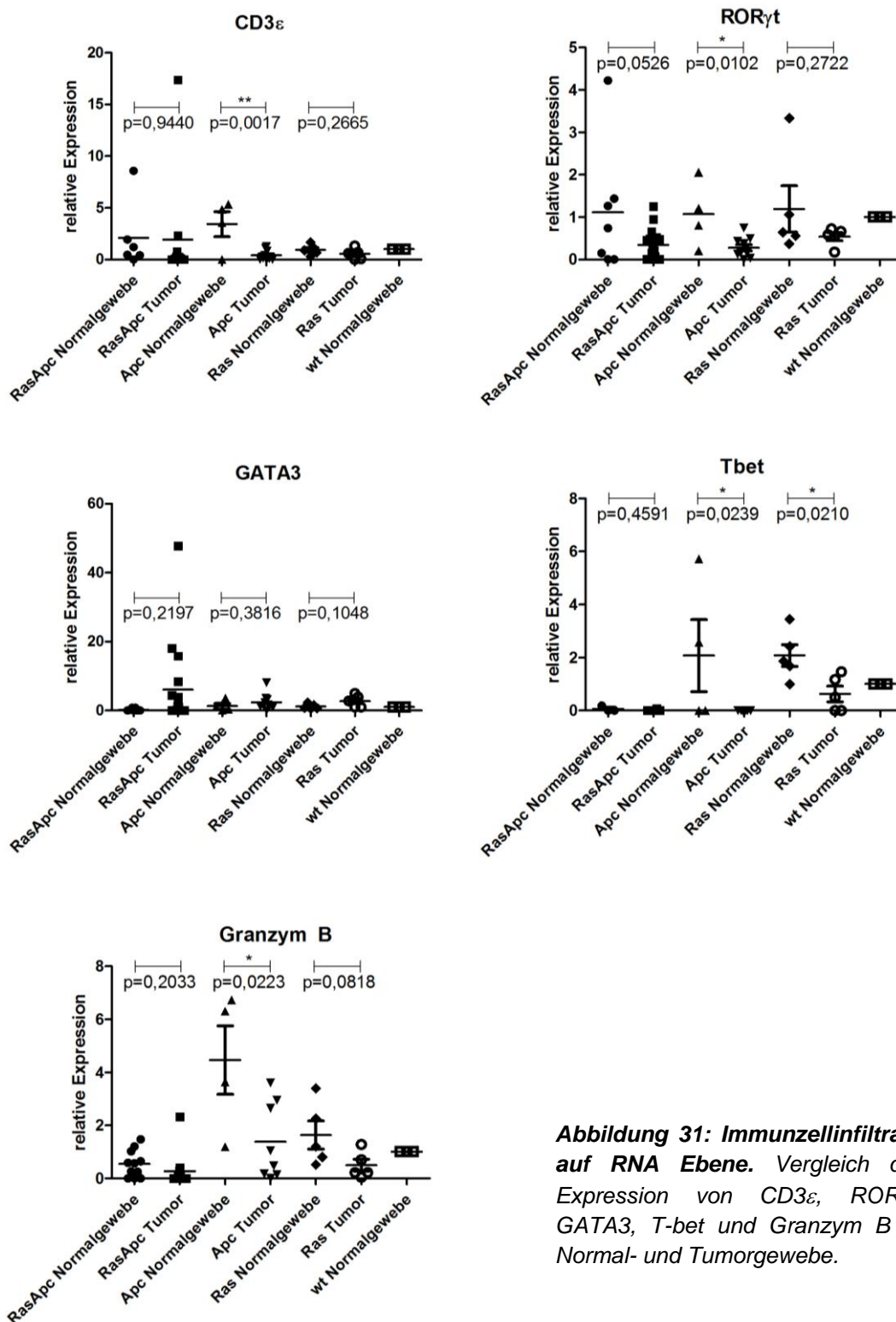


Abbildung 31: Immunzellinfiltrate auf RNA Ebene. Vergleich der Expression von CD3 ϵ , ROR γ t, GATA3, Tbet und Granzym B in Normal- und Tumorgewebe.

Die Untersuchung der infiltrierenden Immunzellsubtypen wurde auf mRNA Ebene durchgeführt. Hierbei wurden Proben aus Normal- und Tumorgewebe der verschiedenen transgenen Mausstämmen entnommen und deren RNA gewonnen. Es wurde nach Transkripten der T-Zellen (CD3 ϵ), T_H1-T-Zellen (Tbet), T_H2-T-Zellen

(GATA3), T_H17-T-Zellen (ROR γ t) und zytotoxischen T-Zellen (Granzym B) gesucht und deren relative Expression ermittelt. Die Gewebeproben der Apc-Mäuse zeigten eine verminderte Anzahl an T-Zelltranskripten in deren Tumorproben. So nahmen die Transkripte von CD3 ϵ (p=0,0017), ROR γ t (p=0,0102), T-bet (p=0,0239) und Granzym B (p=0,0223) im Vergleich zum Normalgewebe ab. Der deutlichste Effekt konnte hierbei bei den CD3 ϵ Transkripten beobachtet werden. RasApc Mäuse zeigten keinen signifikanten Unterschied in der relativen Expression der verschiedenen Gene. In Ras Mäusen tritt hingegen eine verminderte Expression des T-bet Transkripts auf (p=0,0210). Im Falle von GATA3 konnten keinerlei Expressionsunterschiede gezeigt werden.

Weiterführende Analysen mittels Immunfluoreszenz und FACS wurden von Cornelia Ochs im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt (Ochs, 2012).

3.2.1.4 Ex vivo Organkultur von murinem Tumorgewebe

Vorangegangene Expressionsanalysen konnten bereits zeigen, dass die Menge an CXCL9 und 10 im Tumorgewebe von RasApc Mäusen niedriger ist als im vergleichbaren Normalgewebe. Allerdings ist über eine quantitative *real-time PCR* keine Aussage über die Ursache der verminderten Expression zu treffen. Mithilfe der *ex vivo* Organkultur sollte untersucht werden, ob die Tumorzellen die Fähigkeit zur Chemokinexpression verloren haben, oder diese möglicherweise vom Tumor reduziert wurde. Beides wäre möglich und ist dem Tumorwachstum förderlich, da CXC-Chemokine dazu in der Lage sind Immunzellen zu rekrutieren. In diesem Versuch wurden frische Tumorproben entnommen und in Zellkulturmedium inkubiert. Hierbei wurde von jedem der gastrointestinalen Tumormausmodelle (Ras, Apc und RasApc) Tumore mit und ohne Stimulanzen (IFN γ + TNF α) inkubiert. Dabei sollte die Zugabe der Kombination aus IFN γ + TNF α zeigen, ob die Gewebe zur gesteigerten CXCL10 Produktion angeregt werden konnten.

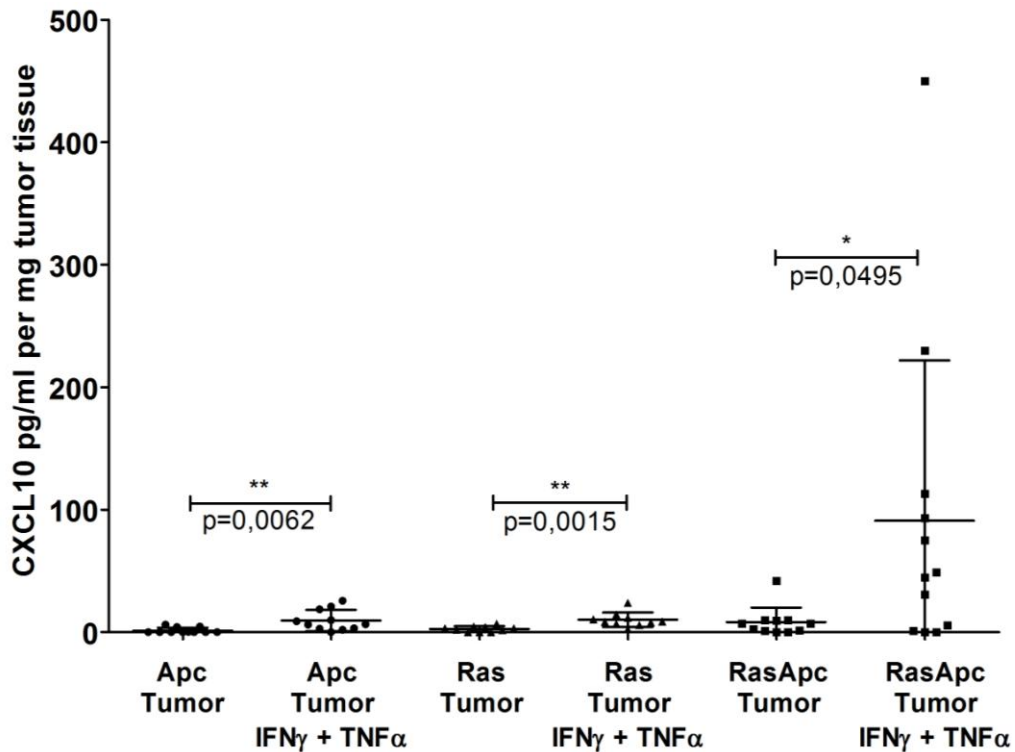


Abbildung 32: Ex vivo Organkultur von Tumorgewebe verschiedener genetischer Mausmodelle. Tumore von Ras, Apc und RasApc Mäusen konnten durch Zugabe von $IFN\gamma$ + $TNF\alpha$ stimuliert werden, wodurch sie eine erhöhte Menge an CXCL10 produzierten.

Die ex vivo Organkultur von murinen Tumorgeweben zeigte, dass die Produktion von CXCL10 durch die Gabe von $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ stimuliert werden konnte. Durch Zugabe der Stimulanzienkombination konnte die sezernierte Menge an CXCL10 Protein in Apc ($p=0,0062$), Ras ($p=0,0015$) und RasApc ($p=0,0495$) Tumoren gesteigert werden.

3.2.2 Orthotopes Tumorimplantationsmodell

Das orthotope Mausmodell wurde eingesetzt, um einen kausalen Zusammenhang zwischen CXC-Chemokinexpression und Tumorsuppression zu untersuchen. Mithilfe der CRC-Patientenproben war es bereits möglich, eine Korrelation zwischen einer hohen Menge an CXC-Chemokinen und einer positiven Prognose des Patienten herzustellen. In diesem Tierversuch sollten isogene kolorektale Karzinomzellen genetisch modifiziert (+/- Expression von CXCL10) und verschiedenen Mausstämmen implantiert werden. Hierbei handelt es sich um Wildtypmäuse und $Rag1^{-/-}$ (*recombination activating gen 1*) Mäuse, die weder B- noch T-Zellen besitzen. Durch den *knock-out* des *Rag1*-Gens werden die Rekombination und die Reorganisation der Immunglobulin- und T-Zellrezeptorgene während der VDJ-Rekombination verhindert. Demzufolge werden in *Rag1* defizienten Mäusen

keine reifen B- und T-Zellen produziert. Angesichts dessen ist es möglich den direkten Zusammenhang zwischen CXCL10 Expression, der Rekrutierung von T-Zellen und deren Auswirkung auf die Tumorprogression zu untersuchen.

3.2.2.1 Einfluss von CXCL10 auf die Migration und Proliferation von Tumorzellen *in vitro*

In Voruntersuchungen sollte getestet werden, ob CT26 eine geeignete Zelllinie darstellt, um für die orthotope Zellimplantation verwendet zu werden. Zu diesem Zweck wurden Zellen benötigt, die isogen sind, möglichst geringe Mengen an CXCL10 produzieren und eine Eigenstimulation der Zellen durch dieses Chemokin ausgeschlossen ist. Hierzu wurde die Wirkung von CXCL10 auf das Migrations- und Proliferationsverhaltens von CT26-Zellen untersucht.

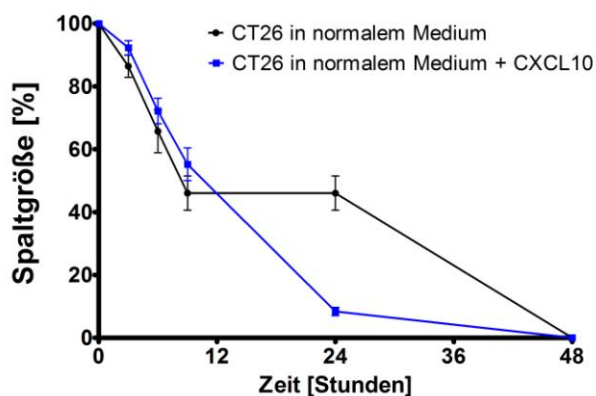


Abbildung 33: Migrationsanalyse von CT26-Zellen. In einem Wundheilungsversuch wurde die Migration von CT26-Zellen mit und ohne Zugabe von CXCL10 untersucht.

Der Wundheilungsversuch diente der Untersuchung des Migrationsverhaltens von CT26-Zellen. Die Zellkulturschale hatte hierbei einen definierten Spalt, der einzig durch die Zellwanderung geschlossen werden konnte. Es herrschten identische Versuchsbedingungen, die sich lediglich durch den Zusatz von rekombinantem CXCL10 Protein unterschieden.

In der obigen Abbildung ist die Spaltgröße gegen die Zeit aufgetragen. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede in der Migration der beiden Ansätze beobachtet werden. Es kam zu keiner Stimulation der Zellwanderung von CT26-Zellen durch die Gabe von CXCL10.

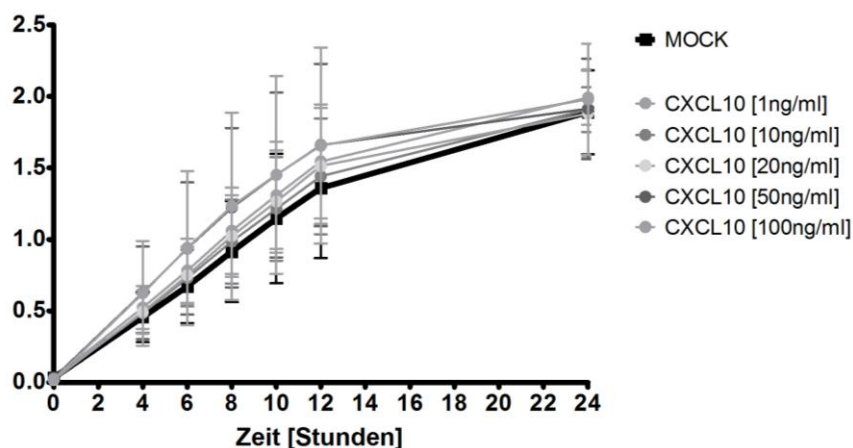


Abbildung 34: XTT Assay von CT26-Zellen. Untersuchung des Einflusses von CXCL10 auf die Zellproliferation.

Die Proliferation von CT26-Zellen wurde durch einen XTT Versuch analysiert. Hierbei wurde das Zellwachstum unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Dem Versuchsansatz wurden unterschiedliche Mengen (0, 1, 10, 20, 50 und 100 [ng/ml]) an rekombinantem CXCL10 Protein zugegeben. Die Zugabe von CXCL10 hatte jedoch keinerlei Einfluss auf die Proliferation der CT26-Zellen. Dies zeigt, dass es nicht zu einer Stimulation des Zellwachstums durch die vorherrschende Menge an CXCL10 kommt.

3.2.2.2 Herstellung und Klonierung von Vektoren

Zur Etablierung des orthotopen Modells wurde ein Vektor benötigt, der sowohl dazu in der Lage war CXCL10 zu exprimieren, als auch schnell und einfach im Gewebe nachweisbar war. Um die Detektion von Mikrometastasen zu ermöglichen wurde das LacZ-Gen in den Vektor eingefügt. Dies sollte nach Dissektion der Maus durch eine β -Galaktosidasefärbung unterschiedlicher Organe die Frage nach dem Vorhandensein von Fernmetastasen klären. Des Weiteren sollte das Teton System verwendet werden, was es ermöglicht, die Expression des Wunschgens nach Belieben zu initiieren. Bei den gewonnenen Klonen konnte in der Zellkultur eine Induzierbarkeit des CXCL10 nachgewiesen werden. Hierfür wurden CMT93-Zellen mit einem C57/Bl6N und CT26-Zellen mit einem Balb/c Hintergrund verwendet. Allerdings wurden diese isogenen CMT93-Zellen nach der orthotopen Implantation sowohl in Rag1^{-/-}-Mäusen als auch dem zugehörigen Wildtypstamm C57/Bl6N abgestoßen. Diese Abstoßungsreaktion machte ein Anwachsen der Tumorzellen im Wirtorganismus und die davon abhängige Untersuchung des Einflusses der Chemokinexpression auf die Tumorbildung unmöglich. Alternativ hierzu wurde ein

Vektor kreierte, der CXCL10 stabil überexprimiert bzw. ohne das CXCL10 Insert und nur mit dem LacZ-Gen ausgestattet war. Hierdurch wurde die Induzierbarkeit des Systems verloren, aber das Anwachsen im Wirtorganismus (Balb/c-Hintergrund) gelang.

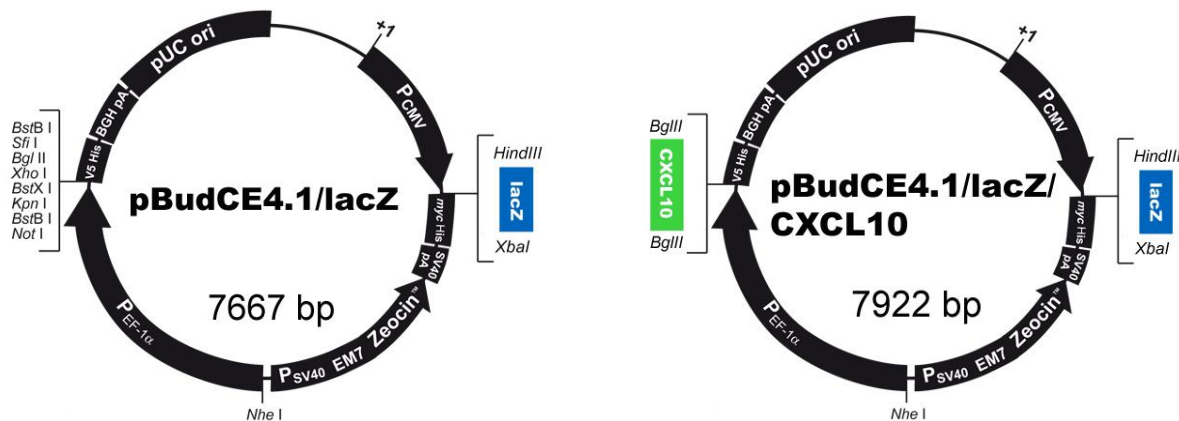


Abbildung 35: Darstellung der für die orthotopie Zellimplantation verwendeten Vektoren. Die beiden Vektoren unterscheiden sich lediglich im Vorhanden- bzw. nicht Vorhandensein des CXCL10 Gens.

Die beiden Vektoren pBudCE4.1/lacZ und pBudCE4.1/lacZ/CXCL10 konnten in Rag1^{-/-}- und Balb/c-Mäuse implantiert werden und wuchsen an. Beim pBudCE4.1/lacZ/CXCL10-Vektor wird das CXCL10 und bei beiden Vektoren (pBudCE4.1/lacZ und pBudCE4.1/lacZ/CXCL10) das LacZ-Gen von Beginn an exprimiert.

3.2.2.3 Charakterisierung der generierten stabilen Klone muriner Tumorzellen

Die erzeugten stabilen Klone mussten auf ihre Eigenschaften hin untersucht werden. Zur orthotopie Zellimplantation sollten die Klone verwendet werden, deren CXCL10 Expression am höchsten bzw. niedrigsten war. Des Weiteren musste der Einfluss der genetischen Modifikation und stabilen Transfektion auf das Proliferationsverhalten der Zellen untersucht werden.

3.2.2.3.1 CXCL10 Ausprägung auf Proteinebene

Die Überstände aller generierten stabilen Klone wurden mittels ELISA auf deren CXCL10 Proteinexpression untersucht. Zu diesem Zweck wurden von jedem Klon 1×10^6 Zellen ausgebracht und 22 Stunden später der Überstand abgenommen.

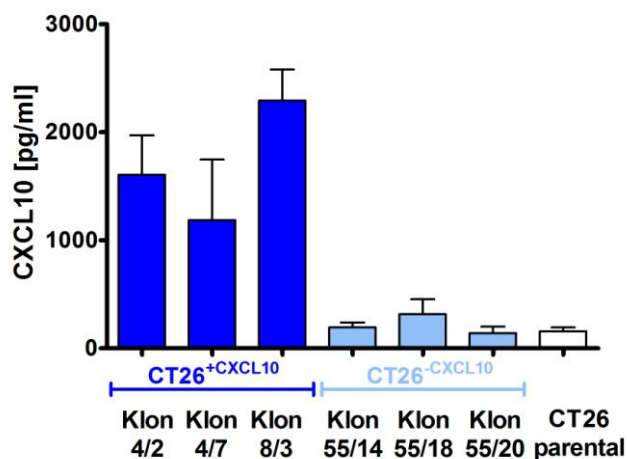


Abbildung 36: CXCL10 ELISA der ausgewählten Klone. CXCL10 Expression der Klone 4/2, 4/7 und 8/3, die den pBudCE4.1/lacZ/CXCL10-Vektor tragen, und die Kontrollklone 55/14, 55/18 und 55/20, welche mit dem pBudCE4.1/lacZ-Vektor stabil transfiziert wurden, zusätzlich als Kontrolle parentale CT26 Zellen.

Erwartungsgemäß zeigten alle Klone, die mit dem pBudCE4.1/lacZ-Vektor transfiziert wurden, eine vergleichbare Proteinexpression wie die parentalen untransfizierten CT26-Zellen. Die Klone hingegen, die den pBudCE4.1/lacZ/CXCL10-Vektor trugen, wiesen eine drastische Steigerung der sezernierten CXCL10 Menge im Überstand auf. Hierbei stieg die Menge an nachgewiesenem CXCL10 Protein auf die bis zu 16-fache Menge an. Für die orthotope Zellimplantation wurden die CXCL10 exprimierenden Klone 4/2, 4/7 und 8/3 ausgewählt, ebenso wie die Klone 55/14, 55/18 und 55/20 für die Kontrollgruppe. Zusätzlich wurde die CXCL10 Expression der verschiedenen Klone über eine Dauer von fünf Wochen ohne Zusatz von Antibiotikum zum Zellkulturmedium beobachtet. Dies sollte das Verhalten der Zellen im Wirtsorganismus simulieren, da hier ebenfalls kein Antibiotikum den Selektionsdruck aufrecht erhält. Die Versuche ergaben, dass die Expression der Zellen über fünf Wochen ohne Antibiotikum stabil blieb.

3.2.2.3.2 Proliferationsanalyse ausgewählter Tumorzellklone

In *Oncogene* wurde ein Artikel veröffentlicht, indem die Autoren eine prometastatische Wirkung des Chemokins CXCL10 beschreiben (Kawada et al., 2007). Diese äußert sich vornehmlich in einer gesteigerten Proliferation und Migration. Um eine solche Wirkung der generierten Klone ausschließen zu können wurde eine Proliferationsanalyse durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob die

genetische Modifikation im Allgemeinen bzw. die Überexpression von CXCL10 im Speziellen zu einer Veränderung des Proliferationsverhaltens der Zellen beiträgt.

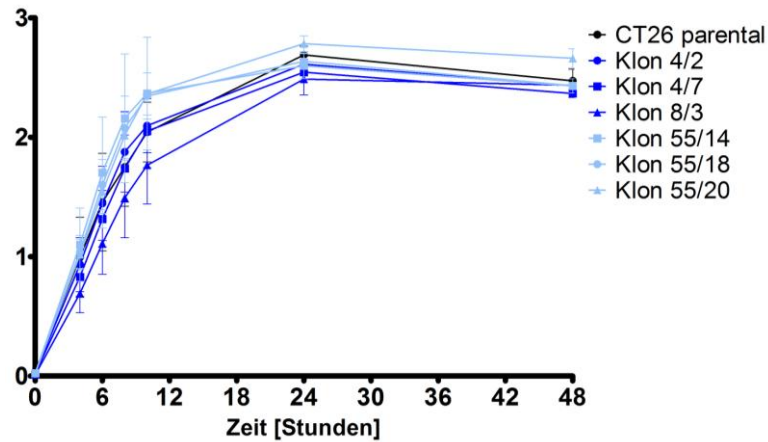


Abbildung 37: XTT Assay von parental CT26-Zellen und den generierten stabilen Klonen. Untersuchung des Einflusses der genetischen Modifikation auf die Zellproliferation.

Die Ausgangszelllinie wird in der obigen Grafik als CT26 parental bezeichnet. Des Weiteren handelt es sich bei 55/14, 55/18 und 55/20 um die Klone mit pBudCE4.1/lacZ-Vektor und bei 4/2, 4/7 und 8/3 um die Klone, die den pBudCE4.1/lacZ/CXCL10-Vektor enthalten. Deutlich erkennbar ist, dass weder die stabile Transfektion der Zellen, noch die kontinuierliche Überexpression von CXCL10 zu einer Veränderung der Zellproliferation führte. Es zeigt sich sowohl bei den parental Zellen, als auch bei den generierten Klonen ein äquivalentes Zellwachstum.

3.2.2.4 Etablierung der intrarektalen Zellimplantation in immunkompetente Balb/c- sowie immundefiziente Rag1^{-/-}-Mäuse

Um das orthotope Mausmodell nutzen zu können mussten die Versuchsbedingungen auf die verwendeten Mausstämme angepasst werden. Die Methode, wie sie im Paper von Alencar et. al beschrieben wurde (Alencar et al., 2005), war speziell an Nacktmäuse angepasst. Hauptsächlich mussten die Inkubationszeiten der Zellen und des Trypsins angepasst werden.

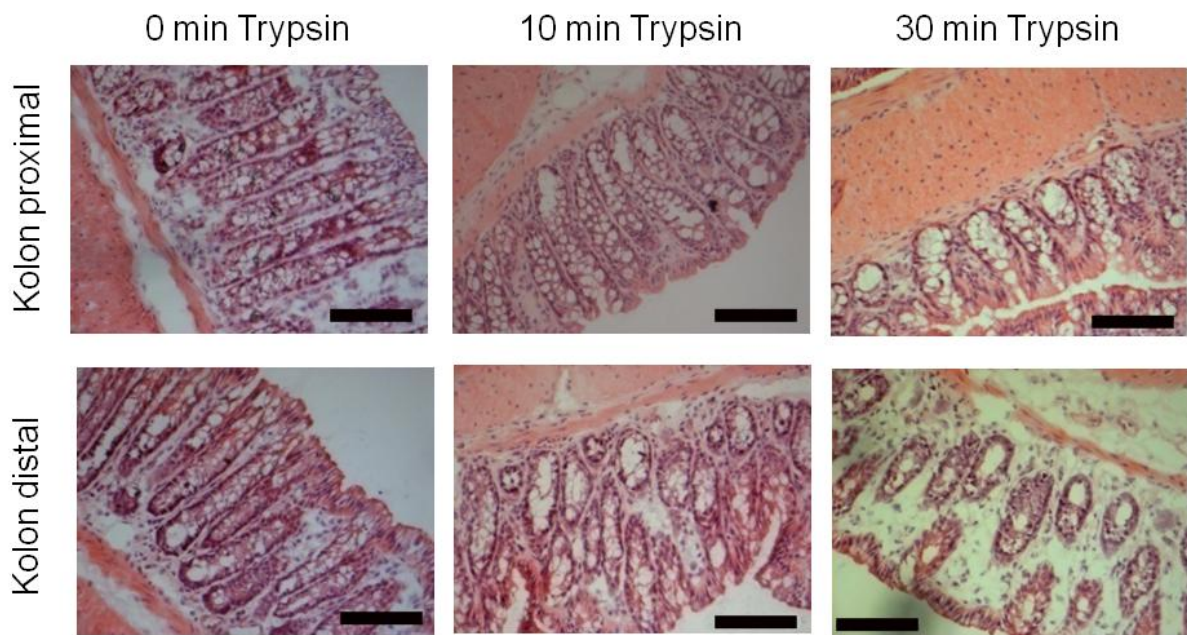


Abbildung 38: Hämatoxylin-Eosin-Färbung vom proximalen und distalen Kolon. Der proximale und distale Kolon von Wildtypmäusen nach 0, 10 und 30 min Trypsininkubation mit einem Maßstabsbalken (100 µm).

Durch das Setzen nicht invasiver Gefäßklemmen wurde ein 1cm großer Bereich im distalen Kolon definiert, der mit Trypsin inkubiert wurde. In diesen Bereich sollten im weiteren Verlauf die modifizierten CT26^{-CXCL10}- und CT26^{+CXCL10}-Zellen eingebracht werden. Um ein Anwachsen der Zellen zu ermöglichen war es nötig die Darmwand der Mäuse mittels Trypsin anzudauen. Hierdurch entstanden Lücken, in die sich die Zellen einlagern und anwachsen konnten. Diese Lücken sind unter anderem essentiell um zu gewährleisten, dass die implantierten Zellen nicht sofort mechanisch durch den Kottransport entfernt werden konnten, bevor sie Gelegenheit dazu hatten anzuwachsen.

Den proximalen Kolon erreichte keinerlei Trypsin, weshalb es zu keinem Inkubationszeitpunkt zu einem Andauen des Gewebes kam. Die Klammern gewährleisteten, dass lediglich innerhalb dieses Bereichs das Trypsin wirken konnte.

Nach 10 min Trypsininkubation konnte nahezu keine Veränderung des Gewebes beobachtet werden. Eine Verlängerung dieser Zeitspanne führte zum gewünschten Effekt (vergleiche Abbildung 38). Aus diesem Grund wurde für alle weiteren Versuche ein Trypsin- und Zellinkubationszeit von 30 Minuten eingehalten.

3.2.2.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Tumoren des orthotopen Mausmodells

Nach der Tumorentnahme wurden die Gewebe sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bzw. für Gewebeschnitte mittels *Tissue Tek* tiefgefroren. Zur näheren histologischen Begutachtung wurden die verschiedenen Läsionen der beiden Mauslinien durch Hämatoxylin-Eosin (HE) eingefärbt. Die HE-Färbung ermöglicht die morphologische Untersuchung von Geweben. Hierbei wurden durch Hämatoxylin basophile Strukturen wie z.B. die DNA der Zellkerne bläulich-violett und durch das Eosin hauptsächlich die Zellplasmaproteine rötlich eingefärbt.

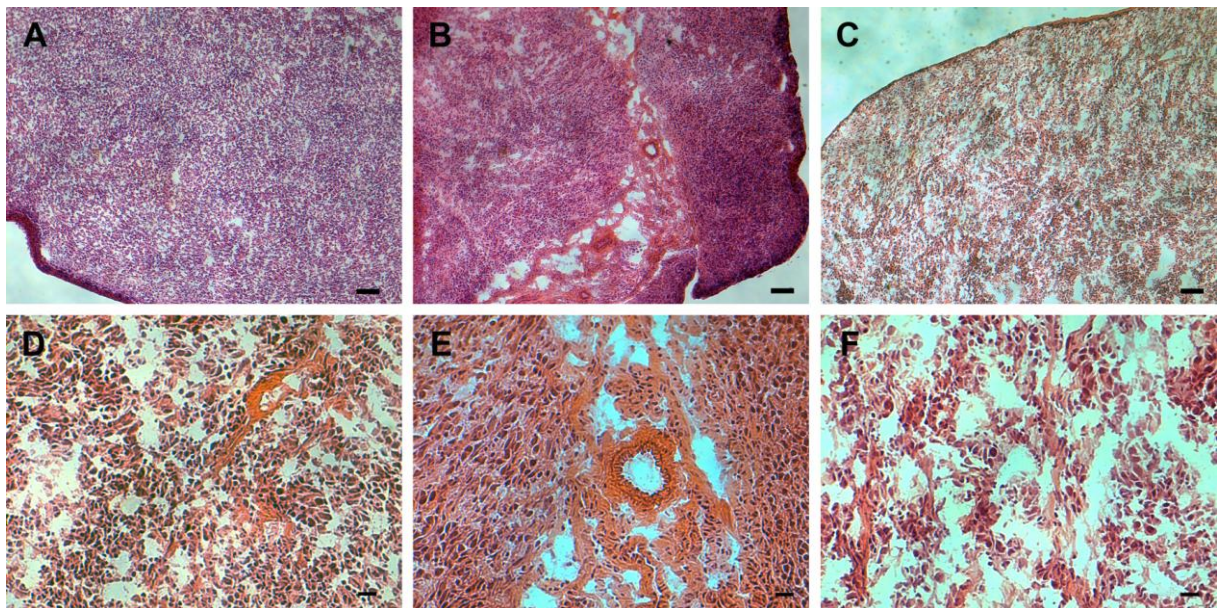


Abbildung 39: Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Tumorproben. A: CT26^{-CXCL10}-Tumor in einer Balb/c Maus (Maßstabsbalken 100 µm); B: CT26^{-CXCL10}-Tumor in einer Rag1^{-/-} Maus (Maßstabsbalken 100 µm); C: CT26^{+CXCL10}-Tumor in einer Rag1^{-/-} Maus (Maßstabsbalken 100 µm); D: Vergrößerung von A (Maßstabsbalken 20 µm), E: Vergrößerung von B (Maßstabsbalken 20 µm); F: Vergrößerung von C (Maßstabsbalken 20 µm).

In dieser Untersuchung wurden Tumorproben von Balb/c und Rag1^{-/-} Mäusen gefärbt, um die Morphologie der Läsionen zu untersuchen. Ungeachtet der Art der implantierten Zellen und der verwendeten Mausstämme stellten sich die Tumore als schwammartig dar. Die Expression von CXCL10 hatte keinerlei Einfluss auf die Struktur der Tumore (vergleiche Abbildung 39 A-C). Die Läsionen bestanden jedoch

nicht aus einer ausschließlich homogenen Tumorzellmasse, sondern wiesen Blutgefäße (Vaskularisierung) auf (vergleiche Abbildung 39 B und E).

3.2.2.4.2 Makroskopische Tumoranalyse

Die Dissektion der operierten Tiere erfolgte 35 Tage post operativ oder bei einer starken Verschlechterung des Gesundheitszustandes, wie einem Gewichtsverlust von 20%. Es wurden 42 Balb/c und 39 Rag1^{-/-} Mäuse erfolgreich operiert. Die Mortalitätsrate während der Operation lag bei weniger als 1%.

Balb/c	0 Tumore/ Tier	1 Tumor/ Tier	>1 Tumor/ Tier	Rag1 ^{-/-} Balb/c	0 Tumore/ Tier	1 Tumor/ Tier	>1 Tumor/ Tier
+ CXCL10	19	0	0	+ CXCL10	18	2	0
- CXCL10	23	4	1	- CXCL10	21	4	3
Gesamt	42	4	1	Gesamt	39	6	3

Tabelle 15: Anzahl makroskopisch nachweisbarer Tumore pro Maus. Balb/c und Rag1^{-/-} Mäusen wurden nach der Implantation von CT26^{+/-CXCL10}-Zellen die Tumore entnommen und ausgezählt.

Die immunkompetenten Balb/c Mäuse bekamen ausschließlich Läsionen nach der Implantation von CT26-Zellen, die kein CXCL10 exprimierten. Hierbei wurde bei vier der 28 operierten Tiere (14,3%) jeweils ein Tumor an der Stelle der Implantation im distalen Kolon gefunden. Lediglich eine (3,6%) der 28 Mäuse zeigte eine Metastasierung und wies mehr als nur den Primärtumor auf, wohingegen 82,1% der Tiere (23 von 28) keinerlei Tumorwachstum aufwiesen.

Nach der chirurgischen Entfernung der gewachsenen Tumore bei Rag1^{-/-}-Mäusen zeigte sich, dass es zu einem leichten Anstieg der Tumore pro Tier im Vergleich zu den Wildtypmäusen kam. Des Weiteren entstanden sowohl aus CT26^{-CXCL10}-Zellen als auch CT26^{+CXCL10}-Zellen Tumore. In 10% (2 von 20) der immundefizienten Tiere, denen CT26^{+CXCL10}-Zellen implantiert worden waren, wuchs jeweils ein Primärtumor. Eine Metastasierung wurde lediglich nach dem Einbringen von CT26^{-CXCL10}-Zellen in 10,7% (3 von 28) der Fälle beobachtet. Lediglich 14,3% (4 von 28) der Tiere zeigten das Wachstum eines Tumors. Demgegenüber standen 75% (21 von 28) der Mäuse, die keinerlei Tumorwachstum aufwiesen.

Die Tumore, die nach der orthotopen Zellimplantation in Balb/c und Rag1^{-/-} Mäusen entstanden, wiesen einen Trend zu unterschiedlichen Volumina auf. So zeigten die immundefizienten Mäuse mit dem *knock out* des Rag1-Gens eine Tendenz zu

größeren Tumoren, als die der Vergleichsgruppe immunkompetenter Balb/c Wildtypmäuse.

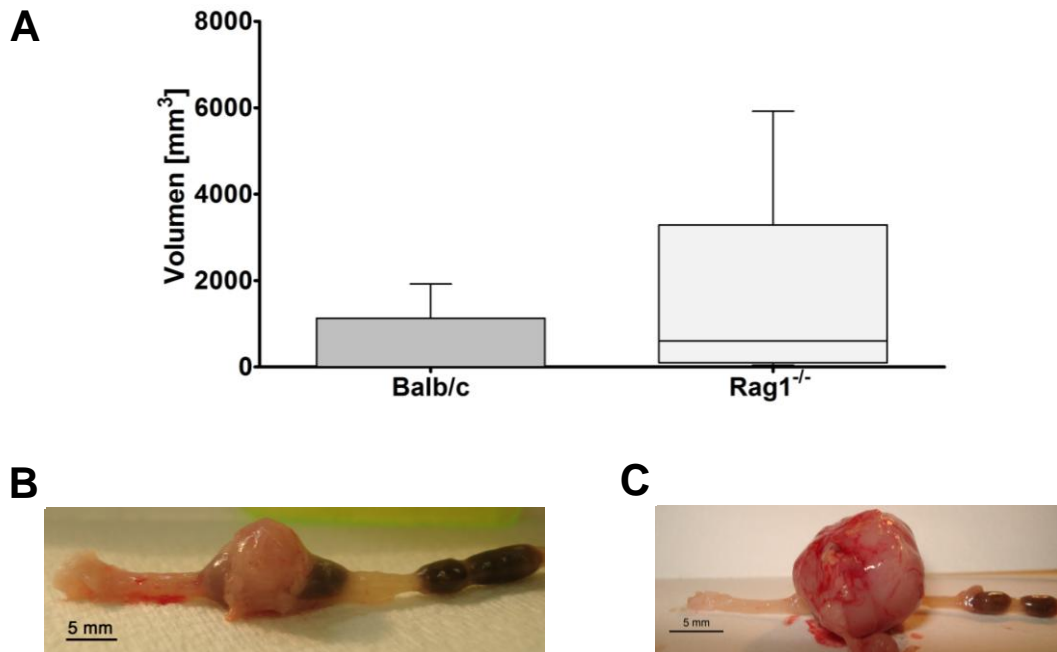


Abbildung 40: Größe der Tumore im orthotopen Modell. Graphische Darstellung der Tumolvolumina aller Tumore (A) und exemplarisch zwei Fotos eines Balb/c (B) und eines Rag1^{-/-} Tumors (C).

Das Tumolvolumen variierte stark, weshalb sich nur ein Trend zu einem höheren Volumen in den immundefizienten Mäusen zeigte, aber kein signifikanter Unterschied in der Tumorgröße. Die beiden exemplarischen Fotos zeigen einen Tumor, der aus CT26^{-CXCL10}-Zellen in einer Balb/c-Maus (vergleiche Abbildung 40 B) und CT26^{-CXCL10}-Zellen in einer Rag1^{-/-}-Maus (vergleiche Abbildung 40 C) entstanden war. Darüber hinaus lässt sich auf den Fotos noch erkennen, dass es trotz der erheblichen Tumormasse zu keiner Blockade des Kolons und dem dortigen Kottransports kam.

Neben dem Tumolvolumen war ebenfalls die Tumorzinzidenz interessant. Um diese festzustellen wurden alle Tiere einer Gruppe ermittelt, die ein Tumorwachstum aufwiesen. Die Gruppen unterteilten sich in die beiden Hauptgruppen Balb/c- und Rag1^{-/-}-Mäuse und in die jeweiligen Untergruppen, die auf die Art der implantierten Zellen verwiesen. Hierbei war ebenfalls zwischen zwei Gruppen zu unterscheiden, den Zellen, welche CXCL10 exprimieren bzw. nicht exprimieren. Die statistische Analyse erfolgte mittels des Chi²-Test mit einem einseitigen p-Wert ohne Stetigkeitskorrektur nach Yates.

Balb/c	ohne Tumor	mit Tumor	Gesamt	Rag1 ^{-/-} Balb/c	ohne Tumor	mit Tumor	Gesamt
+ CXCL10	19	0	19	+ CXCL10	18	2	20
- CXCL10	23	5	28	- CXCL10	21	7	28
Gesamt	42	5	47	Gesamt	39	9	48

$p = 0,0257$ *

$p = 0,0946$

Tabelle 16: Anzahl der Tiere pro Gruppe, die makroskopische Tumore aufwiesen. Balb/c und Rag1^{-/-} Mäuse wurden nach der Implantation von CT26^{+/-CXCL10}-Zellen die Tumore entnommen und ausgezählt.

Die Zellimplantation von CT26^{+CXCL10}-Zellen führte zu keinerlei Tumorstadium in immunkompetenten Balb/c Mäusen. Lediglich CT26^{-CXCL10}-Zellen bildeten Tumore in 17,9% der Balb/c Mäuse (5 von 28) aus. Die statistische Chi²-Analyse zeigte deutlich, dass die Entstehung der Tumore in diesem Versuch vom Fehlen des CXCL10-Gens abhängig war ($p=0,0257$). In den immundefizienten Mäusen dagegen zeigte das Fehlen bzw. Vorhandensein des CXCL10-Gens keinen signifikanten Einfluss auf die Tumorentstehung ($p=0,0946$). Es bildeten sich in diesen Tieren in beiden Untergruppen Läsionen aus. In 10% (2 von 20) der Rag1^{-/-}-Mäuse wuchsen Tumore nach dem Einbringen von CT26^{+CXCL10}-Zellen. Die Implantation von CT26^{-CXCL10}-Zellen führte in 25% der Tiere (7 von 28) zu einer Tumorentstehung.

3.2.2.4.3 CXCL10 Proteinkonzentration im Serum

Im Hinblick auf die spätere Anwendung von Bluttests für die Diagnose von Tumoren im Patienten sollte hier untersucht werden, ob in den Tieren, die einen Tumor ausbildeten, ein Unterschied in der systemischen CXCL10-Proteinkonzentration feststellbar war. Hierzu wurde den Tieren nach Möglichkeit unmittelbar vor der Dissektion Blut entnommen und das Serum bei -80°C gelagert. Die Proteinkonzentration von CXCL10 im Serum der operierten Mäuse wurde mit Hilfe eines CXCL10-ELISA bestimmt.

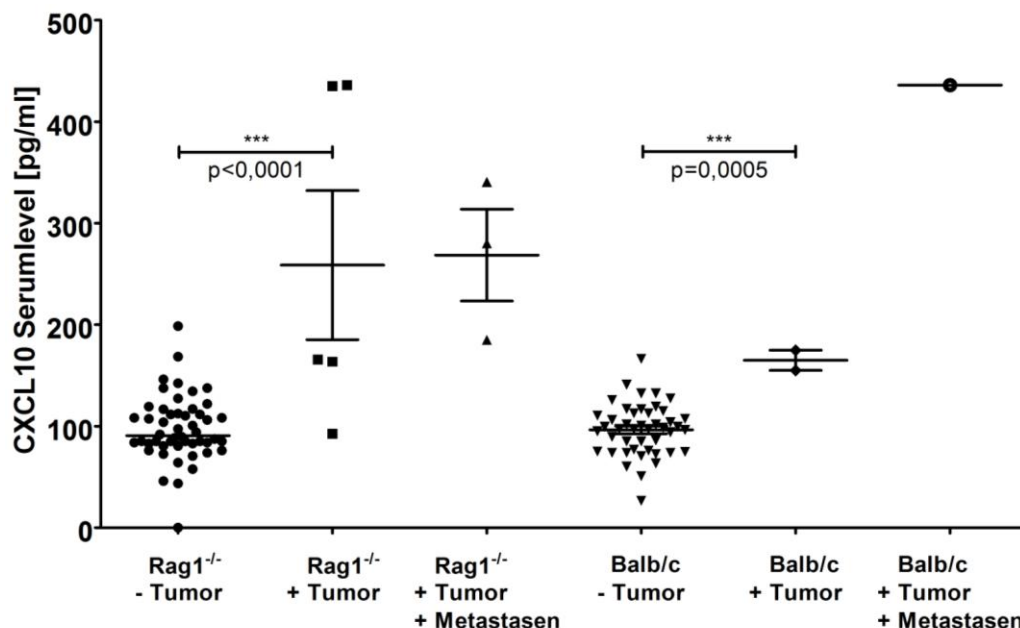


Abbildung 41: CXCL10 Konzentration im Serum der operierten Mäuse. Vergleich der CXCL10 Menge im Serum von Rag1^{-/-}- und Balb/c-Mäusen, die eine Tumorlast trugen oder in denen kein Tumorwachstum festgestellt wurde.

Die Analyse der Serumproben ergab, dass sowohl die immunkompetenten als auch die immundefizienten Mäuse eine erhöhte Menge an systemischen CXCL10 aufwiesen, wenn ein Tumor vorhanden war. In Rag1^{-/-}-Mäusen nahm die CXCL10 Proteinkonzentration im Serum der Mäuse signifikant zu, wenn diese einen Tumor trugen ($p < 0,0001$). Ähnlich war dies bei Balb/c-Mäusen, bei denen ebenfalls systemisch weniger CXCL10 Protein nachgewiesen werden konnte, wenn kein Tumor vorhanden war ($p = 0,0005$). Aufgrund der geringen Anzahl an Tieren, die eine Tumorlast trugen oder zusätzlich noch Metastasen ausbildeten, sind weitere Versuche nötig. Möglicherweise kann bei einer größeren Gruppenzahl anhand der Serumkonzentration nicht nur zwischen dem Vorhandensein bzw. Fehlen eines Tumors unterschieden werden, sondern auch die Differenzierung zwischen metastasiert und nicht metastasiert getroffen werden. Ferner ist es dringend erforderlich Serumproben von CRC-Patienten zu sammeln und auf die Konzentration der CXCL10-Chemokine zu untersuchen. Möglicherweise gibt es beim Menschen ebenfalls einen Zusammenhang.

3.2.2.4.4 Immunfluoreszenzfärbung der intratumoralen CD3⁺ Zellen

In der Arbeitshypothese wurde von einem Zusammenhang der CXC-Chemokinexpression im Tumor und der infiltrierenden T-Zellen ausgegangen. Aus diesem Grund wurden die Tumore von Balb/c-Mäusen mittels Immunfluoreszenz auf die Invasion von CD3⁺-Zellen (T-Zellen) hin untersucht. Dies sollte darüber Aufschluss geben, ob Tumore, die aus implantierten Zellen gewachsen sind, ebenfalls intratumorale Immunzellen aufweisen. Aufgrund der Tatsache, dass sich in immunkompetenten Balb/c-Mäusen keine Tumore aus CT26^{+CXCL10}-Zellen, sondern nur aus CT26^{-CXCL10}-Zellen gebildet hatten, konnte kein direkter Zusammenhang zwischen Menge der infiltrierenden Immunzellen und exprimiertem CXCL10 untersucht werden.

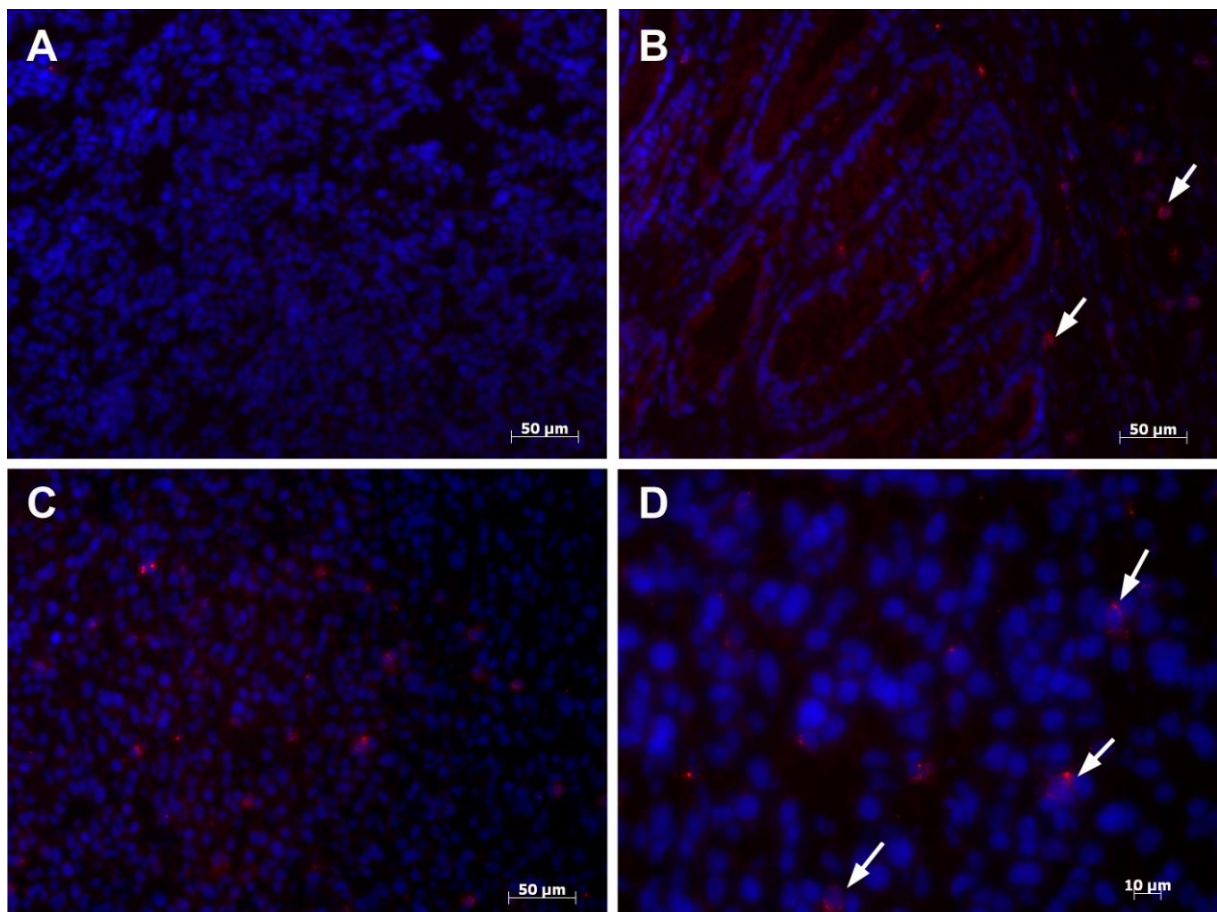


Abbildung 42: Immunfluoreszenzfärbung von CD3⁺-Zellen in Balb/c Kolon- und Tumorgewebe. A: Negativkontrolle (nur sekundärer Antikörper und DAPI); B: CD3⁺-Zellen im Kolon; C: infiltrierende CD3⁺-Zellen im Tumor; D: 5-fache Vergrößerung des Tumors .

Die Negativkontrolle der obigen Abbildung 42 A zeigt keinerlei rote Färbung, was auf eine falsch positive Färbung hindeuten würde. In Abbildung 42 B ist eine deutliche Zellkernfärbung in blau und eine weitere rote Färbung erkennbar, die einzelne Zellen hervorhebt. Bei diesen roten Zellen handelt es sich um CD3⁺-Zellen, die sich im

Normalgewebe des Kolons befinden. Abbildung 42 C zeigt den Tumor einer Balb/c-Maus, der ebenso wie das normale Kolongewebe $CD3^+$ -Zellen aufweist. In Abbildung 42 D sind diese Zellen durch die Vergrößerung und Markierung durch weiße Pfeile noch besser erkennbar. Dies zeigt, dass die $CD3^+$ -Zellen nicht nur im Normalgewebe, sondern auch im Tumorgewebe der immunkompetenten Balb/c-Mäuse auftreten. Im Speziellen ist dies in der amorphen Tumormasse der Fall, die sich aus den implantierten Zellen gebildet hat.

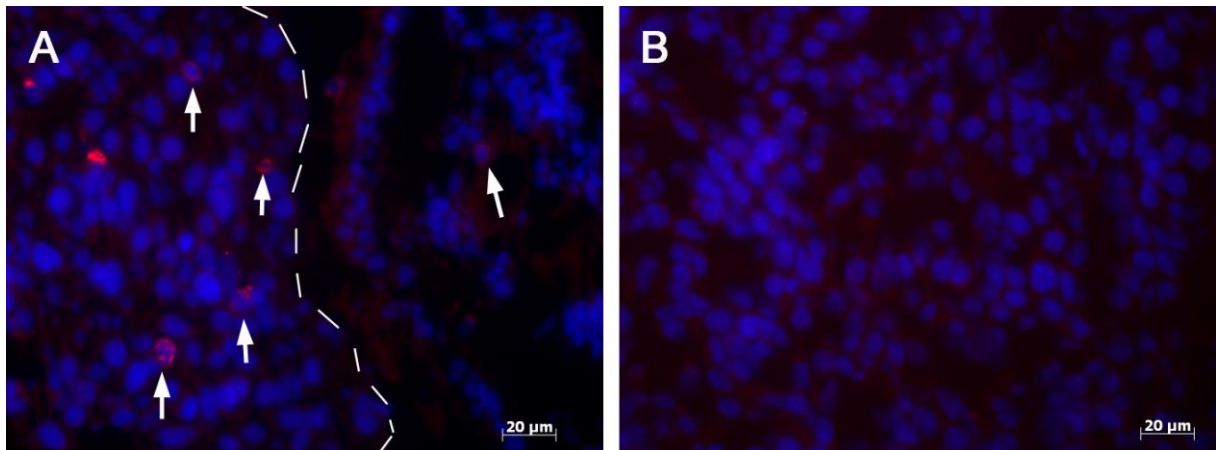


Abbildung 43: Immunfluoreszenzfärbung von $CD3^+$ -Zellen in Tumorgewebe. A: Läsion einer Balb/c-Maus; Pfeile weisen auf die T-Zellen hin, gestrichelte Linie definiert den Übergang von Tumor zu umgebendem Normalgewebe; B: Läsion einer $Rag1^{-/-}$ -Maus als Negativkontrolle.

In der obigen Abbildung wurde das Tumorgewebe einer Balb/c-Maus dem einer $Rag1^{-/-}$ -Maus gegenübergestellt. Die Pfeile in Abbildung 43 A weisen auf $CD3^+$ -T-Zellen hin, die sich sowohl im Tumorgewebe, als auch im Normalgewebe befinden. Die beiden Areale sind durch eine gestrichelte Linie voneinander getrennt, wobei sich der Tumor auf der linken Seite befindet. Diese Immunfluoreszenz zeigt sehr deutlich, dass in den Mäusen, die ein intaktes Immunsystem besitzen, die Tumore von $CD3^+$ -T-Zellen infiltriert werden.

Erwartungsgemäß zeigte sich in Abbildung 43 B lediglich eine leichte Hintergrundfärbung, jedoch keinerlei $CD3^+$ -Zellen. Da $Rag1^{-/-}$ -Mäuse keine reifen T-Zellen ausbilden, kann es folglich auch zu keiner $CD3^+$ -Färbung kommen.

3.2.2.4.5 Identifizierung der intratumoralen Immunzellinfiltrate auf m-RNA Ebene

Durch die Immunfluoreszenzfärbung konnte deutlich gezeigt werden, dass $CD3^+$ -T-Zellen in das Tumorgewebe einwandern. Anschließend sollte untersucht werden, um welche T-Zellsubtypen es sich hierbei handelt. Aufgrund der Tatsache,

dass uns keine Antikörper zur Verfügung standen, die eine verlässliche und eindeutige Färbung zeigten, griffen wir auf die quantitative *real-time PCR* zurück. Hierbei wurden die RNA-Transkripte verschiedener T-Zelluntereinheiten anhand deren relativer Expression im Normal- und Tumorgewebe von Balb/c-Mäusen miteinander verglichen. Da sich in Balb/c-Mäusen ausschließlich Tumore aus CT26^{-CXCL10}-Zellen formiert hatten, konnten auch nur diese analysiert werden. Sie wurden auf die Expression der verschiedenen T-Zell assoziierten Gene, der T-Zellen (CD3 ϵ) im Allgemeinen und der T_H1-T-Zellen (T-bet), T_H2-T-Zellen (GATA3), T_H17-T-Zellen (Rorc) und zytotoxischen T-Zellen (Granzym B) im Speziellen hin untersucht.

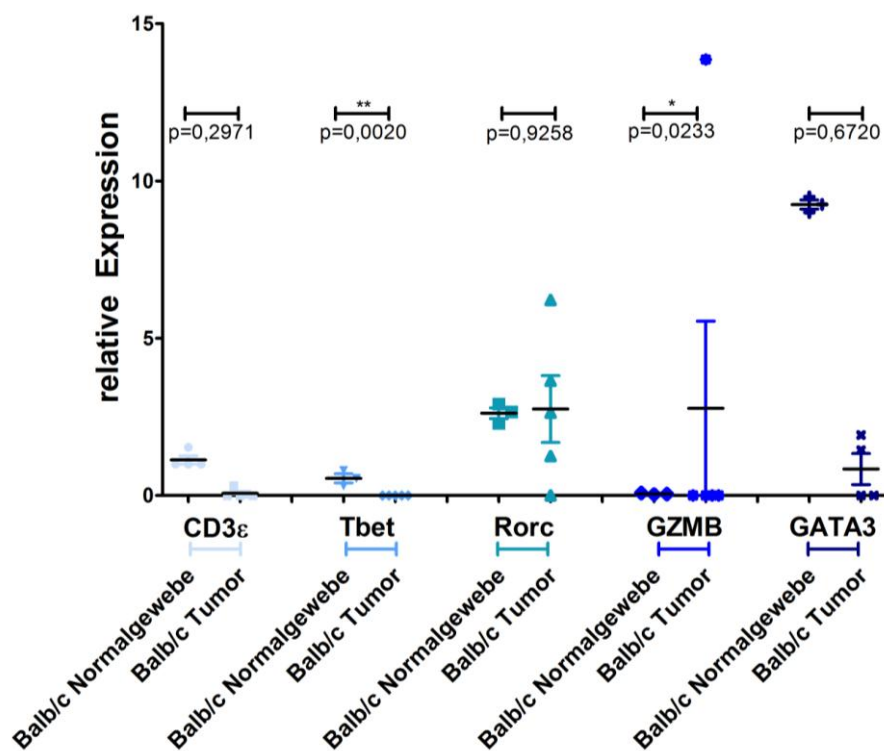


Abbildung 44: Relative Expression der Immunzelltranskripte des orthotopen Mausmodells von Tumoren, die kein zusätzliches CXCL10 exprimieren. Vergleich von Normal- und Tumorgewebe der Balb/c-Mäuse in Bezug auf deren Expression von CD3 ϵ , T-bet, GATA3, Rorc und Granzym B.

Die Analyse zeigte, dass die Transkripte aller Gene, die mit T-Zellsubklassen in Verbindung gebracht werden, in geringen Mengen sowohl im Tumor- als auch dem Normalgewebe nachweisbar waren. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass T-bet (T_H1-T-Zellen) verstärkt im Normalgewebe ($p=0,0020$) und Granzym B (zytotoxische T-Zellen) gehäuft im Tumorgewebe ($p=0,0233$) vertreten ist. Aufgrund der stark limitierten Probenzahl ist es empfehlenswert den Versuch mit weiteren Proben zu wiederholen.

4 Diskussion

Das kolorektale Karzinom dient oftmals als Musterbeispiel für die Bildung und Progression solider Tumore. Dies geht einerseits auf die vergleichsweise gute klinische Zugänglichkeit der kolorektalen Tumore aller Stadien mit Hilfe der Endoskopie zurück (*Lieberman, 2010*). Andererseits zählt das kolorektale Karzinom zu den häufigsten Krebsarten, es stellt die dritthäufigste Krebserkrankung weltweit dar (*Tenesa und Dunlop, 2009*). In Deutschland sowie in den USA belegt es Rang drei der tumorbedingten Todesfälle bei Männern und Frauen. Im Jahr 2014 wird in den USA bei voraussichtlich 71.830 Männern und 65.000 Frauen ein kolorektales Karzinom neu diagnostiziert werden, 26.270 Männer und 24.040 Frauen werden an dieser Erkrankung versterben (*Siegel et al., 2014*).

Durch die Identifizierung somatischer Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen unterschiedlicher Tumorstadien konnte das „Adenom-Karzinom-Modell“ entwickelt werden (*Fearon und Vogelstein, 1990*), um die Entstehung und das Fortschreiten von Dickdarmkrebs auf molekulargenetischer Ebene zu erklären. Mittlerweile wurde dieses Modell allerdings durch ein mehrstufiges Modell parallel ablaufender Wege der Tumorentstehung im Darmtrakt erweitert, bzw. ergänzt (*Kaemmerer et al., 2013; Leggett und Whitehall, 2010; Marisa et al., 2013*). Neben zellautonomen Veränderungen in den Tumorzellen sind in den letzten Jahren vermehrt auch die Interaktionen des Tumors mit dem adaptiven und angeborenen Immunsystem in den Fokus gerückt, so etwa in dem Übersichtsartikel der Autoren Hanahan und Weinberg zu den "Hallmarks of Cancer" (*Hanahan und Weinberg, 2011*). Entzündungsreaktionen können tumorfördernd sein, was insbesondere für chronische Entzündungen des Gastrointestinaltraktes gut belegt ist, während eine adaptive Immunreaktion, vermittelt insbesondere durch Zellen des T_H1-Typs, zu einer effektiven Tumorkontrolle führen kann. Der aktuelle klinische Erfolg der adjuvanten „Immun-Checkpoint“ Therapie, der koinhibitorische Rezeptoren auf T-Zellen als Zielstruktur anspricht, ist ein eindrucksvoller Hinweis auf die anti-tumorale Wirksamkeit der adaptiven Immunantwort (*Lizee et al., 2013*). Wie die Zell-Zell Kommunikation zwischen Tumor und Immunsystem verläuft, und welchen Einfluss dies auf den individuellen Krankheitsverlauf hat, ist noch weitgehend unklar. In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, welche Rolle den interferon-induzierten CXC-Chemokinen CXCL9, CXCL10 und CXCL11 für die

Tumorentstehung im Darmtrakt zukommt. Als Arbeitshypothese wurde postuliert, dass diese Chemokine ein Bindeglied zwischen Tumor und angeborenem Immunsystem bilden. Die Regulation der Chemokinexpression, sowie die möglichen Auswirkungen der veränderten intratumoralen Chemokinausprägung auf die Tumorprogression sollten an Patientenproben, Zelllinien und Mausmodellen untersucht werden.

Die Entscheidung über den anzusetzenden Therapieverlauf wird, den aktuellen klinischen Leitlinien zufolge, hauptsächlich aufgrund der Ergebnisse der TNM-Klassifizierung getroffen (S3 Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft, DGK/AWMF). In diesem Fall wird sowohl die Größe der Tumore (T-Stadium), als auch das Vorhandensein von Lokal- bzw. Fernmetastasen (N- bzw. M-Stadium) berücksichtigt (*Sobin und Fleming, 1997*). Aktuell gültige Behandlungsstandards sehen bei den UICC Stadien I und II lediglich eine chirurgische Tumorresektion vor, während bei fortgeschrittenem und metastasiertem Kolorektalkarzinom eine multimodale Therapie angezeigt ist (*Benson, III et al., 2004; Gunderson et al., 2010*). Allerdings scheint die aktuelle Fassung der TNM-Klassifizierung nicht ausreichend geeignet für eine personalisierte Prognosestellung, so entwickeln 20% der Patienten im UICC Stadium II ein Rezidiv (*Nitsche et al., 2012*).

In der vorliegenden Arbeit wurden Ergebnisse erzielt, welche eine wichtige Rolle der CXC-Chemokinexpression im kolorektalen Karzinom belegen. Von klinischem Interesse ist vor allem der Bezug auf das post-operative Überleben der Patienten (UICC I-IV) und die Vorhersage einer Rezidivbildung bei lokal begrenzten Karzinomen (UICC II). In diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass die Art und Häufigkeit von tumorinfiltrierenden Immunzellen aktuell als neuartiges und hochspezifisches Prognosekriterium bei Kolorektalkarzinomen diskutiert wird, das in Form eines „Immunoscores“ relativ leicht und reproduzierbar klinisch ermittelt werden kann (*Galon et al., 2014*).

4.1 Ausprägung und klinische Bedeutung von CXC-Chemokinen beim kolorektalen Karzinom

4.1.1 Ausprägung von CXC-Chemokinen in Patientenproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle der drei interferon-induzierbaren CXC-Chemokine CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP10) und CXCL11 (ITAC) im kolorektalen Karzinom untersucht. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten eine stark erhöhte Expression von CXCL9, 10 und 11, sowie von Granzym B (GZMB) in Kolonkarzinomen im Vergleich zur normalen Mukosa nachweisen (*Doll et al., 2010; Friederichs et al., 2005; Lin et al., 2007*). Sowohl Granzym B, als auch CXCL9, 10 und 11 zeigen in der hier vorliegenden Arbeit die höchste Genexpression in lokal begrenzten Tumoren (UICC Stadien I und II), während die Expression mit dem weiteren Fortschreiten der Krebserkrankung, insbesondere der Metastasierung, deutlich abnahm. CXCL11 erlaubte als einziges getestetes Transkript eine signifikante Unterscheidung aller Tumorstadien und der Normalschleimhaut. Von einem weiteren kleinen Kollektiv von Patienten konnten sogenannte „gematchte“ Gewebeproben, also Normalgewebe, Primärtumor und eine Lebermetastase aus jeweils einem Patienten, untersucht werden. Hierbei zeigte sich eine deutliche und signifikante Minderung der CXCL11 Expression vom Primärtumor zur jeweiligen Lebermetastase.

4.1.2 Zusammenhang zwischen CXC-Chemokinexpression und Prognose

Mit Hilfe der zuvor erhobenen Befunde zur intratumoralen Expression wurde anschließend die klinische Relevanz der Transkriptmengen von Granzym B, CXCL9, 10 und 11 untersucht. Hierzu wurden Schwellenwerte für die Expression jedes Transkriptes berechnet, die eine Einteilung des Patientkollektivs in zwei Gruppen ermöglichte. Die Expression von CXCL9 und 11 zeigte eine signifikante Verbindung zum postoperativen Gesamtüberleben, sowie zum und rezidivfreien Überleben. Des Weiteren konnte die Kaplan-Meier Analyse Granzym B als Parameter für das rezidivfreie Überleben identifizieren. Im Gegensatz dazu konnte mit Hilfe der Ausprägung von CXCL10 nur in geringem Maße eine Aussage über die Prognose des Patienten getroffen werden. In der Literatur finden sich allerdings Hinweise, dass die CXCL10 Expression mit einer guten Prognose im CRC der Stadien I und II

korreliert (*Jiang, Z. et al., 2010*). Fridman und Kollegen beschrieben unlängst, dass es sich bei CXCL9 und CXCL10 um die Chemokine mit der höchsten Signifikanz handelt, was die positive Prognose des postoperativen Überlebens kolorektaler Karzinompatienten betrifft (*Fridman et al., 2011*). Das kolorektale Karzinoms wurde im Rahmen der internationalen Krebs-Genomatlaskstudie analysiert (*The Cancer Genome Atlas*), hierbei konnte CXCL11 als Marker eines weniger aggressiven Krankheitsverlaufs identifiziert werden (*Cancer Genome Atlas Network, 2012*).

Die hier erzielten Ergebnisse bestätigen eine bedeutsame prognostische Aussagekraft der Expression von CXCL9, 10 und 11, in guter Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, die CXCL9, 10 und 11 als Teil einer "Genexpressionssignatur" für eine günstige Prognose im CRC identifizieren (*Doll et al., 2010; Friederichs et al., 2005; Lin et al., 2007*). Somit konnten die früheren Befunde im Rahmen dieser Arbeit an einem unabhängigen Kollektiv, und mit einer unabhängigen Methode (qRT-PCR) bestätigt werden. Neben den Chemokinen wurde Granzym B (GZMB) als zusätzliches "Signaturtranskript" ermittelt. Dabei handelt es sich um ein entscheidendes Produkt zytotoxischer T-Zellen und NK-Zellen (*Janeway CA Jr, 2001; Lord et al., 2003; Murphy et al., 2009*). Sobald sich das Granzym-B-Protein innerhalb der Tumorzelle befindet, beginnt es mit der Spaltung von pro-Caspasen, was zu einer Aktivierung der Caspasenkaskade führt, die eine Selbstzerstörung der Zelle durch Apoptose induziert (*Susanto et al., 2013*). Die weiteren statistischen Untersuchungen, die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurden, stellten CXCL11 als wichtigsten Prognoseparameter heraus, der in der multivariaten Analyse unabhängig von den etablierten klinischen Parametern war. In dieser Analyse beträgt der Risikoquotient (HR) 3,1 (95% Konfidenzintervall: 1,13-8,34) für die CXCL11-Expression, dies sogar im Vergleich mit dem aktuellen klinischen „Goldstandard“, der TNM-Klassifizierung (*Hermanek, 1995; Lugli et al., 2012; Sawada et al., 2013*). Die Analyse der intratumoralen CXCL11-Expression stellt somit eine ausgezeichnete neuartige Möglichkeit dar, sowohl das postoperative Überleben von Patienten mit Kolorektalkarzinomen aller Stadien als auch das rezidivfreie Überleben von Patienten mit lokal begrenzten Tumoren (Stadium II) abzuschätzen, was anhand der klinischen TNM-Klassifikation bislang nur unzureichend möglich ist (*Nitsche et al., 2011*).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Chemokinexpression je nach Tumorstadium variiert. Nichtsdestotrotz ermöglichte die Analyse der CXCL11

Expression, eine Aussage darüber zu treffen, ob es bei Patienten mit Karzinomen des UICC Stadiums II zu einem erneuten Auftreten der Krebserkrankung in Form von Fernmetastasen kommt.

Das Auftreten von Rezidiven bei CRCs des UICC Stadiums II, ist zurzeit ein großes Problem in der klinischen Behandlung. Karzinome im UICC Stadium II machen etwa 30% aller diagnostizierten Fälle aus (*Nitsche et al., 2012*). Mit der TNM-Klassifizierung ist es nicht möglich, Hochrisikopatienten innerhalb dieser Gruppe zu differenzieren und die gefährdete Untergruppe zu identifizieren. Aus diesem Grund wird weltweit an der Identifizierung von Biomarkern geforscht, die hierzu in der Lage sind (*Johnson et al., 2014; Moore et al., 2014; Nitsche et al., 2012; Vanderstichele und Kodadek, 2014; Yang et al., 2013; Yao et al., 2014*). Gerade die Patientengruppe mit einem erhöhten Rückfallrisiko könnte von einer weiterführenden adjuvanten Behandlung profitieren, die aufgrund der Eingruppierung in UICC II gegenwärtig jedoch nicht angezeigt ist.

4.1.2.1 Produzenten von CXC-Chemokinen und deren Regulation

In verschiedenen Studien wurde die intratumorale Produktion von CXCL9, 10 und 11 den Kolonkarzinomzellen sowie Makrophagen zugeordnet (*Dwinell et al., 2001; Yang et al., 1997; Yeruva et al., 2008; Zhang et al., 1997*). Die eigenen Experimente zeigten, dass alle getesteten Kolonkarzinomzelllinien *in vitro* in der Lage waren, CXCL11 zu exprimieren und sekretieren. Hierzu wurden zur Stimulation die pro-inflammatorischen Zytokine IFN γ und TNF α zugegeben, was zu einer Induktion der Expression führt (*Dwinell et al., 2001; Groom und Luster, 2011; Yang et al., 1997; Yeruva et al., 2008*). Zusätzlich zu den Versuchen mit verschiedenen Zelllinien wurden Gewebeschnitte humaner Tumorproben immunhistochemisch mit einem spezifischen anti-CXCL11 Antikörper gefärbt. Dadurch konnte eine gesteigerte CXCL11 Expression im Tumorgewebe, verglichen mit der umgebenden Normalschleimhaut, nachgewiesen werden. Dies äußerte sich in einer starken basolateralen Membranfärbung in Tumorzellen epithelialen Ursprungs, sowie von vereinzelt Zellen im Tumorstroma, die morphologisch möglicherweise Makrophagen entsprechen. Eine ähnliche basolaterale CXCL11-Lokalisierung wurde für humane Lungenepithelzellen beschrieben (*Porter et al., 2008*). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Menge an mRNA-Transkripten mit der immunhistochemisch detektierten Menge an CXCL11 auf Proteinebene signifikant

korrelierte. Eine mögliche Erklärung der basolateralen Membranfärbung von Tumorzellen, die mit dem anti-CXCL11 Antikörper erzielt wurde, könnte darin begründet liegen, dass CXC-Chemokine lösliche Faktoren sind, die von den produzierenden Zellen sekretiert werden. So wurde beschrieben, dass die Chemokine nach Sekretion noch an die extrazelluläre Matrix der Zellen oder über Proteoglykane an die Zelloberfläche der sekretierenden Zellen gebunden sind, und in dieser Form von T-Zellen erkannt werden können (*Bromley et al., 2008*). Durch die hier durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen konnten Kolonkarzinomzellen als eine Quelle der CXC-Chemokine identifiziert werden. Stromakomponenten, wie Tumor-assoziierte Makrophagen, könnten ebenfalls zur intratumoralen CXC-Chemokinproduktion beitragen. Dadurch, dass die Karzinomzellen selbst dazu in der Lage sind, CXC-Chemokine zu sezernieren, wird eine direkte Interaktion von Karzinomzelle und Zellen, die den Chemokin-Rezeptor CXCR3 tragen, ermöglicht.

4.1.2.2 Auswirkungen der CXC-Expression: Angiostase und Lymphozyten-Infiltration durch Bindung an CXCR3

Die CXC-Chemokine CXCL9, 10 und 11 binden allesamt an den Rezeptor CXCR3, welcher sowohl auf aktivierten CD4⁺ T_H1-Zellen und zytotoxischen CD8⁺ T-Effektorzellen als auch auf Endothelzellen exprimiert wird (*Bromley et al., 2008; Erreni et al., 2009; Groom und Luster, 2011; Sallusto et al., 1998; Syrbe et al., 1999; Vicari und Caux, 2002*). Die Rolle von CXCR3 und seinen Liganden in der Tumorprogression wird aktuell kontrovers diskutiert; während zahlreiche Studien, sowie auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, eine tumorhemmende Funktion belegen, wird auch eine pro-metastatische Funktion von CXCR3 beschrieben. Belege für eine tumor-hemmende Funktion der CXCR3-Liganden finden sich in zahlreichen Veröffentlichungen in internationalen Fachzeitschriften (*Berencsi et al., 2007; Conforti et al., 2010; Enderlin et al., 2009; Hensbergen et al., 2005; Regulier et al., 2001; Yang und Richmond, 2004*).

CXCR3 wird nicht nur auf Immunzellen, sondern teilweise auch auf verschiedenen Krebszellen exprimiert und soll an der Metastasierung von Brustkrebs in die Lunge, sowie bei Melanomen und Lymphknotenmetastasen des kolorektalen Karzinoms beteiligt sein (*Cambien et al., 2009; Kawada et al., 2007*).

Die Arbeitsgruppe um Kawada analysierte verschiedene humane Kolonkarzinomzelllinien. Hiervon exprimierten die Zelllinien HT29 und HCT116 gemäß durchgeführter durchflußzytometrischer Analysen den CXCR3 Rezeptor, wohingegen dies bei den Zellreihen Caco2, DLD1 und SW480 nicht der Fall war. Des Weiteren wurde eine Coexpression der Rezeptoren CXCR4 und CXCR3 in Colo205, HCT116, HT29 und WiDr Zellen nachgewiesen. CXCR7 und CXCR4 waren in SW480 und Caco2 Zellen gemeinsam ausgeprägt. Ausschließlich RKO-Zellen zeigten keine Coexpression von CXCR3 mit CXCR4 oder CXCR7, sondern lediglich die Ausprägung von CXCR3. Weitere Coexpression mit anderen Chemokinrezeptoren wurden nicht untersucht. Ein prometastatischer Effekt durch die Ausprägung von CXC-Rezeptoren ist nicht überraschend. CXCR4 und CXCR7 sind dafür bekannt, dass sie die Neovaskularisation begünstigen (*Mukaida und Baba, 2012*). Zusätzlich ist CXCR4 dazu in der Lage, die Produktion von Wachstumsfaktoren zu fördern und die Immunantwort zu unterdrücken (*Mukaida und Baba, 2012*). CXCR4 steht weiterhin mit der Ausbildung von Fernmetastasen eines Primärtumors des Darms in Verbindung (*Kim, J. et al., 2005; Schimanski et al., 2005*). Demzufolge könnte der von Kawada et al. gezeigte prometastatische Effekt auch auf die tumorfördernden Eigenschaften der coexprimierten Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 zurückzuführen sein.

Die Arbeitsgruppe um Cambien wies eine Ausprägung von CXCR3 auf humanen HT29-Zellen und murinen C26-Zellen nach. Des Weiteren wurde beschrieben, dass die Aktivierung von CXCR3 durch die Bindung an CXCL9, CXCL10 oder CXCL11 invasionsverwandte Eigenschaften in C26-Zellen induziert. Die Ergebnisse lassen sich so zusammenfassen, dass die Ausprägung und Aktivierung von CXCR3 auf Kolonkarzinomzellen *in vitro* mit tumorfördernden Eigenschaften, wie z.B. Proliferation, Überleben und Migration in Verbindung steht (*Cambien et al., 2009*). Diese Ergebnisse stehen allerdings im Gegensatz zu unseren Beobachtungen, so etwa einem Wundheilungsversuch zur Analyse der Zellmigration, der an humanen Kolonkarzinomzelllinien durchgeführt wurde, die laut Literatur den Rezeptor CXCR3 ausprägen (z.B. HT29, HCT116), oder nicht exprimieren (z.B. DLD1). Hierbei wurden die CRC-Zelllinien mit rekombinantem humanen CXCL10 stimuliert, um den Einfluss von CXCL10 auf das Migrationsverhalten der CRC-Zellen zu untersuchen. Es konnte bei keiner der Zelllinien, auch bei den mutmaßlich CXCR3-positiven, eine signifikant

veränderte Zellmigrationsfähigkeit in Anwesenheit von CXCL10 beobachtet werden, im Gegensatz zu den in der Publikation von Zipin-Roitman und Kollegen beschriebenen Befunden. Somit konnte bei keiner der untersuchten CRC-Zelllinien (CaCo2, DLD1, HT29, HCT116 und SW480) ein migrationsfördernder Effekt von CXCL10 beobachtet werden. Die hier vorgestellten Versuche mit murinen CT26-Zellen zeigten ebenfalls keinen Effekt von CXCL10 (siehe Abschnitt 4.2.4.1). Laboreigene Befunde zeigen zudem, dass der Nachweis der CXCR3-Ausprägung auf der Zelloberfläche aufgrund mangelnder Spezifität der kommerziell erhältlichen anti-CXCR3 Antikörper nicht eindeutig ist (*Ochs, 2013*).

Die Gruppe um Cambien injizierte die Zelllinien HT29 bzw. C26 intravenös in die Schwanzvene von immundefizienten SCID bzw. immunprofizienten Balb/c Mäusen (*Cambien et al., 2009*). Einige dieser Tiere erhielten anschließend eine subkutane Injektion des CXCR3 Inhibitors AMG487. Nach Beendigung des Experiments wurden die Tiere untersucht. Es zeigte sich, dass die Gruppe von Tieren, die mit dem Inhibitor behandelt wurden, ein geringeres Ausmaß an Lungenmetastasen aufwies, als Tiere, deren CXCR3 Rezeptor nicht durch AMG487 blockiert wurde. Die pharmakologische Inhibition von CXCR3 hatte allerdings keinen Einfluss auf die Entstehung von Lebermetastasen. Wichtig ist hierbei zu beachten, dass es sich um ein realitätsfernes Modell handelt, da hierbei die Tumorzellen subkutan injiziert werden. Im Gegensatz hierzu findet die Tumorentstehung im orthotopen Modell am realen Tumorsitus statt. Weiterhin ist zu bedenken, dass Immunzellen dazu in der Lage sind, Tumorzellen zu eliminieren. Immunkompetente Balb/c Mäuse besitzen ein vollständiges Immunzellrepertoire. Die eingesetzten SCID Mäuse hingegen besaßen keine funktionellen T- und B-Zellen, allerdings voll funktionfähige NK-Zellen (*Meyerrose et al., 2003*). Insofern kann das reduzierte Tumolvolumen auf die Eliminierung der Tumorzellen durch Zellen des Immunsystems zurückzuführen sein. Granzym B könnte hierbei eine wichtige Rolle spielen, da dies ein entscheidendes Produkt zytotoxischer T-Zellen und NK-Zellen ist (*Janeway CA Jr, 2001; Lord et al., 2003; Murphy et al., 2009*), welches wiederum durch Aktivierung von Caspasen den Zelltod mittels Apoptose herbeiführt (*Susanto et al., 2013*).

In einer weiteren Studie zeigten Zipin-Roitman und Kollegen, dass die Metastasierung durch CXCR3 exprimierende Tumorzellen, vermittelt über den Liganden CXCL10, gefördert wird. Hierbei unterscheiden die Autoren jedoch

zwischen Tumorzellen und dem Tumormikromilieu, welche auf die Bindung von CXCL10 unterschiedlich reagieren. So besitzt das Chemokin im Tumormikromilieu eine tumorhemmende Wirkung, wohingegen es tumorfördernd und transformierend wirkt, sobald es direkt mit den Tumorzellen interagiert (*Zipin-Roitman et al., 2007*). Die Publikation von Zipin-Roitman beschreibt die Analyse von vier primären Zelllinien. Hierbei handelte es sich jeweils um Paare, basierend auf den Primärtumorzellen und Metastasen zweier unterschiedlicher Patienten. Die Ausprägung von CXCR3 zusammen mit CCR6 und CCR7 wurde in allen Zelllinien detektiert. Interessanterweise wurde beschrieben, dass CCR6 die Proliferation und CCR7 die Motilität von Zellen fördert, wohingegen CXCR3 sowohl die Angiostase als auch die Immunantwort unterstützt (*Mukaida und Baba, 2012*). Somit wurden parallel drei Rezeptoren untersucht, von denen ein Rezeptor (CXCR3) tumorhemmende und zwei (CCR6 und CCR7) tumorfördernde Eigenschaften besitzen.

In Übereinstimmung mit den eigenen Befunden zeigen die *in vitro* Versuche von Zipin-Roitman, dass die Stimulation aller vier Zelllinien mit $\text{IFN}\gamma$ zu einer erhöhten Sekretion von CXCL10 führt. Das Zytokin $\text{IFN}\gamma$ wird unter anderem von den tumorinfiltrierenden T-Zellen produziert (*Schoenborn und Wilson, 2007*). Dies steigert simultan die Produktion von CXCL10 und die Expression von CXCR3. Es konnte von Zipin-Roitman allerdings kein Effekt des CXCL10 auf das Tumorwachstum nachgewiesen werden. Es ist möglich, dass die in der Veröffentlichung beschriebene „Promalignität“ von CXCL10 zumindest teilweise auf die Aktivität der coexprimierten Rezeptoren CCR6 und CCR7 zurückzuführen ist. $\text{IFN}\gamma$ wird von T-Zellen bei Entzündungsprozessen produziert, kommt jedoch auch physiologisch im Darmgewebe vor. Dies legt den Schluss nahe, dass sich die Expression von CXCR3 auf Kolorektalkarzinomzellen positiv auf die Produktion von CXCL10 und die daraus resultierende Immunzellinfiltration und Eliminierung von Tumorzellen auswirkt. Dies wiederum würde eher zur Tumorhemmung als zum Tumorwachstum führen.

Zusätzlich zur chemotaktischen Wirkung auf Immunzellen werden die ELR-negativen CXC-Chemokine als antiangiogen beschrieben, da der CXCR3 Rezeptor auch auf Endothelzellen ausgeprägt ist, und dort eine anti-proliferative Wirkung vermittelt (*Vandercappellen et al., 2008*). Diese Angiostase könnte zusätzlich die antitumorale Wirkung verstärken. Durch die Tumorprogression ist es aus Sicht des Tumors nötig, bei Überschreitung eines gewissen Tumolvolumens neue Blutgefäße auszubilden.

Diese Angiogenese dient der Versorgung, um den gesteigerten Bedarf an Nährstoffen und Sauerstoff innerhalb des Tumors zu gewährleisten, kann aber auch der hämatogenen Metastasierung Vorschub leisten. Antiangiogene Interventionen konnten in den letzten Jahren als zielgerichtete Therapien auch beim Kolorektalkarzinom etabliert werden, etwa mit spezifischen anti-VEGF Antikörpern (Avastin, Bevacizumab) (*Bagnasco et al., 2012; Grothey et al., 2008; Luo und Xu, 2014; Saif, 2014; Uysal et al., 2014*).

Basierend auf diesen Befunde sollte in der vorliegenden Arbeit die Blutgefäßdichte mittels CD31-Färbungen (PECAM1) auf Gewebeschnitten in Abhängigkeit der CXC-Chemokineexpression untersucht werden. Es zeigte sich ein Trend zu einer verminderten Blutgefäßdichte bei einer geringen CXCL11 Expression, der Unterschied erreichte allerdings nicht das Signifikanzniveau. Dies deckt sich mit der zuvor publizierten Beobachtung antitumorale Aktivität von CXCL11 im Zusammenhang mit der Rekrutierung von CD8⁺ T-Zellen, aber dem Ausbleiben eines angiostatischen Effekts (*Hensbergen et al., 2005*). Es wurden verschiedene Spleißvarianten des CXCR3 Rezeptors beschrieben (*Furuya et al., 2011*). Die Spleißform CXCR3-B bestimmt die Reaktion von Endothelzellen auf die Stimulation mit CXC-Chemokinen und erlaubt zusätzlich die Bindung des Liganden CXCL4 (*Lasagni et al., 2003*). Die unterschiedliche Expression der verschiedenen Spleißvarianten könnte zu verschiedenen Auswirkungen einer hohen CXC-Chemokinausprägung auf die Vaskularisierung des Tumors führen. Laboreigene Vorbefunde (*Doll; Ochs; Janssen, unveröffentlicht*) zeigen, dass die Ausprägung von CXCR3-A, der „Standardvariante“ des Rezeptortranskriptes (*Lasagni et al., 2003*), in humanen Kolorektalkarzinomen gegenüber Normalgewebe weitgehend unverändert ist. Die Spleißvariante CXCR3-B war dagegen nur in metastasierten Tumoren des UICC Stadiums IV nachweisbar und wird in anderen Tumorstadien sowie in Normalgewebe nicht exprimiert.

4.1.2.3 Konsequenz der CXC-Expression: intratumorale T-Zellinfiltration des T_H1-Typs

Den CXCR3 Liganden wird überwiegend eine angiostatische Wirkung zugeschrieben. Sie bewirken weiterhin das *homing* von CXCR3 exprimierenden T-Zellen ins Tumorgewebe und führen dadurch zu einer Inhibierung des Tumorwachstums (*Erreni et al., 2009; Homey et al., 2002; Mlecnik et al., 2010; Vicari*

und Caux, 2002). Der Rezeptor CXCR3 wird bevorzugt auf aktivierten T_H1-Zellen exprimiert (Groom und Luster, 2011; Liu et al., 2005; Liu et al., 2011) allerdings nicht ausschließlich (Liu et al., 2005; Mendel et al., 1995; Sallusto et al., 1998). Dieser Rezeptor ist zudem auf der Oberfläche von Endothelzellen (Romagnani et al., 2001; Salcedo et al., 2000), NK-Zellen, Monozyten, dendritischen Zellen, Mikroglia (Liu et al., 2005; Liu et al., 2011) zytotoxischen T-Zellen, NKT-Zellen und regulatorischen T-reg- und T_H17-Zellen zu finden (Bromley et al., 2008; Thomsen et al., 2003). CXCR3 befindet sich auf den meisten CD45R0⁺ T-Lymphozyten, wohingegen dieser Rezeptor die höchsten Expressionslevel auf T_H1 und die geringsten auf T_H2 Zellen aufweist. Auf dieser Tatsache beruht die Art der Rekrutierung, von hauptsächlich T_H1 Zellen, durch die CXCR3-Liganden (Sallusto et al., 1998). Die intratumorale T-Zelldichte in soliden Tumoren variiert zwischen unterschiedlichen Patienten allerdings stark.

Aufgrund neuer Befunde wurde postuliert, dass die Dichte an T-Lymphozyten innerhalb des Tumors als zuverlässiger und präziser Prognoseparameter fungieren kann, der das aktuelle TNM-Klassifizierungssystem übertrifft (Galon, J. et al., 2006b; Halama et al., 2009; Mlecnik et al., 2011; Naito, Y. et al., 1998a; Pages et al., 2005; Tosolini, M. et al., 2011a). Eine erfolgreiche und anhaltende antitumorale Immunantwort hängt nicht nur vom *homing* der T-Zellen, sondern auch von deren Differenzierung ab. Dementsprechend wird eine T_H1 CD4⁺ Zellpopulation, die die Formation von CD8⁺/GZMB⁺ zytotoxischen Effektorzellen unterstützt, mit einer guten Prognose assoziiert (Gooden et al., 2011). Andererseits werden T_H2 Zellen und regulatorischen FoxP3⁺ T-Zellen eine immunsuppressive Wirkung nachgesagt. Halama und Kollegen brachten diese Zelltypen mit der Metastasenbildung im kolorektalen Karzinom in Verbindung (Halama et al., 2009).

Betrachtet man somit den Einfluss der T-Lymphozytendichte auf die Tumorentwicklung, so muss zwischen den verschiedenen Subpopulationen unterschieden werden. Patienten, deren Tumorproben einen hohen Anteil an T_H17 Zellen aufwiesen, hatten eine schlechte Prognose im Vergleich zu Patienten, bei denen hauptsächlich T_H1 Zellen nachgewiesen wurden. Dagegen konnte kein Einfluss von T_H2 Zellen auf die Prognose gezeigt werden (Tosolini, M. et al., 2011b). Ein reduziertes Tumorwachstum wird bei Tumoren beobachtet, die beispielsweise T_H1 Zellen oder zytotoxische T-Zellen im Tumorbett aufweisen. Im Gegensatz dazu scheinen T_H17 Zellen das Tumorwachstum zu stimulieren. Dies hängt wiederum vom

Tumortyp ab, da dieser Einfluss je nach Tumorentität unterschiedlich sein kann (*Fridman et al., 2011; Zitvogel et al., 2010; Zitvogel et al., 2011*).

Ungeachtet der im vorigen Abschnitt beschriebenen Möglichkeit einer direkten Interaktion von Chemokin und Karzinomzelle konnten wir keinen promalignen Effekt der CXC-Chemokine beobachten, wie beispielsweise von Kawada et al. und Zipin-Roitman beschrieben (*Kawada et al., 2007; Zipin-Roitman et al., 2007*). Die erhöhte intratumorale Expression dieser Chemokine war dagegen mit einer Rekrutierung spezifischer T-Zellpopulationen ins Tumorgewebe assoziiert, was auf eine erfolgreiche antitumorale Immunreaktion schließen lässt. Eine erhöhte Ausprägung von CXC-Chemokinen korrelierte mit einer hohen Anzahl an zytotoxischen Effektor-T-Zellen ($CD8^+$, $GZMB^+$), sowie $CD4^+$ Helferzellen des T_H1 -Typs. Dieser Befund steht in guter Übereinstimmung mit der Tatsache, dass es sich bei CXC-Chemokinen um ELR^- Chemokine handelt, welche sowohl chemotaktisch auf T-Zellen und natürliche Killerzellen als auch angiostatisch wirken (*Sallusto et al., 1998; Strieter et al., 2005; Syrbe et al., 1999; Thomsen et al., 2003*). Demzufolge werden T-Zellen und natürliche Killerzellen durch die CXC-Chemokine ins Tumorgewebe „gelockt“, speziell die T-Zellsubgruppen der $CD4^+$ T_H1 Zellen und $CD8^+$ zytotoxischen Effektorzellen prägen besonders stark CXCR3 aus, und vermindern im Tumor das Tumorstadium (*Fridman et al., 2011*). Klinisch äußert sich dies durch die bessere Prognose, die bei Patienten mit einer hohen initialen Menge an intratumoralen CXC-Chemokinen, und der mutmaßlich daraus resultierenden Präsenz an zytotoxischen T-Lymphozyten beobachtet wird. Dieser positive Effekt wird vermutlich durch einen Rückkopplungsmechanismus stabilisiert und verstärkt, es kommt zu einer kontinuierlichen Steigerung der intratumoralen CXC-Chemokinmenge. Wie bereits gezeigt, kann die Gabe von rekombinantem $IFN\gamma$ die Karzinomzellen dazu bringen eine erhöhte Menge der CXC-Chemokine zu erzeugen. Das produzierte Zytokin $IFN\gamma$ rekrutiert aktivierte $CXCR3^+$ Effektorzellen, was wiederum eine T_H1 polarisierte T-Zellantwort begünstigt (*Guarda et al., 2007*). In diesem Fall produzieren die infiltrierenden $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen selbst weiteres $IFN\gamma$ (*Agallou et al., 2014; Mosmann et al., 1986; Szabo et al., 2003*), welches wiederum die Kolonkarzinomzellen zu einer vermehrten CXC-Chemokinproduktion anregt. Neben dem hohen Level an CXC-Chemokinen konnte ebenfalls stets eine gesteigerte Granzym B Expression in den untersuchten Patientenproben nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit den Befunden von Mlecnik et al., die besagen, dass die

Expression von Genen, die mit der zytotoxischen antitumoralen Immunantwort in Verbindung stehen, in Patienten ohne Rezidiv stark erhöht war. Bei diesen Genen handelt es sich um Granzym B (GZMB), den Transkriptionsfaktor T-box Protein 21 (T-bet) und das Zytokin $\text{IFN}\gamma$ (Mlecnik et al., 2011).

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, wirkt sich die Expression von CXCL9, 10 und 11 auf die Rekrutierung von T-Zellen aus. Aufgrund der großen Vielfalt an T-Zellen und deren unterschiedlichen Wirkspektren wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, welche T-Zellsubgruppen mit einer erhöhten CXC-Chemokinexpression in Verbindung stehen. Dies geschah durch immunhistochemische Färbungen, sowie die Analyse von Immunzelltranskripten an gefrorenen Tumorproben. Es zeigte sich, dass die Anzahl der zytotoxischen T-Zellen signifikant mit der Menge an CXCL11 korrelierte. Dies konnte sowohl in der Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung von $\text{CD3}^+/\text{CD8}^+$ -Zellen als auch in der relativen Expression des Effektormoleküls Granzym B bestätigt werden. Zusätzlich stand die Anzahl an angefärbten $\text{CD3}^+/\text{CD4}^+$ -Zellen in hochsignifikantem Zusammenhang mit dem Level an exprimiertem CXCL11. Eine gesteigerte Expression des $\text{T}_\text{H}1$ -Markers T-bet, einem Leittranskript dieser Zellpopulation, wurde signifikant in den Tumorgeweben detektiert, die ebenfalls hohe Mengen an CXCL11 aufwiesen. T-bet kontrolliert nicht nur die Differenzierung der $\text{T}_\text{H}1$ -Zellen, sondern lenkt zusätzlich die CXCR3 Expression der CD4^+ -Zellen (Lord et al., 2005). Im Gegensatz hierzu konnte kein Zusammenhang zwischen der Ausprägung der Leittranskripte GATA3 bzw. RORC ($\text{ROR}\gamma\text{t}$) und der Menge an CXCL11 nachgewiesen werden. Bei GATA3 und $\text{ROR}\gamma\text{t}$ handelt es sich um typische Transkriptionsfaktoren von $\text{T}_\text{H}2$ Zellen, bzw. von pro-inflammatorischen $\text{T}_\text{H}17$ T-Zellen.

Eine weitere wichtige T-Zell Subklasse stellen die regulatorischen T-Zellen dar. Sie sind dazu in der Lage, eine lokale Antitumorantwort nach Infiltration des Tumors zu unterdrücken, und stehen aus diesem Grund mit einer schlechten Prognose in Verbindung (Anz et al., 2011). Die vorangegangenen Untersuchungen zeigten keine Korrelation zwischen der Anzahl an FOXP3^+ regulatorischen T-Zellen (T_regs) und CXCL11. Es konnte kein Unterschied in der Menge an FOXP3^+ Zellen zwischen den beiden Patientengruppen festgestellt werden, auch die FOXP3 -Expression auf mRNA Ebene war nicht signifikant unterschiedlich. Die so erzielten Befunde lassen

sich in Übereinstimmung mit Literaturbefunden bringen, wonach CXCR3 präferentiell auf T_H1 T-Zellen präsentiert wird (*Liu et al., 2005*).

Es weisen alle hier durchgeführten Untersuchungen darauf hin, dass CXCL11 als positiver Prognoseparameter angesehen werden kann. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass keine Assoziation zwischen der Anwesenheit immunsupprimierender T-Zellen (T_{regs}), die mehrfach als tumorfördernd beschrieben wurden, und CXCL11 beobachtet werden konnte. Die Verbindung zwischen erhöhten intratumoralen CXCL11 Mengen und einer guten Prognose ist somit vermutlich auf die CXCR3 spezifische Rekrutierung von T-Zellen ins Tumorgewebe zurückzuführen. Diese treibt eine antitumorale Immunantwort des T_H1 T-Zelltyps voran. In guter Übereinstimmung dazu steht die Studie von Berencsi und Kollegen, die die Migration zytotoxischer T-Zellen eines CRC Patienten gegen autologe Krebszellen *in vitro* untersuchten. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Zellmigration durch den auf T-Zellen exprimierten CXCR3 Rezeptor sowie durch von Tumorzellen produziertes CXCL11 gesteuert wird (*Berencsi et al., 2007*).

Als weiterer Indikator für die gute Prognose von CRC Patienten wurde eine hohe Expression von CXCL9 und CXCL10 ermittelt, welche mit der Rekrutierung von CD8⁺ Gedächtnis T-Zellen mit einem spezifischen T-Zellrezeptorreperoire assoziiert wird (*Mlecnik et al., 2010*). Nichtsdestotrotz gibt es möglicherweise eine beachtliche Heterogenität der Chemokin/T-Zellrezeptorpaare in einzelnen Tumoren, so dass auch andere Chemokinrezeptoren neben CXCR3 im Einzelfall von Bedeutung sein können.

Wie bereits erwähnt haben CXC-Chemokine eine antitumorale Wirkung, die sich neben einem antiangiogenen Effekt auch in der Fähigkeit zur Rekrutierung von T-Zellen darstellt. In frühen Tumorstadien zeigte sich eine Hochregulation von CXC-Chemokinen. Mögliche Ursachen für diese hohen Mengen an CXC-Chemokinen können Entzündungsprozesse im Tumor, die Stimulation durch nekrotische Tumorzellen oder Barriere-defekte im Darmtumor sein. Mit zunehmendem Schweregrad der Tumorerkrankung ist eine Abnahme an intratumoralen CXC-Chemokinen zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass ein essentieller Schritt in der Tumorentwicklung die Unterdrückung der CXC-Chemokinproduktion darstellt und dies zur Malignität des Tumors führt. Somit könnte ein Selektionskriterium für eine Zunahme des Tumorschweregrads in der Herabregulation bis hin zum Ausschalten

der Chemokinexpression zu finden sein. Erreichen lässt sich dies beispielsweise durch epigenetische Mechanismen oder somatische Mutationen. Denkbar ist, dass diese Fähigkeit vom Tumor erworben werden muss, bevor dieser dazu in der Lage ist zu metastasieren und aggressiv zu wachsen. Im Rahmen der durchgeführten Experimente mit Tumorproben in der *ex vivo* Organkultur zeigte sich, dass die Tumore nicht die Fähigkeit zur Chemokinproduktion verloren haben, sondern diese unterdrücken, da sie durch Stimulation wieder zur Chemokinproduktion angeregt werden konnten. Insofern scheint die Unterdrückung der Chemokinexpression transient und somit reversibel zu sein, was einen Angriffspunkt für künftige Therapien darstellen kann.

Neben der Unterdrückung der CXC-Chemokinexpression durch den Tumor kann auch auf anderen Funktionsebenen eine antitumorale Immunantwort unterdrückt werden. Das *homing* der T-Effektorzellen können Krebszellen aktiv inhibieren. Dies geschieht beispielsweise durch die posttranslationale Neutralisierung der Chemokine durch Nitrierung (*Molon et al., 2011*). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchungen zeigten frisch resezierte Explantate aus nicht vorbehandelten humanen Kolorektalkarzinomen, deren mRNA Expression von CXCL11 über dem Schwellenwert lag, eine konstitutive Sekretion von CXCL11. In früheren Studien wurde die Expression von CXCL10, nicht jedoch von CXCL9 und CXCL11, in kolorektalen Karzinomzellen und Makrophagen, verstärkt entlang der invasiven Tumorfront mit einer hohen Menge an T-Zell Infiltrat, detektiert (*Musha et al., 2005*). Wie bereits aufgeführt, wurde in einer weiteren Studie dagegen mit Hilfe einer organotypischen kolorektalen Zellkultur die Expression von CXCL11 nachgewiesen. Es gelang hier nicht nur der Nachweis der Produktion von CXCL11 durch die Tumorzellen, sondern auch der biologischen Aktivität des Chemokins. Dieser Nachweis erfolgte über die chemotaktische Wirkung des CXCL11 auf autologe T-Zellen (*Berencsi et al., 2007*).

Die Regulation der Infiltration von T-Lymphozyten in solide Tumore des Kolon oder anderer Entitäten bleibt schlecht definiert. Allerdings hat die Menge an T-Zellen innerhalb des Tumorgewebes einen bedeutenden Einfluss auf die Prognose. Die infiltrierenden T-Lymphozyten werden hauptsächlich in der Peripherie solider Tumore gefunden, aber auch in Fernmetastasen (*Boissonnas et al., 2007; Galon, J. et al., 2006a; Weishaupt et al., 2007*). Dies ist ein weiterer Grund, warum die Chemokine

CXCL9, 10 und 11 in dieser Arbeit von besonderem Interesse sind. Die Liganden des CXCR3 wirken chemotaktisch auf T-Zellen und können diese Zellen somit ins Tumorgewebe führen. Dies spiegelt sich ebenfalls in der gesteigerten Anzahl an CD3⁺-Zellen wieder, welche im Tumorgewebe der Patienten mit hohen initialen Mengen an CXCL9, 10 und 11 zu finden sind.

4.2 Die Rolle von CXC-Chemokinen in der intestinalen Tumorgenese: Befunde aus präklinischen Mausmodellen

Die Maus ist ein wichtiger Modellorganismus in der biomedizinischen Forschung, sie findet in der präklinischen Krebsforschung breite Anwendung. Der Einsatz von Mausmodellen erlaubt es, kausale Zusammenhänge zu erheben, während Befunde, die retrospektiv an Patientengewebe erhoben und mit dem klinischen Verlauf verglichen werden, nur korrelativer Natur sind. Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten mit Hilfe von Mausmodellen die Bedeutung von CXCR3 und seiner Liganden auf die Tumorgenese. Die Mehrheit dieser Versuche ließ auf eine antitumorale Wirkung der CXCR3-Liganden schließen. So konnte durch die Xenotransplantation humaner Melanomzellen in immundefiziente Mäuse eine tumorhemmende Wirkung von dem durch die Tumorzellen exprimierten CXCL10 nachgewiesen werden (*Yang und Richmond, 2004*). Hierbei spielte die Bindung von CXCL10 an dessen Rezeptor CXCR3 eine entscheidende Rolle. CXCL10 Mutanten, die nicht mehr dazu in der Lage waren an den Rezeptor zu binden, verloren ebenfalls ihre antitumorale Wirkung. Ein weiteres Melanommodell zeigte ebenfalls eine antimaligne Wirkung der Rezeptor-Liganden-Bindung von CXCR3-CXCL10. In diesem Modell wurden isogene B16 Mausmelanomzellen verwendet, welche die Produktion von CXCL10 durch die Stimulation des TLR3-Rezeptors (*toll like receptor 3*) auslösten. Es wurde eine antitumorale Wirkung beobachtet, welche durch die Bindung von CXCL10 an CXCR3 vermittelt wurde (*Conforti et al., 2010*). Auch der Transport von CXCL10 in solide Tumore mittels viraler Vektoren zeigte einen antitumoralen Effekt (*Enderlin et al., 2009; Regulier et al., 2001*).

Einen anderen Ansatz verfolgte eine Forschergruppe um Wang et al., die ein chimäres Chemokin kreierte. Dieses entstand biotechnologisch durch die Substitution des N-terminalen und N-Loop Bereichs von CXCL10 durch den von CXCL11. Es wurde zur Behandlung von Mäusen eingesetzt. Dieses Fusionsprotein wirkte sich nach subkutaner Injektion von CT26-Zellen ebenfalls negativ auf die

Tumorgenese aus. Nach Gabe der CXCL10-11 Chimäre kam es zu einer Rekrutierung von CXCR3⁺ T-Zellen in den Tumor. NK-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen blieben hierbei unverändert (*Wang et al., 2010*).

Im Gegensatz zu den Befunden, die einen antitumoralen Effekt der CXCR3-Rezeptor-Liganden Interaktion nahelegen, stehen vor allem zwei Studien. Die Blockade des CXCR3 Rezeptors durch einen *small molecule inhibitor* führte nach der intravenösen Injektion von Kolonkarzinomzellen in Mäuse zu signifikant weniger Lungenmetastasen, nicht aber weniger Lebermetastasen (*Cambien et al., 2009*). Ebenso reduzierte diese Behandlung das Auftreten von Lungenmetastasen im Brustkrebsmodell (*Walser et al., 2006*). Zur Beurteilung des Beitrags von CXCR3 zur Entstehung von Hautkrebs wurde das murine *Cxcr3*-Gen genetisch invalidisiert (*Winkler et al., 2011*). Der Verlust von *Cxcr3* reduzierte die Häufigkeit von Hauttumoren im chemisch induzierten DMBA/TPA-Modell. Demnach unterstützt CXCR3 die epidermale Tumorgenese durch die T-Zell vermittelte Induktion epidermaler Proliferation. Allerdings variiert dieser Beitrag von T-Zellen, abhängig von genetischer Mauslinie und Dosis an eingesetztem TPA (*Winkler et al., 2011*). In Übereinstimmung damit bewirkte eine erzwungene Expression von CXCL10 in Xenotransplantaten humaner Melanome sowie von CXCL10 und CXCL9 in Transplantaten von Burkitt's Lymphomen ein reduziertes Tumorwachstum in immundefizienten Mäusen (*Sgadari et al., 1996; Sgadari et al., 1997*). Dies lässt auf eine angiostatische Wirkung schließen, da diesen Mausmodellen die adaptive Immunität fehlt.

4.2.1 Tumorlast transgener Mausmodelle in Korrelation zur intratumoralen CXC-Chemokinexpression

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression der CXC-Chemokine in verschiedenen Mausmodellen untersucht. Von Bedeutung ist, dass viele der häufig eingesetzten Mauslinien eine natürliche Nullmutation für *Cxcl11* tragen (*Sierro et al., 2007*). Der Standard-Mausstamm C57/Bl6 trägt eine Punktmutation und eine Einzelbasendeletion, was zu einem *frame shift* im Leserahmen und zur Entstehung eines verfrühten Stoppkodons im *Cxcl11* Gen führt. Aus diesem Grund sind C57/Bl6 Mäuse de facto *Cxcl11* defizient, können jedoch weiterhin auf injiziertes *Cxcl11* reagieren (*Campanella, G. S. et al., 2008; Campanella, G. S. V. et al., 2008; Groom*

und Luster, 2011). Den transgenen Mausmodellen, die in dieser Doktorarbeit untersucht wurden, lag der genetische Hintergrund C57/Bl6N zugrunde. Daher konzentrierten sich die Untersuchungen auf die Rolle von Cxcl9 und Cxcl10, während Cxcl11 ausgeschlossen wurde. Hierfür standen drei bereits etablierte genetisch definierte Linien zur Verfügung. Alle Mausstämme entwickeln spontan Läsionen im Darm. Die Apc (Apc^{1638N/wt}) Mäuse wurden durch einen *knock in* im Tumorsuppressorgen Apc (*adenomatous polyposis coli*) generiert (Fodde et al., 1994). Dieses Mausmodell simuliert das hereditäre FAP-Syndrom beim Menschen. Das am C-terminus deletierte Apc-Protein wird in geringen Mengen exprimiert und hat noch eine residuale geringe Hemmwirkung auf den kanonischen Wnt-Signalweg. Diese Tiere entwickeln etwa ab dem zehnten Lebensmonat fünf bis sechs Tumore, überwiegend im Dünndarm (Fodde et al., 1994; Janssen et al., 2006). Ras (pVillin-Kras^{V12G}) Mäuse hingegen wurden durch eine Mutation der Aminosäure Glycin zu Valin im Codon 12 des humanen Protoonkogens KRAS generiert. Da diese Mutation unter Kontrolle des murinen Villin-Promotors steht, wird diese onkogene Form des KRAS lediglich im Darmepithel exprimiert. Durch die Expression des onkogenen Kras im Darmepithel entwickeln sich nach 20 Monaten durchschnittlich zwei bis drei Tumore (Janssen et al., 2002). Nach Kreuzung von Apc und Ras Mäusen wurden „RasApc“ (pVillin-Kras^{V12G}xApc^{1638N/wt}) Mäuse erzeugt. Die Kombination dieser beiden Mausmodelle führte zu einer drastischen Erhöhung der Tumorgenese und Sterblichkeit dieser Tiere. Die Ausprägung von onkogenem Kras in Verbindung mit mutiertem Apc äußerte sich in der Ausbildung von durchschnittlich 30 Tumoren innerhalb der ersten sechs Lebensmonate, sowie stark erhöhter Mortalität (Janssen et al., 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass in RasApc Mäusen, die spontan Darmkrebs entwickelten, die intratumorale Menge an Cxcl9 und Cxcl10 signifikant verändert war. Es handelt sich hierbei um ein genetisches Mausmodell, das aggressive und überwiegend invasive Adenokarzinome entwickelt. Diese Mäuse zeigten eine geringere intratumorale Cxcl9 und Cxcl10 Expression als die einzeltransgenen Mauslinien, die hauptsächlich benigne Adenome und nur selten Adenokarzinome entwickeln. Somit steht eine reduzierte Ausprägung von CXCL9 und CXCL10 im Tumorgewebe im Zusammenhang mit einer Zunahme von Tumorwachstum und Tumorprogression, sowie einer daraus folgenden erhöhten Sterblichkeit. Dies bedeutet, dass die CXC-Chemokine möglicherweise eine evolutionär konservierte

Rolle in der Tumorentstehung aufweisen, und bestätigt ihre Relevanz als potentielle Biomarker in der Diagnostik.

Lediglich in den überwiegend benignen Tumoren von Apc-Mäusen, nicht aber in den anderen Modellen, zeigte sich eine signifikante Senkung von Granzym B. Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) exprimieren Granzym B (*Janeway CA Jr, 2001; Lord et al., 2003; Murphy et al., 2009*), weshalb eine Reduzierung der Granzym B Expression in den Tumoren auf eine Absenkung der Anzahl an intratumoralen zytotoxischen T-Zellen hindeutet. Laboreigene Befunde bestätigen diese Vermutung, so wurde in Tumoren aus Apc Mäusen tatsächlich eine Reduktion von CTLs im Vergleich zum umliegenden Normalgewebe nachgewiesen (*Ochs, 2012*). Untersuchungen an Lungenkarzinomzellen zeigten, dass diese ihre erhöhte PI-9 (Proteinase Inhibitor-9) Menge dazu verwenden, sich vor der Granzym B vermittelten Zytotoxizität zu schützen (*Soriano et al., 2012*). Möglicherweise ist dies ebenso der Fall bei den Tumorzellen von Apc-Mäusen, der experimentelle Nachweis steht allerdings noch aus.

4.2.2 Regulation der CXC-Chemokinproduktion und deren Ursprung

Die intratumorale Absenkung der Chemokine CXCL9 und 10 im Vergleich zum Normalgewebe deutet auf einen Zusammenhang mit der Tumorprogression und der tumorbedingten Sterblichkeit der betroffenen Mäuse hin. Um zu klären, ob die Tumore die Fähigkeit, diese Chemokine zu produzieren, dauerhaft oder nur vorübergehend eingebüßt haben, wurden Stimulationsversuche in einer *ex vivo* Organkultur durchgeführt, analog zu den Experimenten mit Patientenproben. Die Versuche mit explantiertem frischen Gewebe verschiedener transgener Mausmodelle zeigten die gleichen Tendenzen wie die zuvor durchgeführten Versuche an humanen Proben. Es konnte grundsätzlich die gleiche Empfindlichkeit in Bezug auf die Zytokinstimulation in murinen intestinalen Tumorproben beobachtet werden. Hierbei ist zu erwähnen, dass die initialen Chemokinlevel niedriger waren als die der humanen Tumorproben. Nichtsdestotrotz waren sowohl Tumorproben humanen als auch murinen Ursprungs nach Stimulation mit Zytokinen in der Lage, CXC-Chemokine zu sekretieren. Die Zugabe von IFN γ und TNF α zum Kulturmedium bewirkte in Tumoren aus allen genetisch definierten Linien (Apc, Ras und RasApc) eine signifikante Steigerung der CXCL10 Sekretion. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Tumore, ungeachtet des Stadiums ihrer Aggressivität, auf eine Stimulation mit

IFN γ und TNF α mit einer gesteigerten CXCL9 und CXCL10 Expression reagieren. Dies lässt weiterhin vermuten, dass Tumorzellen mit zunehmender Malignität die Produktion dieser Chemokine transient herabregulieren. In den drei untersuchten transgenen Mausmodellen ist somit kein dauerhafter Verlust dieser Fähigkeit, etwa durch somatische Mutation oder epigenetische Effekte, eingetreten. Dies zeigt, dass trotz sehr niedriger initialer intratumoraler Ausprägung von CXCL9 und CXCL10 die Tumore zur Chemokinproduktion angeregt werden können. Die Erkenntnis, dass Tumore aus Maus und Mensch stimuliert werden können, um diese Chemokine selbst in gesteigerten Mengen zu produzieren, könnte zukünftig eine Option zur Entwicklung bzw. Optimierung der Immuntherapie von Patienten mit Kolorektalkarzinomen darstellen.

4.2.3 CXC-Chemokinausprägung in Mausmodellen: Zusammenhang von Angiostase und Rekrutierung von T-Lymphozyten

Wie bereits ausgeführt, ist die Gruppe der CXC-Chemokine dafür bekannt, die Neovaskularisierung zu hemmen und simultan die Immunantwort zu fördern (*Mukaida und Baba, 2012*). Diese Eigenschaften hemmen die Tumorprogression und stellen einen Vorteil für den Patienten dar. Um einen Eindruck der intratumoralen Infiltration durch T-Zellen zu gewinnen und erste Anhaltspunkte über die Art der infiltrierenden T-Zellen zu sammeln, wurde eine qRT-PCR Analyse durchgeführt. Hierbei wurden Tumor- und Normalgewebe von Ras, Apc und RasApc Mäusen untersucht, und die intratumoralen Immunzelleinfiltate mit Hilfe von Leittranskripten auf m-RNA Ebene betrachtet. Es wurde die relative Expression der Transkripte von T-Zellen im allgemeinen (Cd3e) sowie von T_H1-T-Zellen (Tbet-), T_H2-T-Zellen (Gata3), T_H17-T-Zellen (Rorc) und zytotoxischen T-Zellen (Gzmb) analysiert. Da diese Transkripte zum Teil nicht ausschließlich in den beschriebenen T-Zellpopulationen nachweisbar sind, stellt diese Form der Analyse naturgemäß nur eine erste Näherung dar.

In den Gewebeproben der RasApc Mäuse konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression der verschiedenen T-Zelltranskripte festgestellt werden. Wie zuvor beschrieben, zeigte sich in RasApc Mäusen eine Reduktion der Menge an CXC-Liganden im Tumorgewebe. Ein reduziertes CXC-Niveau innerhalb des Tumors könnte somit zum Ausbleiben der T-Zellrekrutierung und zur Hemmung einer antitumoralen Immunantwort führen. Dies korreliert wiederum mit dem drastischen

Phänotyp dieser transgenen Mauslinie, der sich durch ein rapides Voranschreiten der Tumorentwicklung und dadurch einer stark reduzierten Lebensspanne auszeichnet (*Janssen et al., 2006*). Laboreigene Befunde konnten zeigen, dass die hier untersuchten transgenen Mausmodelle für Darmkrebs tatsächlich vom adaptiven Immunsystem stark beeinflusst werden, da der Tumorphänotyp in T/B-Zell-defizienten Tieren signifikant verschlechtert war (*Ochs, 2012*).

Betrachtet man Mäuse, die lediglich das onkogene Kras exprimieren, ließ sich ein Unterschied in den gemessenen Transkripten zeigen. Die Analyse von Tumor- und Normalgewebe der Ras Mäuse zeigte, dass die relative Expression des T-bet Transkripts in Tumoren signifikant ($p=0,0210$) reduziert war. Diese Tiere entwickeln nach 20 Monaten einen gemäßigten Phänotyp mit im Durchschnitt zwei bis drei Tumoren (*Janssen et al., 2002*). Allerdings erlaubt dieser Befund keine weiteren Schlüsse. Hierzu müsste eine zusätzliche Quantifizierung der T_H1-Zellen in Ras-Tumoren durchgeführt werden.

Zusätzlich wurden die Expressionsmuster von T-Zellen und deren Subpopulationen in einzel-transgenen Apc Mäusen untersucht. Auffällig war hierbei, dass es zu einer drastischen Reduzierung der T-Zelltranskripte (CD3 ϵ) kam ($p=0,0017$). Phänotypisch zeigt sich in diesem Tiermodell eine Entwicklung von fünf bis sechs Tumoren ab einem Alter von 10 Monaten (*Fodde et al., 1994; Janssen et al., 2006*). Es kam innerhalb des Tumorgewebes zu einer verminderten Expression von sowohl ROR γ t (T_H17 T-Zelltranskript) ($p=0,0102$) als auch T-bet (T_H1 T-Zelltranskript) ($p=0,0239$). In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass die T-Lymphozytendichte mit einer Minimierung der frühen Metastasierung und der Abwesenheit von Rezidiven bei CRC-Patienten korreliert (*Pages et al., 2005*). Betrachtet man allerdings den Einfluss der T-Lymphozytendichte auf die Tumorentwicklung, so muss zwischen den verschiedenen Subpopulationen unterschieden werden, wie bereits an anderer Stelle ausgeführt. Parallel zu den Befunden aus Patienten ist es möglich, dass sich die tumorhemmende Wirkung der T_H1 Zellen durch die tumorfördernde Wirkung der T_H17 Zellen in den Apc-Tumoren neutralisiert. Zusätzlich lag im Tumorgewebe weniger Granzym B (zytotoxisches T-Zelltranskript) vor als im Normalgewebe. Es handelt sich hierbei um einen Interferon- γ induzierten Faktor, der mit einer guten Prognose im kolorektalen Karzinom in Verbindung gebracht wird (*Naschberger et al., 2008*). Dies würde wiederum für eine geförderte Tumorprogression sprechen, da nur

wenige zytotoxische T-Zellen das Tumorbett infiltrieren. Allerdings ist es schwierig, nur anhand des Vergleichs der relativen Expression verschiedener T-Zelltranskripte zwischen Normal- und Tumorgewebe eine stichhaltige Aussage zu treffen. Aus diesem Grund wurden weiterführende Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz und FACS Analyse durchgeführt (Ochs, 2012).

4.2.4 Hat die CXC-Chemokinexpression einen kausalen Einfluss auf die Tumorentstehung? Etablierung eines orthotopen Mausmodells

Um überprüfen zu können, ob CXCL9, 10 und 11 eine kausale Rolle in der Tumorgenese und Metastasierung des kolorektalen Karzinoms spielen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein orthotopes Mausmodell entwickelt. Hierfür wurde CXCL10 als primärer Ligand von CXCR3 (Groom und Luster, 2011) ausgewählt. Die Auswirkung einer vermehrten CXCL10 Expression wurde mittels immunkompetenter Mäuse im orthotopen Modell untersucht. Hierbei wurden stabile, CXCL10 exprimierende, isogene Tumorzellen in den distalen Kolon der immunkompetenten Mäuse implantiert.

4.2.4.1 Ermittlung einer geeigneten Zelllinie für die orthotope Implantation

Es wurden drei verschiedene murine Zelllinien untersucht, wobei die Zellen möglichst geringe initiale Mengen an CXCL10 besitzen sollten. Des Weiteren war es von Vorteil, wenn diese endogene Expression auch durch Zytokinstimulation der Zellen nicht erhöht werden konnte. Die Zelllinien Mode-K (Vidal et al., 1993) und CMT93 (Melcher et al., 1998) wurden aus Mäusen mit einem C57/Bl6 Hintergrund gewonnen. Transgene Mauslinien mit einem C57/Bl6 Ursprung besitzen eine natürliche Nullmutation des Cxcl11 Gens. Innerhalb des gewählten Versuchsaufbaus wurde daher CXCL10 zur näheren Untersuchung ausgewählt. Während Mode-K Zellen als immortalisierte nicht-Tumorzellen ungeeignet erschienen, wurde die Zelllinie CMT93 aufgrund der Tatsache ausgeschlossen, dass hier die Gabe von IFN γ eine signifikante Steigerung des CXCL10-Niveaus bewirkte. Eine dritte Zelllinie (CT26, Hintergrund Balb/c) wies geringe endogene Mengen an CXCL10 auf, auch die Stimulation mit IFN γ führte zu keiner signifikanten Erhöhung. Weitere Untersuchungen zeigten, dass weder die Stimulation durch den TLR-Agonisten LPS (Lipopolysaccharide), noch die Kombination von IFN γ und TNF α die Produktion von CXCL10 durch CT26-Zellen stimulierte. Lediglich die alleinige Gabe von TNF α , bzw.

von IL1 α führte zu einer messbaren CXCL10 Sezernierung, die sich allerdings bei der Gegenüberstellung aller drei Zelllinien als geringfügig erwies. Aufgrund dessen wurden diese Zellen zur Zellimplantation im orthotopen Modell präferiert. Um einen möglichen Einfluss von CXCL10 auf das Migrations- und Proliferationsverhalten von CT26-Zellen auszuschließen wurden zusätzliche Tests durchgeführt. Diese waren notwendig, da andere Arbeitsgruppen einen promalignen Einfluss der CXCL10-CXCR3 Bindung beschrieben hatten (*Cambien et al., 2009; Kawada et al., 2007*). Hierbei führte die Aktivierung des CXCR3 Rezeptors durch die Bindung seiner Liganden zu einer Stimulation der Metastasierung im kolorektalen Karzinom. Weiterhin wurde eine Induktion der Zellmigration durch CXCL10 beobachtet (*Kawada et al., 2007*). Zudem begünstigte CXCL10 die mit der Invasion von Karzinomzellen zusammenhängenden Eigenschaften wie Migration und Expression der Matrix Metalloproteinase 9 (*Zipin-Roitman et al., 2007*). Ferner wurde die Expression des CXCR3 Rezeptors auf C26-Zellen nachgewiesen und gezeigt, dass eine Stimulation mit CXCR3-Liganden invasionsfördernde Eigenschaften in C26-Zellen aktivierte (*Cambien et al., 2009*). Mittels eines Zellmigrationsversuches konnte die Auswirkung der Expression von CXCL10 auf die Zellmigration analysiert werden. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Migrationsverhalten der CT26-Zellen. Eine autokrine Stimulation der Zellwanderung durch CXCL10 kann somit ausgeschlossen werden. Durch Proliferationsanalyse konnte zudem gezeigt werden, dass CXCL10 auch hierauf keine Auswirkung hatte. Das Fehlen von CXCL10 im Kulturmedium hatte den gleichen Effekt auf die Proliferation der CT26-Zellen wie die Titration unterschiedlicher Konzentrationen des Chemokinproteins. Der in einer vorigen Studie beschriebene Einfluss von CXCL10 auf die Migration von CT26-Zellen konnte nicht bestätigt werden, was möglicherweise auf Unterschiede in den verwendeten Zelllinien zurückzuführen ist, die durch längere Kulturdauer entstehen können. Da CXCL10 keinen Einfluss auf Migration und Proliferation der CT26-Zellen zeigte, waren sie für die orthotope Zellimplantation als geeignet einzustufen.

4.2.4.2 Genetische Modifikation der CT26-Zellen

Nach Ermittlung einer geeigneten Zelllinie folgte eine genetische Modifikation der CT26-Zellen durch die stabile Transfektion verschiedener Vektoren. Hierbei wurden zwei Vektoren kreiert, die unter Kontrolle des CMV-Promotors das LacZ Gen konstitutiv exprimieren. Nach Dissektion der Tiere sollten die Organe entnommen

werden und mittels β -Galactosidasefärbung Mikrometastasen und mögliche Fernmetastasen sichtbar gemacht werden. Eine kontinuierliche Expression von murinem CXCL10 wurde durch den EF-1 α -Promotor gewährleistet. CXCL10 wurde in den Vektor pBudCE4.1/lacZ/CXCL10 eingebracht, während der parentale pBudCE4.1/lacZ-Vektor hierbei als Kontrolle diente. Nach stabiler Transfektion simulierten CT26^{-CXCL10}-Zellen Tumorzellen, die nur in geringem Maße CXCL10 exprimieren. Dahingegen rekapitulieren stabil transfizierte CT26-Zellen mit pBudCE4.1/lacZ/CXCL10-Vektor Tumore aus Patienten, die eine hohe Menge an CXCL10 exprimieren.

Vor der Zellimplantation wurde die Wirkung der gentechnischen Modifikation der Tumorzellen auf deren Proliferationsverhalten hin untersucht. Mittels XTT-Proliferationsassays wurden die genetisch modifizierten Zellen analysiert. Nach der Transfektion mit den beiden Vektoren zeigten die Zellen ein zu den parentalen Zellen äquivalentes Zellwachstum. Es konnte somit kein Unterschied zwischen den genetisch modifizierten, CXCL10 überexprimierenden Zellen, oder den Zellen, die mit einem leeren Vektor transfiziert wurden, festgestellt werden. Dies zeigt deutlich, dass weder die genetische Modifikation noch die stabile Überexpression des CXCL10 Proteins zu einer veränderten Proliferation der Zellen führt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die stabilen Klone vergleichbare Mengen an CXCL10 Protein sezernieren, analog zu deren parentalen Zellen. Im Gegensatz dazu zeigten die Zellen, die stabil mit pBudCE4.1/lacZ/CXCL10 transfiziert wurden, eine bis zu 16-fach erhöhte Proteinkonzentration im Zellüberstand. Zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks innerhalb der Zellkultur wurde mit Antibiotika gearbeitet, die im orthotopen Modell nicht zum Einsatz kamen. Zur Sicherstellung der stabilen Expression des CXCL10 Proteins wurden die stabilen Klone in der Zellkultur über einen Zeitraum von fünf Wochen beobachtet. Hierbei wurde kein weiterer Selektionsdruck auf die Zellen ausgeübt und regelmäßig die Proteinkonzentration im Zellüberstand analysiert. Es zeigte sich, dass die stabil transfizierten CT26 Klone kontinuierlich CXCL10 über diesen Zeitraum hin exprimierten. Aufgrund dessen konnten diese Zellen für den Versuch im orthotopen Mausmodell verwendet werden, da sich dieser ebenfalls über maximal fünf Wochen erstreckte.

4.2.4.3 Das orthotope Mausmodell

Die orthotope Zellimplantation erfolgte durch die Etablierung einer von Alencar et al. beschriebenen Methode (Alencar et al., 2005), die auf der Einbringung von Tumorzellen in das Rektum mittels eines Katheters beruht, nachdem zuvor die Mukosa durch eine Behandlung mit Trypsin für die Zellimplantation vorbereitet wurde. Lediglich die Inkubationszeit des Trypsins und der Zellen mussten im Vergleich zur Originalpublikation verlängert werden. Nach Erhöhung der Inkubationszeiten auf jeweils 30 Minuten konnte gewährleistet werden, dass die Epithelbarriere ausreichend aufgeschlossen war, so dass sich die implantierten Zellen dort einnisten konnten. Dies konnte durch mikroskopische Analysen der Gewebsarchitektur post mortem nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde durch die eingesetzten Gefäßklemmen sichergestellt, dass nur ein definierter Bereich des distalen Kolon behandelt wurde. Die Tumore, die nach der Zellimplantation entstanden, zeigten eine einheitliche Morphologie, unabhängig von CXCL10 Expression und Mausstamm, und wiesen laut histopathologischer Analyse eine hochgradige Dedifferenzierung mit zentralen Nekrosen und zahlreichen Mitosen auf. Allerdings konnte nur eine relativ geringe Anzahl an Mäusen mit Tumorlast im orthotopen Modell analysiert werden, die Mehrzahl der operierten Tiere waren tumorfrei. Dies könnte an der mechanischen Belastung des Darms durch den Kottransport und somit der Verdrängung der implantierten Zellen liegen. Ebenso ist denkbar, dass es an der Vorinkubation des distalen Kolons mit Trypsin gelegen haben könnte, die die Implantation der Tumorzellen eher hemmte. Eine weitere Erklärung besteht im Vorhandensein der β -Galaktosidase im verwendeten Vektor, mit dem die isogenen CT26-Tumorzellen transformiert wurden. Im Rahmen einer früheren Forschungsarbeit wurde β -Galaktosidase als immunogenes Epitop identifiziert, so dass die implantierten Tumorzellen mutmaßlich vom Immunsystem erkannt und in gewissem Grade eliminiert wurden (Abina et al., 1996).

Das stabile Einbringen von CXCL10 in CT26-Zellen hatte keinen autokrinen Effekt auf die Tumorzellen in Bezug auf deren Proliferations- oder Migrationsverhalten, wie zuvor *in vitro* gezeigt werden konnte. Die CXCL10-exprimierenden Zellen bildeten keine Tumore in immunkompetenten Mäusen aus (0 von 19 Tieren). In immundefizienten Rag1^{-/-} Mäusen hingegen entstanden Tumore aus den implantierten CXCL10 exprimierenden CT26-Zellen (2 von 20 Tieren). In diesen

T- und B-Zell defizienten Mäusen war die Tumorgenese vermindert im Vergleich zu den parentalen Kontrollklonen, die kein exogenes CXCL10 ausprägten. Dies zeigt eine antitumorale Wirkung des CXCL10, die nicht ausschließlich vom adaptiven Immunsystem abhängt. Laboreigene Befunde zeigen, dass dies vermutlich auf eine Reduktion der intratumoralen Blutgefäße zurückzuführen ist. Des Weiteren stellte sich eine antimetastatische Wirkung der erhöhten Chemokinexpression dar, da keine Metastasenbildung nach Implantation CXCL10-exprimierender Zellen beobachtet werden konnte (Null Metastasen in 20 Tieren, von denen zwei Tiere Tumore ausbildeten). Im Gegensatz hierzu kam es zur Metastasierung in einer immunkompetenten Maus nach Implantation der immunogenen Krebszellen, die kein CXCL10 exprimierten (14 Metastasen in einem Tier). Ebenso konnte eine lymphogene Metastasierung dieser Zellen in einem immundefizienten Tier beobachtet werden (17 Metastasen in einem Tier). Außerdem war die Tumormasse in immundefizienten Mäusen tendenziell größer als in immunkompetenten Mäusen, der Unterschied erreichte allerdings nicht das Signifikanzniveau. Dies belegt die Relevanz von T- und B-Zellen bei der Kontrolle des sich ausbildenden Primärtumors. Auffällig war, dass sich trotz des hohen Tumolvolumens in beiden Tiermodellen kein Ileus (Darmverschluss) ausbildete. Zusammenfassend bestätigen diese Untersuchungsergebnisse die wichtige Rolle der CXC-Chemokine als Mediatoren in der Inhibierung der Tumorprogression.

Die Metastasenentwicklung im kolorektalen Karzinom birgt das große Risiko für den Patienten, dass die Erkrankung einen tödlichen Verlauf nimmt. Möglicherweise ist die gute Prognose von CRC Patienten mit einer hohen Menge an CXCL11 darauf zurückzuführen, dass dadurch die Ausbildung von Metastasen unterdrückt wird.

4.2.4.4 Systemischer vs. intratumoraler Nachweis der CXCL10 Expression

Die lokal begrenzte Analyse der Chemokinexpression im humanen Tumorgewebe führte zu einer klinisch relevanten Risikostratifizierung. Eine Bestimmung der intratumoralen Mengen der Chemokine war allerdings erst nach der operativen Resektion des Tumors möglich. Eine weniger invasive Analysemethode, etwa aus dem peripheren Blut, würde den Patienten schonen bzw. könnte bereits präoperativ angewendet werden. Die Verwendung von Blutproben als sogenannte „*liquid biopsies*“ ist in der Biomarkerforschung gegenwärtig stark in den Fokus gerückt. Aufgrund dessen wurde eine blutbasierte Analyse an den orthotopen Mausmodellen

durchgeführt. Hierbei wurden den implantierten Tieren unmittelbar vor der Dissektion Serumproben entnommen. Im Anschluss daran konnte in diesen Serumproben die Proteinkonzentration von CXCL10 mittels ELISA bestimmt werden. Tumorfremie Tiere wiesen eine deutlich geringere systemische CXCL10-Konzentration auf, als Tiere, die eine hohe Tumorlast trugen. Innerhalb dieses Versuchsaufbaus war es allerdings aufgrund der geringen Fallzahl nicht möglich, auf Signifikanzniveau zwischen Tieren mit und ohne Metastasierung zu unterscheiden. Der Unterschied der Proteinkonzentration im Blut von Tieren mit und ohne Tumorlast konnte auch in immundefizienten Rag1^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden. Nach der orthotopen Zellimplantation waren in Rag1^{-/-} Wirtstieren beide Varianten der gentechnisch modifizierten Zellen dazu in der Lage Tumore auszubilden.

4.3 Vergleichende Betrachtung der Befunde aus Mausmodellen mit klinischen Daten

Um die Veränderung einzelner Gene und Genprodukte im Zusammenhang mit der Entstehung eines Krankheitsbilds zu verstehen, oder um eine geeignete Therapie zu entwickeln, wird häufig auf das Tiermodell zurückgegriffen. Hierbei finden in besonderem Ausmaß Mausmodelle Anwendung, da sich diese Tiere aufgrund ihrer hohen genetischen Übereinstimmung mit dem Menschen, der gut etablierten molekulargenetischen Eingriffsmöglichkeiten sowie ihrer kurzen Generationszeit auszeichnen. Die Untersuchungen, die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt wurden, konnten zeigen, dass sich die Situation in bereits etablierten genetischen Mausmodellen für Darmkrebs in Bezug auf das klinische Bild bei Menschen ähnlich darstellt. Dies zeigt sich im speziellen durch die unterschiedliche Ausprägung der CXC-Chemokine innerhalb der Tumore und deren positiven Korrelation mit der Menge an intratumoralen Immunzellinfiltraten. Das Mausmodell bietet uns die Möglichkeit, Manipulationen gezielt vorzunehmen und dadurch auf die Reaktion im Patienten Rückschlüsse zu ziehen und individualisierte Therapieansätze zu finden (*Dattatreya, 2013; Feng et al., 2014; Gala und Chandarlapaty, 2014; Kohne, 2014; Kraus et al., 2014; Rampias et al., 2014*). Das führt dazu, dass heute beispielsweise durch genetische Analysen von Tumoren die wirkungsvollste Behandlung eingeleitet werden kann (*Maly und Macrae, 2014*). Im Rahmen dieser Arbeit konnten die bereits existierenden Mausmodelle durch ein neuartiges orthotopes System ergänzt und erweitert werden, das im Vergleich zu den genetischen Modellen mehrere Vorteile

aufweist. So bietet das Modell eine rasche Tumorentwicklung (etwa ein Monat Latenz, im Vergleich zu einem Jahr bei Apc-Mäusen) und einer anatomisch im Vergleich zum Patienten korrekten Lokalisierung (distaler Kolon, im Vergleich zu Duodenum/Jejunum). Mit Hilfe dieses Modells konnte der kausale Einfluss der intratumoralen Ausprägung von CXC-Chemokinen experimentell überprüft werden.

Die zu Beginn der vorliegenden Arbeit durchgeführte Analyse der Tumorproben von 120 Patienten mit Kolonkarzinomen aller Tumorstadien (UICC Stadium I-IV) konnte zeigen, dass die intratumorale Ausprägung von CXCL9 und CXCL11 mit dem Überleben der Patienten korrelierte. Eine hohe Expression von CXCL11 und CXCL9 hat einen signifikant positiven Einfluss auf das Gesamtüberleben. Die ersten fünf Jahre nach der Operation überlebten 93% der Patienten mit einer hohen intratumoralen CXCL11 Ausprägung, jedoch nur 70% der Patienten in der Gruppe mit einer niedrigen CXCL11 Expression. Auf Grundlage einer multivariaten Cox Regressionsanalyse zeigte sich, dass das Expressionsniveau von CXCL11 einen von den klinischen Faktoren unabhängigen Prognosefaktor darstellt, der eine präzise Aussage über den weiteren Krankheitsverlauf erlaubt. Zusätzlich zeigte sich bei Patienten eine deutlich höhere und frühere Neigung zur Rezidivbildung, wenn die CXCL11 Ausprägung unterhalb des *cut-off* Werts (Schwellenwert) lag. Eine verminderte CXCL11 Expression steht also bei Patienten mit einem kürzeren Gesamtüberleben in Zusammenhang. Im transgenen Mausmodell für Darmkrebs wurden ebenfalls unterschiedliche CXC-Chemokinausprägungen in Abhängigkeit von der Schwere des Phänotyps festgestellt. So zeigten sich keinerlei Expressionsunterschiede bei Tumoren von einzel-transgenen Tieren, für die ein relativ langes Gesamtüberleben und die Ausbildung nur weniger Tumore charakteristisch ist (pvillin-Kras^{V12G} und Apc^{1638N/wt}). Das kombinierte Modell (RasApc) hingegen rekapituliert einen drastischen Krankheitsverlauf mit einer stark verkürzten Lebensdauer und der Ausbildung einer Vielzahl von invasiven Adenokarzinomen. Die Tumore dieser Tiere wiesen deutlich geringere Mengen an CXC-Chemokinen im Vergleich zum Normalgewebe auf. So können Parallelen zwischen Mensch und Maus gezogen werden, in beiden Fällen ist es für die Überlebensdauer von Nachteil, wenn nur geringe Mengen intratumoraler CXC-Chemokine vorhanden sind.

Wie bereits beschrieben, gehören CXCL9, 10 und 11 zur Gruppe der durch das Zytokin IFN γ induzierbaren Chemokine (*Groom und Luster, 2011*). Dies konnte in allen getesteten Zelllinien (außer CT26) und frisch entnommenen Tumorproben dargestellt werden. Hierbei war es irrelevant, ob die Zellen bzw. die Tumorgewebe humanen oder murinen Ursprungs waren. Die *ex vivo* Organkultur zeigte, dass die frischen humanen Tumorexplantate konstitutiv eine höhere Menge an CXCL11 produzieren als das angrenzende Normalgewebe. Die Analyse von murinem Tumor- und Normalgewebe auf Immunzelltranskripte zeigte allerdings keine erhöhte T-Zelltranskriptzahl im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Menge an CXC-Chemokin im Tumor erhöht ist, aber möglicherweise keine weitere Zunahme in der T-Zellinfiltration mit sich bringt bzw. dafür noch nicht ausreicht. Die Analyse von Immunzelltranskripten diente allerdings lediglich einer ersten Näherung und sollte durch weitere Analysen, wie z.B. Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten, verifiziert werden.

In der *ex vivo* Organkultur führte darüber hinaus die Zugabe der proinflammatorischen Zytokine IFN γ und TNF α zu einer zusätzlichen Stimulation der Sekretion von CXCL11 sowie in geringerem Maße ebenfalls von CXCL10. Hierbei war es unerheblich, ob die Tumore initial hohe oder geringe Mengen an CXCL11 mRNA exprimierten. Interessanterweise konnte diese Zytokininduktion nur in Tumorproben, aber nicht im Normalgewebe beobachtet werden. In enger Übereinstimmung hierzu zeigte sich eine höhere Sekretion von CXCL10 in murinen Tumorproben nach Gabe dieser Zytokine. Die Diskrepanz der untersuchten Chemokine ist der natürlichen Nullmutation für *Cxcl11* zuzuschreiben, die viele der häufig eingesetzten Mauslinien tragen (*Sierro et al., 2007*). Aus diesem Grund konzentrierten sich die Untersuchungen der Tiermodelle in dieser Doktorarbeit auf CXCL10. Dies führt zur Schlussfolgerung, dass die Tumorzellen nicht dauerhaft, etwa durch somatische Mutationen, die Fähigkeit verloren haben, CXC-Chemokine zu produzieren, sondern die Chemokinexpression nur transient herabregulieren. Dieses Phänomen konnte in Mausmodellen und Humangewebe beobachtet werden, was auf eine evolutionäre Konservierung schließen lässt.

4.3.1 CXC-Chemokinausprägung induziert T-Lymphozyteninfiltration und hemmt Angiogenese bei Darmkrebs

Es wurde berichtet, dass weder die Proliferation noch die Apoptose im primären kolorektalen Karzinom von der Expression der CXC-Chemokine oder der intratumoralen T-Zelldichte abhängt (*Camus et al., 2009*). Dies deutet darauf hin, dass die adaptive Immunantwort nicht ausreicht, um Primärtumore unter Kontrolle zu halten. Allerdings ist es möglich, dass eine hohe Expression von CXCR3-Liganden eine anhaltende T-Gedächtniszellantwort fördert. Diese wiederum könnte wirksam einer Rezidivierung und Metastasierung vorbeugen. Diese Prävention wäre möglicherweise auf die Vernichtung von zirkulierenden oder disseminierten Tumorzellen zurückzuführen, und würde mit einer verbesserten Langzeitprognose einhergehen. Im Interleukin-10 defizienten Mausmodell für die chronisch entzündliche Darmerkrankung (*inflammatory bowel disease*) wurde gezeigt, dass sowohl CXCL10, als auch CXCR3 im Bereich der kolitischen Stellen hoch exprimiert waren. Wurde CXCL10 neutralisiert, so bewirkte dies eine drastische Verschlechterung der Kolitis (*Hyun et al., 2005; Singh et al., 2008*). Ebenso konnte in verschiedenen Entzündungsmodellen des Gehirns und des Rückenmarks die Dominanz von CXCL10 als primärer CXCR3 Ligand gezeigt werden. Dieser ist in diesem Fall verantwortlich für die Rekrutierung von T-Effektorzellen in diese sonst schwer zugänglichen Bereiche (*Groom und Luster, 2011*). Somit könnte CXCR3 und seine Liganden eine kausale Verbindung zwischen chronischer Entzündung und der Entstehung von Kolorektalkarzinomen darstellen.

Die publizierten angiostatischen Eigenschaften der CXC-Chemokine konnten allerdings nicht durch eine veränderte Blutgefäßdichte in den untersuchten humanen Tumorgewebeproben nachgewiesen werden, der Unterschied erreichte nicht das Signifikanzniveau. Im Gegensatz dazu war allerdings eine hochsignifikante Korrelation der Chemokinexpression mit der Anzahl und Art von T-Lymphozyten zu beobachten. Humane Tumore mit einer hohen CXCL11 Ausprägung wiesen eine ebenfalls hochsignifikant größere Anzahl an T-Lymphozyten auf, die einer Immunantwort des T_H1 Typs entsprechen. Im orthotopen Mausmodell konnte zudem ein antitumoraler und antimetastatischer Effekt der intratumoralen CXCL10-Ausprägung belegt werden. Die Chemokinexpression verhinderte hier signifikant die Ausbildung von Darmtumoren. Eine schematische Zusammenfassung der

Hypothese, die aufgrund der hier erzielten Befunde aufgestellt werden kann, ist in Abbildung 45 dargestellt.

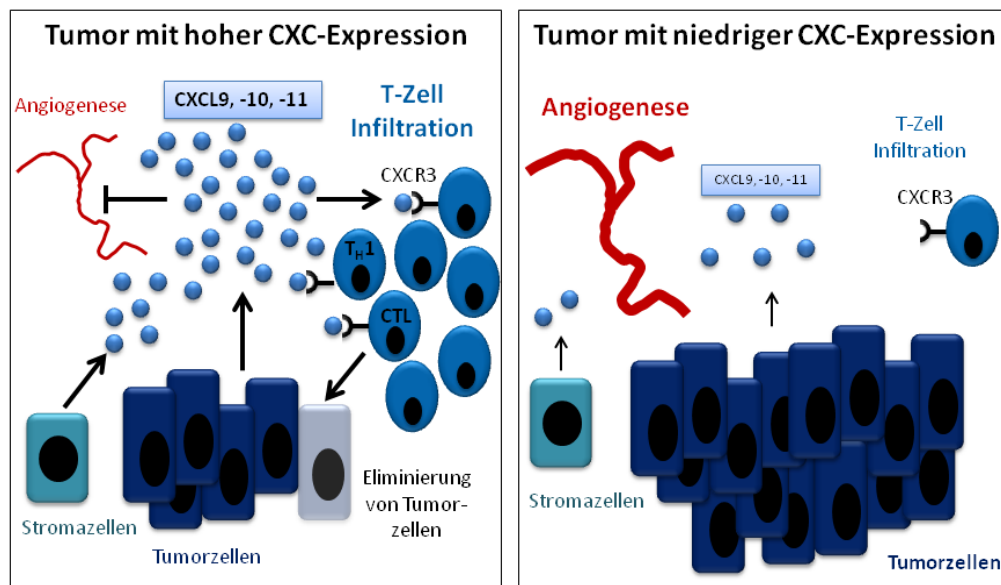


Abbildung 45: Modell der Immunmodulation durch interferonregulierte CXC-Chemokine. Linke Seite: Tumor mit hoher Chemokinexpression und günstiger Prognose aufgrund der Eliminierung von Tumorzellen durch die infiltrierenden T-Lymphozyten; rechte Seite: Tumor mit niedriger Chemokinexpression und schlechter Prognose.

Aktuell steht das Feld der Immuntherapie bei soliden Tumoren vor einem Umbruch, wie klinische Erfolge bei der Behandlung von Melanomen und Prostatakarzinomen zeigen, die auf der Blockade von kostimulatorischen T-Zellrezeptoren (sogenannte „Immun-Checkpoint“) durch therapeutische Antikörper beruhen (Ascierto und Marincola, 2014; Lizee et al., 2013). Zukünftig könnte es ein interessanter Ansatz für die Therapie sein, die Tumorzellen dahingehend umzusteuern, wieder vermehrt CXCL11 zu produzieren und dadurch T-Zellen chemotaktisch ins Tumorgewebe zu locken. Dies wäre besonders für die Patienten mit einer geringen initialen Menge an intratumoralem CXCL11 von Nutzen. In einer Kombination mit den „Immun-Checkpoint“-Inhibitoren könnte so die Anzahl und gleichzeitig die Aktivität intratumoraler T-Lymphozyten verstärkt werden. So wurde bereits beschrieben, dass kolorektales Tumorgewebe durch die kombinierte Gabe von TLR3-Liganden und $\text{IFN}\alpha$ zur Produktion von CXCL10 und CCL5 anregbar war (Muthuswamy et al., 2012). Interessanterweise konnte in Mausmodellen durch die Gabe von CXCL10 die Wirksamkeit der Chemotherapie mit Cisplatin verbessert werden (Li et al., 2005). Sofern die Erkenntnisse aus dem Mausmodell auf den Patienten übertragbar sind, könnte eine therapeutische Gabe von CXCL11 die Wirksamkeit einer Chemotherapie verbessern.

4.4 Ausblick

Das hier neu entwickelte orthotope Modell könnte in Zukunft Anwendung in der Optimierung der personalisierten Tumorthherapie finden. Dabei können frisch entnommene Tumorproben in mehrere Stücke unterteilt und in immundefiziente Mäuse rektal implantiert werden. Nach Anwachsen der Tumorproben können die Mäuse mit einzelnen Chemotherapeutika (etwa 5-Fluoruracil, Oxaliplatin oder Irinotecan), sowie verschiedenen Kombinationen von Chemotherapeutika oder therapeutischen Antikörpern behandelt werden, um herauszufinden, welche Kombination *in vivo* am besten anspricht und die maximale Wirkung entfaltet. Zudem kann dieser Versuchsansatz dazu beitragen die Frage zu klären, wie das Ansprechen auf bestimmte Therapeutika mit der CXC-Chemokinexpression zusammenhängt. Hierbei muss eine Einteilung der Tumore gemäß ihrer Expressionsmuster des Chemokins CXCL11 vorgenommen werden, im Sinne der hier etablierten Eingruppierung nach definierten Schwellenwerten. Dies könnte zu einer optimierten Behandlung der Patienten aufgrund ihrer intratumoralen Expressionsmuster von CXCL11 führen.

Die Ergebnisse im orthotopen Mausmodell bezüglich der CXCL10 Konzentration im Blutserum der Tiere ließen Rückschlüsse auf das Vorhandensein einer Tumorlast zu. Aus diesem Grund wäre es für die Zukunft interessant, weitere Serumproben sowohl von den genetischen Mausmodellen als auch von Patienten zu sammeln. Die Analyse der Serumproben auf deren CXC-Chemokinkonzentration könnte möglicherweise zu einer neuen, nicht-invasiven Biomarkeranalyse beim kolorektalen Karzinom führen. Diese könnte gegebenenfalls für die Früherkennung oder Verlaufskontrolle von kolorektalen Tumoren eingesetzt werden. Hierzu müssten Serumproben der betroffenen Patienten gesammelt und mittels ELISA auf deren Mengen an exprimiertem CXCL11 hin untersucht werden. Des Weiteren könnten diese Analysen Rückschlüsse auf das Vorhandensein von Metastasen zulassen, wie die vorläufigen Befunde aus den Mausmodellen anzeigen. Hierbei ist es entscheidend, die Anzahl der untersuchten Patientenblutproben zu erhöhen, und klinisch gut annotierte Proben einzusetzen. Am Tiermodell sollte weiterhin vertieft untersucht werden, ob und in welchem Umfang die Masse und Anzahl an Tumoren einen Einfluss auf die systemischen CXCL10 Mengen zeigt.

In experimenteller Hinsicht wäre es naheliegend zu klären, welche Effekte im orthotopen Modell beobachtet werden können, wenn ein CXCR3 blockierender Antikörper *in vivo* verwendet wird. Hierbei könnte der Zusammenhang zwischen CXC-Chemokinexpression und Tumorlast unabhängig von den hier dargestellten Versuchen belegt werden. Zu erwarten wäre, dass die Expression der interferon-induzierten CXC-Chemokine keine Auswirkung auf die Tumorlast hat, wenn CXCR3 spezifisch und vollständig blockiert wird.

Abschließend könnte die Kombination transgener Mauslinien genauere Informationen über die Bedeutung von T- und B-Zellen während der Tumorformation geben. Im Zuge dessen können T- und B-Zell-defiziente Rag1^{-/-} Mäuse mit transgenen Mausmodellen für Darmkrebs (z.B. Ras^{V12G}, Apc^{1638N} Linien) gekreuzt werden. Erwartungsgemäß müsste sich der Phänotyp der Tumorlinien kombiniert mit Rag1^{-/-} drastisch verschlechtern. Laboreigene Vorbefunde zeigen, dass tatsächlich die Tumoranzahl und Tumorprogression bei immundefizienten Apc^{1638N} Tieren signifikant erhöht sind.

5 Zusammenfassung

Der Zusammenhang zwischen Immunsystem und Tumorentstehung ist komplex, es sind tumorhemmende, aber auch tumorfördernde Wirkungen beschrieben. Unstrittig scheint, dass eine hohe Anzahl intratumoraler T-Lymphozyten mit einer guten Prognose bei Darmkrebs korreliert, dies trifft in besonderem Maß auf eine Immunantwort des T_H1 Typs zu. Allerdings sind die Mechanismen, die der T-Zell-Infiltration in Darmtumore zugrunde liegen, noch unklar. In Vorarbeiten wurde festgestellt, dass sich interferon-regulierte CXC-Chemokine (CXCL9, 10 und 11) als Prädiktoren für das Überleben im kolorektalen Karzinom eignen. Es handelt sich um sekretierte Immunmediatoren, die angiostatisch wirken und chemotaktisch T-Zellen rekrutieren. An einem Kollektiv von Patienten mit Kolorektalkarzinomen (n=120) konnte hier nachgewiesen werden, dass eine erhöhte intratumorale Ausprägung von CXCL9 und CXCL11 signifikant mit dem postoperativen Überleben korreliert, beide Parameter waren in der multivariaten Analyse unabhängig von etablierten klinischen Prognosefaktoren. Die Fähigkeit zur CXC-Chemokinexpression nach Zytokin-Stimulation wurde an etablierten Zelllinien aus Kolorektalkarzinomen sowie an genetischen Mausmodellen und einem Organkulturmodell, basierend auf operativ resezierten humanen Darmtumoren, auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen. Immunhistochemische Färbungen an Gewebeschnitten zeigten, dass Tumorzellen eine wichtige Quelle von CXCL11 sind. Zudem korrelierte eine hohe intratumorale Chemokinexpression von CXCL9, 10 und 11 mit der Anwesenheit von infiltrierenden $CD8^+$ -Effektorzellen (p=0,011) und $CD4^+$ -T-Helferzellen (p=0,0016). Es wurde jedoch kein klarer Zusammenhang zwischen der Blutgefäßdichte und der CXC-Chemokinexpression gefunden.

Um einen kausalen Einfluss der CXC-Chemokinexpression auf die kolorektale Tumorentstehung zu überprüfen, wurde ein orthotopes Mausmodell etabliert, basierend auf einer isogenen murinen Rektumkarzinomzelllinie, mit stabiler CXCL10 Expression. Das orthotope Modell bestätigte die Annahme, dass eine erhöhte intratumorale CXC-Chemokin Expression das Tumorwachstum hemmt, vermittelt durch das adaptive Immunsystem. Dies macht die interferon-induzierten CXC-Chemokine zu vielversprechenden möglichen Angriffspunkten für eine therapeutische Intervention.

6 Summary

The interactions between the immune system and solid tumors are complex, immune cells can have both tumor-promoting and tumor-inhibiting roles. Solid evidence indicates that high intratumoral numbers of T-lymphocytes, especially of the T_H1 type subset, predict good prognosis in colorectal cancer. However, the mechanisms underlying T-cell infiltration in colon tumors are still unclear. Previously, we identified interferon-regulated CXC-chemokines, secreted immune mediators that chemotactically recruit T-cells, as predictors of survival in colorectal cancer. Here, it could be shown that elevated expression of CXCL9 and CXCL11 was significantly correlated with postoperative tumorspecific survival in a collective of n=120 patients with colon cancer, confirming previous microarray data. Both parameters were retained as independent prognostic indicators upon multivariate analysis. Analysis of colorectal cancer cell lines and genetic mouse models for digestive cancer, as well as an *ex vivo* explant culture model based on resected human colon tumors demonstrated that colorectal cancer cells produce significant amounts of CXCL11 and CXCL10 upon cytokine stimulation with IFN γ and TNF α .

Immunohistochemistry on tissue sections showed, that tumor cells were a major source of CXCL11. Moreover, high intratumoral chemokine coexpression of CXCL9, 10 and 11 was correlated with the presence of CD8⁺-effector (p=0.011) and CD4⁺-T-helper (p=0.0016) cells within the tumor. However, no clear association with blood vessel density was found. In order to test the hypothesis that elevated CXC-chemokines have a causal effect on tumorigenesis, an orthotopic mouse colorectal cancer model was established, based on the isogenic murine colorectal carcinoma cell line CT26, stably expressing CXCL10. The orthotopic model demonstrated that tumor growth was inhibited by intratumoral expression of CXCL10. This effect was largely mediated by the adaptive immune system. Thus, CXC-chemokines are promising potential targets for therapeutic intervention.

7 Danksagungen

Diese Doktorarbeit wurde an der Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar, in der Klinischen Forschergruppe "Molekulare Tumorbologie" angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Haller möchte ich dafür danken, dass er sich bereit erklärt hat, meine Arbeit von Seiten des WZW der TUM zu betreuen.

Herrn PD Dr. Klaus-Peter Janssen, Leiter der Klinischen Forschergruppe „Molekulare Tumorbologie“ an der Chirurgischen Klinik, danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen. Er stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite, wobei ich besonders für die umfangreiche Betreuung, praktische Unterstützung und stetige Aufmunterung danken möchte. Ich hoffe die *take-home-message* ist deutlich als solche erkennbar und es ist alles in allem eine runde Sache geworden.

Besonders danken möchte ich dem gesamten Laborteam für die Unterstützung bei den verschiedensten Problemen und die stetige Unterstützung bei Fragestellungen aller Art. Danke für die tolle Stimmung im Labor und die unzähligen Lachanfälle... Vielen Dank Klaus-Peter, Julia, Anne, Widya, Uli, Matthias, Dietrich, Lars, Felicitas, Christoph, Sabine, Conny, Biggi, Alex, Patricia, Karin, Melanie, Masaki, Jorge, Katharina, Franzi und Dani – ohne euch wäre es unmöglich gewesen diese Arbeit anzufertigen.

Ein großes Dankeschön geht an Frau Monika Hane, welche in vielen bürokratischen Angelegenheiten eine große Hilfe war.

Meinen Eltern möchte ich danken, weil sie mir dieses Studium überhaupt erst ermöglicht haben und während der gesamten Studienzzeit immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Meinen Freunden danke ich für hilfreiche Gespräche, tolle Diskussionen, Unterstützung und Aufmunterung. Vor allem aber dafür, dass ihr immer für mich da wart. Vielen Dank Sebastian, Achim, Mariella, Joachim, Yvonne, Laura und Sönke.

Meinem Mann danke ich für alles. Ohne ihn wäre es unmöglich gewesen, diese Arbeit in Händen zu halten. Vielen Dank für die ermutigenden Worte und den Beistand zu jeder Zeit. *You are the real MVP...*

8 Literaturverzeichnis

- Aaltonen, L.A., P.Peltomaki, F.S.Leach, P.Sistonen, L.Pylkkanen, J.P.Mecklin, H.Jarvinen, S.M.Powell, J.Jen, S.R.Hamilton, and . 1993. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260:812-816.
- Abal, M., A.Obrador-Hevia, K.P.Janssen, L.Casadome, M.Menendez, S.Carpentier, E.Barillot, M.Wagner, W.Ansorge, G.Moeslein, H.Fsihi, V.Bezrookove, J.Reventos, D.Louvard, G.Capella, and S.Robine. 2007. APC inactivation associates with abnormal mitosis completion and concomitant BUB1B/MAD2L1 up-regulation. *Gastroenterology* 132:2448-2458.
- Abina, M.A., M.G.Lee, V.Descamps, L.Cordier, M.Lopez, M.Perricaudet, and H.Haddada. 1996. LacZ gene transfer into tumor cells abrogates tumorigenicity and protects mice against the development of further tumors. *Gene Ther.* 3:212-216.
- Acosta-Rodriguez, E.V., L.Rivino, J.Geginat, D.Jarrossay, M.Gattorno, A.Lanzavecchia, F.Sallusto, and G.Napolitani. 2007. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat. Immunol.* 8:639-646.
- Adachi, A., S.Koenig, H.E.Gendelman, D.Daugherty, S.Gattoni-Celli, A.S.Fauci, and M.A.Martin. 1987. Productive, persistent infection of human colorectal cell lines with human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 61:209-213.
- Agallou, M., E.Athanasίου, O.Koutsoni, E.Dotsika, and E.Karagouni. 2014. Experimental Validation of Multi-Epitope Peptides Including Promising MHC Class I- and II-Restricted Epitopes of Four Known *Leishmania infantum* Proteins. *Front Immunol.* 5:268.
- Agostini, C., F.Calabrese, F.Rea, M.Facco, A.Tosoni, M.Loy, G.Binotto, M.Valente, L.Trentin, and G.Semenzato. 2001. Cxcr3 and its ligand CXCL10 are expressed by inflammatory cells infiltrating lung allografts and mediate chemotaxis of T cells at sites of rejection. *Am. J. Pathol.* 158:1703-1711.
- Al-Shibli, K.I., T.Donnem, S.Al-Saad, M.Persson, R.M.Bremnes, and L.T.Busund. 2008. Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 14:5220-5227.
- Alencar, H., R.King, M.Funovics, C.Stout, R.Weissleder, and U.Mahmood. 2005. A novel mouse model for segmental orthotopic colon cancer. *Int. J. Cancer* 117:335-339.
- Angiolillo, A.L., C.Sgadari, D.D.Taub, F.Liao, J.M.Farber, S.Maheshwari, H.K.Kleinman, G.H.Reaman, and G.Tosato. 1995. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J. Exp. Med.* 182:155-162.
- Annunziato, F., L.Cosmi, V.Santarasci, L.Maggi, F.Liotta, B.Mazzinghi, E.Parente, L.Fili, S.Ferri, F.Frosali, F.Giudici, P.Romagnani, P.Parronchi, F.Tonelli, E.Maggi, and S.Romagnani. 2007. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.* 204:1849-1861.
- Anz, D., W.Mueller, M.Golic, W.G.Kunz, M.Rapp, V.H.Koelzer, J.Ellermeier, J.W.Ellwart, M.Schnurr, C.Bourquin, and S.Endres. 2011. CD103 is a hallmark of tumor-infiltrating regulatory T cells. *Int. J. Cancer* 129:2417-2426.
- Ascierto, P.A., and F.M.Marincola. 2014. What have we learned from cancer immunotherapy in the last 3 years? *J. Transl. Med.* 12:141.
- Bacon, K.B., M.C.Szabo, H.Yssel, J.B.Bolen, and T.J.Schall. 1996. RANTES induces tyrosine kinase activity of stably complexed p125FAK and ZAP-70 in human T cells. *J. Exp. Med.* 184:873-882.
- Baggiolini, M., B.Dewald, and B.Moser. 1997. Human chemokines: an update. *Annu. Rev. Immunol.* 15:675-705.
- Bagnasco, L., D.Piras, S.Parodi, I.Bauer, G.Zoppoli, F.Patrone, and A.Ballestrero. 2012. Role of angiogenesis inhibitors in colorectal cancer: sensitive and insensitive tumors. *Curr. Cancer Drug Targets.* 12:303-315.

-
- Baier, P.K., S.Wimmenauer, T.Hirsch, B.U.von Specht, K.S.von, H.Keller, and E.H.Farthmann. 1998. Analysis of the T cell receptor variability of tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal carcinomas. *Tumour. Biol.* 19:205-212.
 - Banerjea, A., S. A. Bustin, and S. Dorudi. 2005a. The immunogenicity of colorectal cancers with high-degree microsatellite instability. *World J. Surg. Oncol.* 3:26.
 - Banerjea, A., S. Clark, and S. Dorudi. 2005b. The changing face of familial colorectal cancer. *BMJ* 330:2-3.
 - Beck, C., H.Schreiber, and D.Rowley. 2001. Role of TGF-beta in immune-evasion of cancer. *Microsc. Res. Tech.* 52:387-395.
 - Benson, A.B., III, D.Schrag, M.R.Somerfield, A.M.Cohen, A.T.Figueroa, P.J.Flynn, M.K.Krzyzanowska, J.Maroun, P.McAllister, C.E.Van, M.Brouwers, M.Charette, and D.G.Haller. 2004. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J. Clin. Oncol.* 22:3408-3419.
 - Berencsi, K., N.J.Meropol, J.P.Hoffman, E.Sigurdson, L.Giles, P.Rani, R.Somasundaram, T.Zhang, J.Kalabis, L.Caputo, E.Furth, R.Swoboda, F.Marincola, and D.Herlyn. 2007. Colon carcinoma cells induce CXCL11-dependent migration of CXCR3-expressing cytotoxic T lymphocytes in organotypic culture. *Cancer Immunol. Immunother.* 56:359-370.
 - Bharhani, M.S., R.Borojevic, S.Basak, E.Ho, P.Zhou, and K.Croitoru. 2006. IL-10 protects mouse intestinal epithelial cells from Fas-induced apoptosis via modulating Fas expression and altering caspase-8 and FLIP expression. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 291:G820-G829.
 - Bindea, G., B.Mlecnik, W.H.Fridman, F.Pages, and J.Galon. 2010. Natural immunity to cancer in humans. *Curr. Opin. Immunol.* 22:215-222.
 - Boissonnas, A., L.Fetler, I.S.Zeelenberg, S.Hugues, and S.Amigorena. 2007. In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor. *J. Exp. Med.* 204:345-356.
 - Bonacchi, A., P.Romagnani, R.G.Romanelli, E.Efsen, F. Annunziato, L.Lasagni, M.Franca Lanci, M.Serio, G.Laffi, M.Pinzani, P.Gentilini, and F.Marra. 2001. Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *J. Biol. Chem.* 276:9945-9954.
 - Boon, T., J.C.Cerottini, B.Van den Eynde, P.van der Bruggen, and P.A.Van. 1994. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 12:337-365.
 - Bos, J.L., E.R.Fearon, S.R.Hamilton, V.M.Verlaan-de, J.H.van Boom, A.J.van der Eb, and B.Vogelstein. 1987. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327:293-297.
 - Bourdon, J.C. 2007. p53 and its isoforms in cancer. *Br. J. Cancer* 97:277-282.
 - Brattain, M.G., W.D.Fine, F.M.Khaled, J.Thompson, and D.E.Brattain. 1981. Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res.* 41:1751-1756.
 - Bromley, S.K., T.R.Mempel, and A.D.Luster. 2008. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat. Immunol.* 9:970-980.
 - Cambien, B., B.F.Karimjee, P.Richard-Fiardo, H.Bziouech, R.Barthel, M.A.Millet, V.Martini, D.Birnbaum, J.Y.Scoazec, J.Abello, S.T.Al, M.G.Johnson, T.J.Sullivan, J.C.Medina, T.L.Collins, A.Schmid-Alliana, and H.Schmid-Antomarchi. 2009. Organ-specific inhibition of metastatic colon carcinoma by CXCR3 antagonism. *Br. J. Cancer* 100:1755-1764.
 - Campanella, G.S., R.A.Colvin, and A.D.Luster. 2010. CXCL10 can inhibit endothelial cell proliferation independently of CXCR3. *PLoS. One.* 5:e12700.
 - Campanella, G.S., J.Grimm, L.A.Manice, R.A.Colvin, B.D.Medoff, G.R.Wojtkiewicz, R.Weissleder, and A.D.Luster. 2006. Oligomerization of CXCL10 is necessary for endothelial cell presentation and in vivo activity. *J. Immunol.* 177:6991-6998.
 - Campanella, G.S., E.M.Lee, J.Sun, and A.D.Luster. 2003. CXCR3 and heparin binding sites of the chemokine IP-10 (CXCL10). *J. Biol. Chem.* 278:17066-17074.

-
- Campanella, G. S., B. D. Medoff, L. A. Manice, R. A. Colvin, and A. D. Luster. 2008. Development of a novel chemokine-mediated *in vivo* T cell recruitment assay. *J. Immunol. Methods* 331:127-139.
 - Campanella, G. S. V., A. M. Tager, J. K. El Khoury, S. Y. Thomas, T. A. Abraszinski, L. A. Manice, R. A. Colvin, and A. D. Luster. 2008. Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105:4814-4819.
 - Camus, M., M.Tosolini, B.Mlecnik, F.Pages, A.Kirilovsky, A.Berger, A.Costes, G.Bindea, P.Charoentong, P.Bruneval, Z.Trajanoski, W.H.Fridman, and J.Galon. 2009. Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence. *Cancer Res.* 69:2685-2693.
 - Cancer Genome Atlas Network. 2012. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487:330-337.
 - Chambers, A.F., A.C.Groom, and I.C.MacDonald. 2002. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* 2:563-572.
 - Chan, A.T., and E.L.Giovannucci. 2010. Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology* 138:2029-2043.
 - Chen, Z., and J.J.O'Shea. 2008. Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. *Immunol. Res.* 41:87-102.
 - Clemente, C.G., M.C.Mihm, Jr., R.Bufalino, S.Zurrida, P.Collini, and N.Cascinelli. 1996. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77:1303-1310.
 - Cole, K.E., C.A.Strick, T.J.Paradis, K.T.Ogborne, M.Loetscher, R.P.Gladue, W.Lin, J.G.Boyd, B.Moser, D.E.Wood, B.G.Sahagan, and K.Neote. 1998. Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J. Exp. Med.* 187:2009-2021.
 - Colvin, B.L., and A.W.Thomson. 2002. Chemokines, their receptors, and transplant outcome. *Transplantation* 74:149-155.
 - Conforti, R., Y.Ma, Y.Morel, C.Paturel, M.Terme, S.Viaud, B.Ryffel, M.Ferrantini, R.Uppaluri, R.Schreiber, C.Combadiere, N.Chaput, F.Andre, G.Kroemer, and L.Zitvogel. 2010. Opposing effects of toll-like receptor (TLR3) signaling in tumors can be therapeutically uncoupled to optimize the anticancer efficacy of TLR3 ligands. *Cancer Res.* 70:490-500.
 - Cox, J.H., R.A.Dean, C.R.Roberts, and C.M.Overall. 2008. Matrix metalloproteinase processing of CXCL11/I-TAC results in loss of chemoattractant activity and altered glycosaminoglycan binding. *J. Biol. Chem.* 283:19389-19399.
 - Cox, M.A., C.H.Jenh, W.Gonsiorek, J.Fine, S.K.Narula, P.J.Zavodny, and R.W.Hipkin. 2001. Human interferon-inducible 10-kDa protein and human interferon-inducible T cell alpha chemoattractant are allotropic ligands for human CXCR3: differential binding to receptor states. *Mol. Pharmacol.* 59:707-715.
 - Cunningham, D., W. Atkin, H. J. Lenz, H. T. Lynch, B. Minsky, B. Nordlinger, and N. Starling. 2010b. Colorectal cancer. *Lancet* 375:1030-1047.
 - Cunningham, D., W. Atkin, H. J. Lenz, H. T. Lynch, B. Minsky, B. Nordlinger, and N. Starling. 2010a. Colorectal cancer. *Lancet* 375:1030-1047.
 - Cunningham, D., Y.Humblet, S.Siena, D.Khayat, H.Bleiberg, A.Santoro, D.Bets, M.Mueser, A.Harstrick, C.Verslype, I.Chau, and C.E.Van. 2004. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 351:337-345.
 - Cunningham, J.M., E.R.Christensen, D.J.Tester, C.Y.Kim, P.C.Roche, L.J.Burgart, and S.N.Thibodeau. 1998. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res.* 58:3455-3460.
 - Curado, M.P., B.Edwards, and H.R.Shin. Cancer incidence in five continents. IX. 2007. Lyon, IARC Scientific Publication No. 160.

-
- *Ref Type: Generic*
 - Curnock, A.P., M.K.Logan, and S.G.Ward. 2002. Chemokine signalling: pivoting around multiple phosphoinositide 3-kinases. *Immunology* 105:125-136.
 - Dahl, C.A., F.H.Bach, W.Chan, K.Huebner, G.Russo, C.M.Croce, T.Herfurth, and J.S.Cairns. 1990. Isolation of a cDNA clone encoding a novel form of granzyme B from human NK cells and mapping to chromosome 14. *Hum. Genet.* 84:465-470.
 - Dattatreya, S. 2013. Metastatic colorectal cancer-prolonging overall survival with targeted therapies. *South. Asian J. Cancer* 2:179-185.
 - de la Chapelle, A. 2004. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4:769-780.
 - Dexter, D.L., J.A.Barbosa, and P.Calabresi. 1979. N,N-dimethylformamide-induced alteration of cell culture characteristics and loss of tumorigenicity in cultured human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 39:1020-1025.
 - Didier, E.S., L.B.Rogers, J.M.Orenstein, M.D.Baker, C.R.Vossbrinck, G.T.Van, R.Hartskeerl, R.Soave, and L.M.Beaudet. 1996. Characterization of *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* isolates cultured from nasal mucosa and bronchoalveolar lavage fluids of two AIDS patients. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43:34-43.
 - Diederichsen, A.C., J.B.Hjelmborg, P.B.Christensen, J.Zeuthen, and C.Fenger. 2003. Prognostic value of the CD4+/CD8+ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 52:423-428.
 - Dieu-Nosjean, M.C., M.Antoine, C.Danel, D.Heudes, M.Wislez, V.Poulot, N.Rabbe, L.Laurans, E.Tartour, C.L.de, S.Lebecque, W.H.Fridman, and J.Cadranel. 2008. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J. Clin. Oncol.* 26:4410-4417.
 - Doll, D., L.Keller, M.Maak, A.L.Boulesteix, J.R.Siewert, B.Holzmann, and K.P.Janssen. 2010. Differential expression of the chemokines GRO-2, GRO-3, and interleukin-8 in colon cancer and their impact on metastatic disease and survival. *Int. J. Colorectal Dis.* 25:573-581.
 - Dunn, G.P., A.T.Bruce, H.Ikeda, L.J.Old, and R.D.Schreiber. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3:991-998.
 - Dunn, G.P., L.J.Old, and R.D.Schreiber. 2004. The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* 22:329-360.
 - Dwinell, M.B., N.Lugering, L.Eckmann, and M.F.Kagnoff. 2001. Regulated production of interferon-inducible T-cell chemoattractants by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 120:49-59.
 - Ehlert, J.E., C.A.Addison, M.D.Burdick, S.L.Kunkel, and R.M.Strieter. 2004. Identification and partial characterization of a variant of human CXCR3 generated by posttranscriptional exon skipping. *J. Immunol.* 173:6234-6240.
 - Enderlin, M., E.V.Kleinmann, S.Struyf, C.Buracchi, A.Vecchi, R.Kinscherf, F.Kiessling, S.Paschek, S.Sozzani, J.Rommelaere, J.J.Cornelis, D.J.Van, and C.Dinsart. 2009. TNF-alpha and the IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10/CXCL-10) delivered by parvoviral vectors act in synergy to induce antitumor effects in mouse glioblastoma. *Cancer Gene Ther.* 16:149-160.
 - Erdman, S.E., T.Poutahidis, M.Tomczak, A.B.Rogers, K.Cormier, B.Plank, B.H.Horwitz, and J.G.Fox. 2003. CD4+ CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit microbially induced colon cancer in Rag2-deficient mice. *Am. J. Pathol.* 162:691-702.
 - Erdogan, B., E.Uzaslan, F.Budak, M.Karadag, D.Ediger, B.Oral, G.Goral, E.Ege, and O.Gozu. 2005. The evaluation of soluble Fas and soluble Fas ligand levels of bronchoalveolar lavage fluid in lung cancer patients. *Tuberk. Toraks.* 53:127-131.
 - Erreni, M., P.Bianchi, L.Laghi, M.Mirollo, M.Fabbri, M.Locati, A.Mantovani, and P.Allavena. 2009. Expression of chemokines and chemokine receptors in human colon cancer. *Methods Enzymol.* 460:105-121.

-
- Falguieres, T., M.Maak, W.C.von, M.Sarr, X.Sastre, M.F.Poupon, S.Robine, L.Johannes, and K.P.Janssen. 2008. Human colorectal tumors and metastases express Gb3 and can be targeted by an intestinal pathogen-based delivery tool. *Mol. Cancer Ther.* 7:2498-2508.
 - Farber, J.M. 1997. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* 61:246-257.
 - Fearon, E.R., and B.Vogelstein. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759-767.
 - Feng, Q.Y., Y.Weil, J.W.Chen, W.J.Chang, L.C.Ye, D.X.Zhu, and J.M.Xu. 2014. Anti-EGFR and anti-VEGF agents: Important targeted therapies of colorectal liver metastases. *World J. Gastroenterol.* 20:4263-4275.
 - Fernandis, A.Z., R.P.Charla, and R.K.Ganju. 2003. Differential regulation of CXCR4-mediated T-cell chemotaxis and mitogen-activated protein kinase activation by the membrane tyrosine phosphatase, CD45. *J. Biol. Chem.* 278:9536-9543.
 - Finn, O.J. 2008. Cancer immunology. *N. Engl. J. Med.* 358:2704-2715.
 - Fodde, R., W.Edelmann, K.Yang, L.C.van, C.Carlson, B.Renault, C.Breukel, E.Alt, M.Lipkin, P.M.Khan, and . 1994. A targeted chain-termination mutation in the mouse *Apc* gene results in multiple intestinal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91:8969-8973.
 - Fogh, J., W.C.Wright, and J.D.Loveless. 1977. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 58:209-214.
 - Fre, S., D.Vignjevic, M.Schoumacher, S.L.Duffy, K.P.Janssen, S.Robine, and D.Louvard. 2008. Epithelial morphogenesis and intestinal cancer: new insights in signaling mechanisms. *Adv. Cancer Res.* 100:85-111.
 - Fridman, W.H., J.Galon, F.Pages, E.Tartour, C.Sautes-Fridman, and G.Kroemer. 2011. Prognostic and predictive impact of intra- and peritumoral immune infiltrates. *Cancer Res.* 71:5601-5605.
 - Friederichs, J., R.Rosenberg, J.Mages, K.P.Janssen, C.Maeckl, H.Nekarda, B.Holzmann, and J.R.Siewert. 2005. Gene expression profiles of different clinical stages of colorectal carcinoma: toward a molecular genetic understanding of tumor progression. *Int. J. Colorectal Dis.* 20:391-402.
 - Funada, Y., T.Noguchi, R.Kikuchi, S.Takeno, Y.Uchida, and H.E.Gabbert. 2003. Prognostic significance of CD8+ T cell and macrophage peritumoral infiltration in colorectal cancer. *Oncol. Rep.* 10:309-313.
 - Furuya, M., T.Yoneyama, E.Miyagi, R.Tanaka, K.Nagahama, Y.Miyagi, Y.Nagashima, F.Hirahara, Y.Inayama, and I.Aoki. 2011. Differential expression patterns of CXCR3 variants and corresponding CXC chemokines in clear cell ovarian cancers and endometriosis. *Gynecol. Oncol.* 122:648-655.
 - Gabrilovich, D., T.Ishida, T.Oyama, S.Ran, V.Kravtsov, S.Nadaf, and D.P.Carbone. 1998. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* 92:4150-4166.
 - Gala, K., and S.Chandrapaty. 2014. Molecular pathways: HER3 targeted therapy. *Clin. Cancer Res.* 20:1410-1416.
 - Galon, J., A. Costes, F. Sanchez-Cabo, A. Kirilovsky, B. Mlecnik, C. Lagorce-Pages, M. Tosolini, M. Camus, A. Berger, P. Wind, F. Zinzindohoue, P. Bruneval, P. H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W. H. Fridman, and F. Pages. 2006a. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313:1960-1964.
 - Galon, J., A. Costes, F. Sanchez-Cabo, A. Kirilovsky, B. Mlecnik, C. Lagorce-Pages, M. Tosolini, M. Camus, A. Berger, P. Wind, F. Zinzindohoue, P. Bruneval, P. H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W. H. Fridman, and F. Pages. 2006b. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313:1960-1964.
 - Galon, J., B.Mlecnik, G.Bindea, H.K.Angell, A.Berger, C.Lagorce, A.Lugli, I.Zlobec, A.Hartmann, C.Bifulco, I.D.Nagtegaal, R.Palmqvist, G.V.Masucci, G.Botti, F.Tatangelo, P.Delrio, M.Maio,

- L.Laghi, F.Grizzi, M.Asslaber, C.D'Arrigo, F.Vidal-Vanaclocha, E.Zavadova, L.Chouchane, P.S.Ohashi, S.Hafezi-Bakhtiari, B.G.Wouters, M.Roehrl, L.Nguyen, Y.Kawakami, S.Hazama, K.Okuno, S.Ogino, P.Gibbs, P.Waring, N.Sato, T.Torigoe, K.Itoh, P.S.Patel, S.N.Shukla, Y.Wang, S.Kopetz, F.A.Sinicrope, V.Scripcariu, P.A.Ascierto, F.M.Marincola, B.A.Fox, and F.Pages. 2014. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J. Pathol.* 232:199-209.
- Galon, J., F.Pages, F.M.Marincola, M.Thurin, G.Trinchieri, B.A.Fox, T.F.Gajewski, and P.A.Ascierto. 2012. The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *J. Transl. Med.* 10:1.
 - Gerard, G.F., J.M.D'Alessio, M.L.Kotewicz, and M.C.Noon. 1986. Influence on stability in *Escherichia coli* of the carboxy-terminal structure of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *DNA* 5:271-279.
 - Gooden, M.J., G.H.de Bock, N.Leffers, T.Daemen, and H.W.Nijman. 2011. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br. J. Cancer* 105:93-103.
 - Grady, W.M., and J.M.Carethers. 2008. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology* 135:1079-1099.
 - Griswold, D.P., and T.H.Corbett. 1975. A colon tumor model for anticancer agent evaluation. *Cancer* 36:2441-2444.
 - Groom, J.R., and A.D.Luster. 2011. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol. Cell Biol.* 89:207-215.
 - Grothey, A., M.M.Sugrue, D.M.Purdie, W.Dong, D.Sargent, E.Hedrick, and M.Kozloff. 2008. Bevacizumab beyond first progression is associated with prolonged overall survival in metastatic colorectal cancer: results from a large observational cohort study (BRiTE). *J. Clin. Oncol.* 26:5326-5334.
 - Guarda, G., M.Hons, S.F.Soriano, A.Y.Huang, R.Polley, A.Martin-Fontecha, J.V.Stein, R.N.Germain, A.Lanzavecchia, and F.Sallusto. 2007. L-selectin-negative. *Nat. Immunol.* 8:743-752.
 - Guidoboni, M., R.Gafa, A.Viel, C.Dogliani, A.Russo, A.Santini, T.L.Del, E.Macri, G.Lanza, M.Boiocchi, and R.Dolcetti. 2001. Microsatellite instability and high content of activated cytotoxic lymphocytes identify colon cancer patients with a favorable prognosis. *Am. J. Pathol.* 159:297-304.
 - Gunderson, L.L., J.M.Jessup, D.J.Sargent, F.L.Greene, and A.K.Stewart. 2010. Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. *J. Clin. Oncol.* 28:264-271.
 - Halama, N., S.Michel, M.Kloor, I.Zoernig, T.Pommerencke, D.M.von Knebel, P.Schirmacher, J.Weitz, N.Grabe, and D.Jager. 2009. The localization and density of immune cells in primary tumors of human metastatic colorectal cancer shows an association with response to chemotherapy. *Cancer Immun.* 9:1.
 - Hamaj, A., P.Pignon, I.Raimbaud, K.Duperrier-Amouriaux, H.Senellart, S.Hiret, J.Y.Douillard, J.Bennouna, M.Ayyoub, and D.Valmori. 2012. Human Th17 immune cells specific for the tumor antigen MAGE-A3 convert to IFN-gamma secreting cells as they differentiate into effector T cells in vivo. *Cancer Res.*
 - Hanahan, D., and R.A.Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
 - Hanahan, D., and R.A.Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-674.
 - Hancock, W.W., B.Lu, W.Gao, V.Csizmadia, K.Faia, J.A.King, S.T.Smiley, M.Ling, N.P.Gerard, and C.Gerard. 2000. Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection. *J. Exp. Med.* 192:1515-1520.
 - He, X., and J.M.Stuart. 1999. Prostaglandin E2 selectively inhibits human CD4+ T cells secreting low amounts of both IL-2 and IL-4. *J. Immunol.* 163:6173-6179.

-
- Hensbergen, P.J., P.G.Wijnands, M.W.Schreurs, R.J.Scheper, R.Willemze, and C.P.Tensen. 2005. The CXCR3 targeting chemokine CXCL11 has potent antitumor activity in vivo involving attraction of CD8+ T lymphocytes but not inhibition of angiogenesis. *J. Immunother.* 28:343-351.
 - Hiraoka, K., M.Miyamoto, Y.Cho, M.Suzuoki, T.Oshikiri, Y.Nakakubo, T.Itoh, T.Ohbuchi, S.Kondo, and H.Katoh. 2006. Concurrent infiltration by CD8+ T cells and CD4+ T cells is a favourable prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma. *Br. J. Cancer* 94:275-280.
 - Hoermannsperger, G., T.Clavel, M.Hoffmann, C.Reiff, D.Kelly, G.Loh, M.Blaut, G.Holzwimmer, M.Laschinger, and D.Haller. 2009. Post-translational inhibition of IP-10 secretion in IEC by probiotic bacteria: impact on chronic inflammation. *PLoS. One.* 4:e4365.
 - Holdenrieder, S., P.Stieber, A.Peterfi, D.Nagel, A.Steinle, and H.R.Salih. 2006. Soluble MICB in malignant diseases: analysis of diagnostic significance and correlation with soluble MICA. *Cancer Immunol. Immunother.* 55:1584-1589.
 - Homey, B., A.Muller, and A.Zlotnik. 2002. Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer? *Nat. Rev. Immunol.* 2:175-184.
 - Hormannsperger, G., T.Clavel, M.Hoffmann, C.Reiff, D.Kelly, G.Loh, M.Blaut, G.Holzwimmer, and D.Haller. 2010. Posttranslational inhibition of proinflammatory chemokine secretion in intestinal epithelial cells: implications for specific IBD indications. *J. Clin. Gastroenterol.* 44 Suppl 1:S10-S15.
 - Hormannsperger, G., M.A.von Schillde, and D.Haller. 2013. Lactocepilin as a protective microbial structure in the context of IBD. *Gut Microbes.* 4:152-157.
 - Houts, G.E., M.Miyagi, C.Ellis, D.Beard, and J.W.Beard. 1979. Reverse transcriptase from avian myeloblastosis virus. *J. Virol.* 29:517-522.
 - Hyun, J.G., G.Lee, J.B.Brown, G.R.Grimm, Y.Tang, N.Mittal, R.Dirisina, Z.Zhang, J.P.Fryer, J.V.Weinstock, A.D.Luster, and T.A.Barrett. 2005. Anti-interferon-inducible chemokine, CXCL10, reduces colitis by impairing T helper-1 induction and recruitment in mice. *Inflamm. Bowel. Dis.* 11:799-805.
 - Ionov, Y., M.A.Peinado, S.Malkhosyan, D.Shibata, and M.Perucho. 1993. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363:558-561.
 - Ito, N., Y.Suzuki, Y.Taniguchi, K.Ishiguro, H.Nakamura, and S.Ohgi. 2005. Prognostic significance of T helper 1 and 2 and T cytotoxic 1 and 2 cells in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 25:2027-2031.
 - Ivanov, I.I., B.S.McKenzie, L.Zhou, C.E.Tadokoro, A.Lepelley, J.J.Lafaille, D.J.Cua, and D.R.Littman. 2006. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126:1121-1133.
 - Janeway CA Jr, T.P.W.M.e.al. 2001. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.* 5th edition. Garland Science, New York.
 - Janssen, K.P. 2003. Murine models of colorectal cancer: studying the role of oncogenic K-ras. *Cell Mol. Life Sci.* 60:495-506.
 - Janssen, K.P., M.Abal, M.F.el, D.Louvard, and S.Robine. 2005. Mouse models of K-ras-initiated carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1756:145-154.
 - Janssen, K.P., P.Alberici, H.Fsihi, C.Gaspar, C.Breukel, P.Franken, C.Rosty, M.Abal, M.F.el, R.Smits, D.Louvard, R.Fodde, and S.Robine. 2006. APC and oncogenic KRAS are synergistic in enhancing Wnt signaling in intestinal tumor formation and progression. *Gastroenterology* 131:1096-1109.
 - Janssen, K.P., F.el-Marjou, D.Pinto, X.Sastre, D.Rouillard, C.Fouquet, T.Soussi, D.Louvard, and S.Robine. 2002. Targeted expression of oncogenic K-ras in intestinal epithelium causes spontaneous tumorigenesis in mice. *Gastroenterology* 123:492-504.
 - Jawad, N., N.Direkze, and S.J.Leedham. 2011. Inflammatory bowel disease and colon cancer. *Recent Results Cancer Res.* 185:99-115.

-
- Jemal, A., R.Siegel, E.Ward, T.Murray, J.Xu, and M.J.Thun. 2007. *Cancer statistics, 2007*. *CA Cancer J. Clin.* 57:43-66.
 - Jiang, D., J. Liang, G. S. Campanella, R. Guo, S. Yu, T. Xie, N. Liu, Y. Jung, R. Homer, E. B. Meltzer, Y. Li, A. M. Tager, P. F. Goetinck, A. D. Luster, and P. W. Noble. 2010. *Inhibition of pulmonary fibrosis in mice by CXCL10 requires glycosaminoglycan binding and syndecan-4*. *J. Clin. Invest* 120:2049-2057.
 - Jiang, Z., Y. Xu, and S. Cai. 2010. *CXCL10 expression and prognostic significance in stage II and III colorectal cancer*. *Mol. Biol. Rep.* 37:3029-3036.
 - Jinqian, T., L.Anting, H.H.Jacobi, C.Glue, C.Jing, L.P.Ryder, H.O.Madsen, A.Svejgaard, P.S.Skov, H.J.Malling, and L.K.Poulsen. 2001. *CXCR3 expression on CD34(+) hemopoietic progenitors induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: II. Signaling pathways involved*. *J. Immunol.* 167:4405-4413.
 - Johnson, I.R., E.J.Parkinson-Lawrence, T.Shandala, R.Weigert, L.M.Butler, and D.A.Brooks. 2014. *Altered Endosome Biogenesis in Prostate Cancer has Biomarker Potential*. *Mol. Cancer Res.*
 - Jumarie, C., and C.Malo. 1991. *Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro*. *J. Cell Physiol* 149:24-33.
 - Kaemmerer, E., C.Klaus, M.K.Jeon, and N.Gassler. 2013. *Molecular classification of colorectal carcinomas: the genotype-to-phenotype relation*. *World J. Gastroenterol.* 19:8163-8167.
 - Kane, M.F., M.Loda, G.M.Gaida, J.Lipman, R.Mishra, H.Goldman, J.M.Jessup, and R.Kolodner. 1997. *Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines*. *Cancer Res.* 57:808-811.
 - Kawada, K., H.Hosogi, M.Sonoshita, H.Sakashita, T.Manabe, Y.Shimahara, Y.Sakai, A.Takabayashi, M.Oshima, and M.M.Taketo. 2007. *Chemokine receptor CXCR3 promotes colon cancer metastasis to lymph nodes*. *Oncogene* 26:4679-4688.
 - Kawai, O., G.Ishii, K.Kubota, Y.Murata, Y.Naito, T.Mizuno, K.Aokage, N.Saijo, Y.Nishiwaki, A.Gemma, S.Kudoh, and A.Ochiai. 2008. *Predominant infiltration of macrophages and CD8(+) T Cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage IV nonsmall cell lung cancer*. *Cancer* 113:1387-1395.
 - Keeley, E.C., B.Mehrad, and R.M.Strieter. 2008. *Chemokines as mediators of neovascularization*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28:1928-1936.
 - Keeley, E.C., B.Mehrad, and R.M.Strieter. 2010. *CXC chemokines in cancer angiogenesis and metastases*. *Adv. Cancer Res.* 106:91-111.
 - Keselman, H.J., and L.Leventhal. 1974. *Concerning the statistical procedures enumerated by Gentile et al.: another perspective*. *J. Appl. Behav. Anal.* 7:643-645.
 - Kim, J., H. Takeuchi, S. T. Lam, R. R. Turner, H. J. Wang, C. Kuo, L. Foshag, A. J. Bilchik, and D. S. Hoon. 2005. *Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival*. *J. Clin. Oncol.* 23:2744-2753.
 - Kim, J.H., and G.H.Kang. 2014. *Molecular and prognostic heterogeneity of microsatellite-unstable colorectal cancer*. *World J. Gastroenterol.* 20:4230-4243.
 - Kim, R., M. Emi, and K. Tanabe. 2005. *Cancer cell immune escape and tumor progression by exploitation of anti-inflammatory and pro-inflammatory responses*. *Cancer Biol. Ther.* 4:924-933.
 - Kim, R., M.Emi, and K.Tanabe. 2007. *Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape*. *Immunology* 121:1-14.
 - Kim, R., M.Emi, K.Tanabe, Y.Uchida, and T.Toge. 2004. *The role of Fas ligand and transforming growth factor beta in tumor progression: molecular mechanisms of immune privilege via Fas-mediated apoptosis and potential targets for cancer therapy*. *Cancer* 100:2281-2291.
 - Knudson, A.G. 2001. *Two genetic hits (more or less) to cancer*. *Nat. Rev. Cancer* 1:157-162.

-
- Kohne, C.H. 2014. *Successes and limitations of targeted cancer therapy in colon cancer. Prog. Tumor Res.* 41:36-50.
 - Kolls, J.K. 2010. *Th17 cells in mucosal immunity and tissue inflammation. Semin. Immunopathol.* 32:1-2.
 - Kotewicz, M.L., J.M.D'Alessio, K.M.Driftmier, K.P.Blodgett, and G.F.Gerard. 1985. *Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in Escherichia coli. Gene* 35:249-258.
 - Kraus, S., I.Nabiochtchikov, S.Shapira, and N.Arber. 2014. *Recent advances in personalized colorectal cancer research. Cancer Lett.* 347:15-21.
 - Kremer, K.N., T.D.Humphreys, A.Kumar, N.X.Qian, and K.E.Hedin. 2003. *Distinct role of ZAP-70 and Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa in the prolonged activation of extracellular signal-regulated protein kinase by the stromal cell-derived factor-1 alpha/CXCL12 chemokine. J. Immunol.* 171:360-367.
 - Kunkel, E.J., and E.C.Butcher. 2002. *Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. Immunity.* 16:1-4.
 - Laghi, L., P.Bianchi, E.Miranda, E.Balladore, V.Pacetti, F.Grizzi, P.Allavena, V.Torri, A.Repici, A.Santoro, A.Mantovani, M.Roncalli, and A.Malesci. 2009. *CD3+ cells at the invasive margin of deeply invading (pT3-T4) colorectal cancer and risk of post-surgical metastasis: a longitudinal study. Lancet Oncol.* 10:877-884.
 - Lasagni, L., M.Francalanci, F. Annunziato, E.Lazzeri, S.Giannini, L.Cosmi, C.Sagrinati, B.Mazzinghi, C.Orlando, E.Maggi, F.Marra, S.Romagnani, M.Serio, and P.Romagnani. 2003. *An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. J. Exp. Med.* 197:1537-1549.
 - Leggett, B., and V.Whitehall. 2010. *Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. Gastroenterology* 138:2088-2100.
 - Lengauer, C., K.W.Kinzler, and B.Vogelstein. 1998. *Genetic instabilities in human cancers. Nature* 396:643-649.
 - Lerner, W.A., E.Pearlstein, C.Ambrogio, and S.Karpatkin. 1983. *A new mechanism for tumor induced platelet aggregation. Comparison with mechanisms shared by other tumor with possible pharmacologic strategy toward prevention of metastases. Int. J. Cancer* 31:463-469.
 - Li, G., L.Tian, J.M.Hou, Z.Y.Ding, Q.M.He, P.Feng, Y.J.Wen, F.Xiao, B.Yao, R.Zhang, F.Peng, Y.Jiang, F.Luo, X.Zhao, L.Zhang, Q.Zhou, and Y.Q.Wei. 2005. *Improved therapeutic effectiveness by combining recombinant CXC chemokine ligand 10 with Cisplatin in solid tumors. Clin. Cancer Res.* 11:4217-4224.
 - Lieberman, D. 2010. *Progress and challenges in colorectal cancer screening and surveillance. Gastroenterology* 138:2115-2126.
 - Lin, Y.H., J.Friederichs, M.A.Black, J.Mages, R.Rosenberg, P.J.Guilford, V.Phillips, M.Thompson-Fawcett, N.Kasabov, T.Toro, A.E.Merrie, R.A.van, H.S.Yoon, J.L.McCall, J.R.Siewert, B.Holzmann, and A.E.Reeve. 2007. *Multiple gene expression classifiers from different array platforms predict poor prognosis of colorectal cancer. Clin. Cancer Res.* 13:498-507.
 - Liu, L., M.K.Callahan, D.Huang, and R.M.Ransohoff. 2005. *Chemokine receptor CXCR3: an unexpected enigma. Curr. Top. Dev. Biol.* 68:149-181.
 - Liu, M., S.Guo, J.M.Hibbert, V.Jain, N.Singh, N.O.Wilson, and J.K.Stiles. 2011. *CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. Cytokine Growth Factor Rev.* 22:121-130.
 - Lizee, G., W.W.Overwijk, L.Radvanyi, J.Gao, P.Sharma, and P.Hwu. 2013. *Harnessing the power of the immune system to target cancer. Annu. Rev. Med.* 64:71-90.
 - Locker, G.Y., S.Hamilton, J.Harris, J.M.Jessup, N.Kemeny, J.S.Macdonald, M.R.Somerfield, D.F.Hayes, and R.C.Bast, Jr. 2006. *ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. J. Clin. Oncol.* 24:5313-5327.

-
- Loetscher, M., B.Gerber, P.Loetscher, S.A.Jones, L.Piali, I.Clark-Lewis, M.Baggiolini, and B.Moser. 1996. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J. Exp. Med.* 184:963-969.
 - Lord, G.M., R.M.Rao, H.Choe, B.M.Sullivan, A.H.Lichtman, F.W.Luscinskas, and L.H.Glimcher. 2005. T-bet is required for optimal proinflammatory CD4+ T-cell trafficking. *Blood* 106:3432-3439.
 - Lord, S.J., R.V.Rajotte, G.S.Korbitt, and R.C.Bleackley. 2003. Granzyme B: a natural born killer. *Immunol. Rev.* 193:31-38.
 - Lothe, R.A., P.Peltomaki, G.I.Meling, L.A.Aaltonen, M.Nystrom-Lahti, L.Pylkkanen, K.Heimdal, T.I.Andersen, P.Moller, T.O.Rognum, and . 1993. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res.* 53:5849-5852.
 - Lu, B., A.Humbles, D.Bota, C.Gerard, B.Moser, D.Soler, A.D.Luster, and N.P.Gerard. 1999. Structure and function of the murine chemokine receptor CXCR3. *Eur. J. Immunol.* 29:3804-3812.
 - Luo, H.Y., and R.H.Xu. 2014. Predictive and prognostic biomarkers with therapeutic targets in advanced colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 20:3858-3874.
 - Luster, A.D. 1998. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* 338:436-445.
 - Luster, A.D. 2002. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 14:129-135.
 - Luster, A.D., R.D.Cardiff, J.A.MacLean, K.Crowe, and R.D.Granstein. 1998. Delayed wound healing and disorganized neovascularization in transgenic mice expressing the IP-10 chemokine. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 110:183-196.
 - Luster, A.D., S.M.Greenberg, and P.Leder. 1995. The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. *J. Exp. Med.* 182:219-231.
 - Maak, M. 2008.
 - Ref Type: Art Work
 - Majumder, S., L.Z.Zhou, P.Chaturvedi, G.Babcock, S.Aras, and R.M.Ransohoff. 1998. p48/STAT-1alpha-containing complexes play a predominant role in induction of IFN-gamma-inducible protein, 10 kDa (IP-10) by IFN-gamma alone or in synergy with TNF-alpha. *J. Immunol.* 161:4736-4744.
 - Maly, J.J., and E.R.Macrae. 2014. Pertuzumab in Combination with Trastuzumab and Chemotherapy in the Treatment of HER2-Positive Metastatic Breast Cancer: Safety, Efficacy, and Progression Free Survival. *Breast Cancer (Auckl.)* 8:81-88.
 - Marisa, L., R.A.de, A.Duval, J.Selves, M.P.Gaub, L.Vescovo, M.C.Etienne-Grimaldi, R.Schiappa, D.Guenot, M.Ayadi, S.Kirzin, M.Chazal, J.F.Flejou, D.Benchimol, A.Berger, A.Lagarde, E.Pencreach, F.Piard, D.Elias, Y.Parc, S.Olschwang, G.Milano, P.Laurent-Puig, and V.Boige. 2013. Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS. Med.* 10:e1001453.
 - Marrogi, A.J., A.Munshi, A.J.Merogi, Y.Ohadike, A.El-Habashi, O.L.Marrogi, and S.M.Freeman. 1997. Study of tumor infiltrating lymphocytes and transforming growth factor-beta as prognostic factors in breast carcinoma. *Int. J. Cancer* 74:492-501.
 - Matsukawa, A., C.M.Hogaboam, N.W.Lukacs, and S.L.Kunkel. 2000. Chemokines and innate immunity. *Rev. Immunogenet.* 2:339-358.
 - Matzinger, P. 1994a. Immunology. Memories are made of this? *Nature* 369:605-606.
 - Matzinger, P. 1994b. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* 12:991-1045.
 - Medzhitov, R., and C.A.Janeway, Jr. 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296:298-300.

-
- Melcher, A., S.Todryk, N.Hardwick, M.Ford, M.Jacobson, and R.G.Vile. 1998. Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression. *Nat. Med.* 4:581-587.
 - Mendel, I., R.N.Kerlero de, and A.Ben-Nun. 1995. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur. J. Immunol.* 25:1951-1959.
 - Menegaz, R.A., M.A.Michelin, R.M.Etchebehere, P.C.Fernandes, and E.F.Murta. 2008. Peri- and intratumoral T and B lymphocytic infiltration in breast cancer. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 29:321-326.
 - Mensink, P.B., J.J.Kolkman, B.J.Van, and J.H.Kleibeuker. 2002. Change in anatomic distribution and incidence of colorectal carcinoma over a period of 15 years: clinical considerations. *Dis. Colon Rectum* 45:1393-1396.
 - Meyerrose, T.E., P.Herrbrich, D.A.Hess, and J.A.Nolta. 2003. Immune-deficient mouse models for analysis of human stem cells. *Biotechniques* 35:1262-1272.
 - Mlecnik, B., G.Bindea, F.Pages, and J.Galon. 2011. Tumor immunosurveillance in human cancers. *Cancer Metastasis Rev.* 30:5-12.
 - Mlecnik, B., M.Tosolini, P.Charoentong, A.Kirilovsky, G.Bindea, A.Berger, M.Camus, M.Gillard, P.Bruneval, W.H.Fridman, F.Pages, Z.Trajanoski, and J.Galon. 2010. Biomolecular network reconstruction identifies T-cell homing factors associated with survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 138:1429-1440.
 - Molon, B., S.Ugel, P.F.Del, C.Soldani, S.Zilio, D.Avella, P.A.De, P.Mauri, A.Monegal, M.Rescigno, B.Savino, P.Colombo, N.Jonjic, S.Pecanic, L.Lazzarato, R.Fruttero, A.Gasco, V.Bronte, and A.Viola. 2011. Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *J. Exp. Med.* 208:1949-1962.
 - Moore, K.M., G.J.Thomas, S.W.Duffy, J.Warwick, R.Gabe, P.Chou, I.O.Ellis, A.R.Green, S.Haider, K.Brouillette, A.Saha, S.Vallath, R.Bowen, C.Chelala, D.Eccles, W.J.Tapper, A.M.Thompson, P.Quinlan, L.Jordan, C.Gillett, A.Brentnall, S.Violette, P.H.Weinreb, J.Kendrew, S.T.Barry, I.R.Hart, J.L.Jones, and J.F.Marshall. 2014. Therapeutic targeting of integrin alphavbeta6 in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 106.
 - Moser, M. 2001. Regulation of Th1/Th2 development by antigen-presenting cells in vivo. *Immunobiology* 204:551-557.
 - Mosmann, T.R., H.Cherwinski, M.W.Bond, M.A.Giedlin, and R.L.Coffman. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136:2348-2357.
 - Mukaida, N., and T.Baba. 2012. Chemokines in tumor development and progression. *Exp. Cell Res.* 318:95-102.
 - Muller, M., S.Carter, M.J.Hofer, and I.L.Campbell. 2010. Review: The chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in neuroimmunity--a tale of conflict and conundrum. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 36:368-387.
 - Murdoch, C., and A.Finn. 2000. Chemokine receptors and their role in vascular biology. *J. Vasc. Res.* 37:1-7.
 - Murphy, K., P.Travers, and M.Walport. *Janeway Immunologie.* 7. Auflage. 2009. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
 - Ref Type: Generic
 - Murphy, P.M. 1994. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 12:593-633.
 - Murphy, P.M., M.Baggiolini, I.F.Charo, C.A.Hebert, R.Horuk, K.Matsushima, L.H.Miller, J.J.Oppenheim, and C.A.Power. 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* 52:145-176.

-
- Musha, H., H.Ohtani, T.Mizoi, M.Kinouchi, T.Nakayama, K.Shiiba, K.Miyagawa, H.Nagura, O.Yoshie, and I.Sasaki. 2005. Selective infiltration of CCR5(+)/CXCR3(+) T lymphocytes in human colorectal carcinoma. *Int. J. Cancer* 116:949-956.
 - Muthuswamy, R., E.Berk, B.F.Junecko, H.J.Zeh, A.H.Zureikat, D.Normolle, T.M.Luong, T.A.Reinhart, D.L.Bartlett, and P.Kalinski. 2012. NF-kappaB hyperactivation in tumor tissues allows tumor-selective reprogramming of the chemokine microenvironment to enhance the recruitment of cytolytic T effector cells. *Cancer Res.* 72:3735-3743.
 - Naito, Y., K. Saito, K. Shiiba, A. Ohuchi, K. Saigenji, H. Nagura, and H. Ohtani. 1998b. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 58:3491-3494.
 - Naito, Y., K. Saito, K. Shiiba, A. Ohuchi, K. Saigenji, H. Nagura, and H. Ohtani. 1998c. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 58:3491-3494.
 - Naito, Y., K. Saito, K. Shiiba, A. Ohuchi, K. Saigenji, H. Nagura, and H. Ohtani. 1998a. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 58:3491-3494.
 - Naschberger, E., R.S.Croner, S.Merkel, A.Dimmler, P.Tripal, K.U.Amann, E.Kremmer, W.M.Brueckl, T.Papadopoulos, C.Hohenadl, W.Hohenberger, and M.Sturzl. 2008. Angiostatic immune reaction in colorectal carcinoma: Impact on survival and perspectives for antiangiogenic therapy. *Int. J. Cancer* 123:2120-2129.
 - Nitsche, U., M.Maak, T.Schuster, B.Kunzli, R.Langer, J.Slotta-Huspenina, K.P.Janssen, H.Friess, and R.Rosenberg. 2011. Prediction of prognosis is not improved by the seventh and latest edition of the TNM classification for colorectal cancer in a single-center collective. *Ann. Surg.* 254:793-800.
 - Nitsche, U., R.Rosenberg, A.Balmert, T.Schuster, J.Slotta-Huspenina, P.Herrmann, F.G.Bader, H.Friess, P.M.Schlag, U.Stein, and K.P.Janssen. 2012. Integrative Marker Analysis Allows Risk Assessment for Metastasis in Stage II Colon Cancer. *Ann. Surg.* 256:763-771.
 - Numasaki, M., M.Watanabe, T.Suzuki, H.Takahashi, A.Nakamura, F.McAllister, T.Hishinuma, J.Goto, M.T.Lotze, J.K.Kolls, and H.Sasaki. 2005. IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *J. Immunol.* 175:6177-6189.
 - Oberg, A., S.Samii, R.Stenling, and G.Lindmark. 2002. Different occurrence of CD8+, CD45RO+, and CD68+ immune cells in regional lymph node metastases from colorectal cancer as potential prognostic predictors. *Int. J. Colorectal Dis.* 17:25-29.
 - Ochs, C. Immunmodulation der Tumorentstehung im Darmtrakt: chemokin-abhängige Rekrutierung von T-Lymphozyten. 2012. Masterarbeit aus dem Studiengang molekulare Biotechnologie der TU München.
 - Ref Type: Thesis/Dissertation
 - Ochs, J.
 - Immunomodulation of carcinogenesis: T cell and CXCR3 mediated immune response in colorectal cancer . 2013. Masterarbeit aus dem Studiengang Ernährungswissenschaften der TU München.
 - Ref Type: Thesis/Dissertation
 - Ogino, S., J.Galon, C.S.Fuchs, and G.Dranoff. 2011. Cancer immunology--analysis of host and tumor factors for personalized medicine. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 8:711-719.
 - Ohmori, Y., and T.A.Hamilton. 1993. Cooperative interaction between interferon (IFN) stimulus response element and kappa B sequence motifs controls IFN gamma- and lipopolysaccharide-stimulated transcription from the murine IP-10 promoter. *J. Biol. Chem.* 268:6677-6688.
 - Ohmori, Y., and T.A.Hamilton. 1997. IL-4-induced STAT6 suppresses IFN-gamma-stimulated STAT1-dependent transcription in mouse macrophages. *J. Immunol.* 159:5474-5482.

-
- Ohmori, Y., R.D.Schreiber, and T.A.Hamilton. 1997. Synergy between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in transcriptional activation is mediated by cooperation between signal transducer and activator of transcription 1 and nuclear factor kappaB. *J. Biol. Chem.* 272:14899-14907.
 - Oladipo, O., S.Conlon, A.O'Grady, C.Purcell, C.Wilson, P.J.Maxwell, P.G.Johnston, M.Stevenson, E.W.Kay, R.H.Wilson, and D.J.Waugh. 2011. The expression and prognostic impact of CXC-chemokines in stage II and III colorectal cancer epithelial and stromal tissue. *Br. J. Cancer* 104:480-487.
 - Ono, S.J., T.Nakamura, D.Miyazaki, M.Ohbayashi, M.Dawson, and M.Toda. 2003. Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111:1185-1199.
 - Pages, F., A.Berger, M.Camus, F.Sanchez-Cabo, A.Costes, R.Molidor, B.Mlecnik, A.Kirilovsky, M.Nilsson, D.Damotte, T.Meatchi, P.Bruneval, P.H.Cugnenc, Z.Trajanoski, W.H.Fridman, and J.Galon. 2005. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 353:2654-2666.
 - Pan, J., M.D.Burdick, J.A.Belperio, Y.Y.Xue, C.Gerard, S.Sharma, S.M.Dubinet, and R.M.Strieter. 2006. CXCR3/CXCR3 ligand biological axis impairs RENCA tumor growth by a mechanism of immunoangiostasis. *J. Immunol.* 176:1456-1464.
 - Parkin, D.M., F.Bray, J.Ferlay, and P.Pisani. 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J. Clin.* 55:74-108.
 - Polakis, P. 1997. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochim. Biophys. Acta* 1332:F127-F147.
 - Pollack, M.S., S.D.Heagney, P.O.Livingston, and J.Fogh. 1981. HLA-A, B, C and DR alloantigen expression on forty-six cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* 66:1003-1012.
 - Porter, J.C., M.Falzon, and A.Hall. 2008. Polarized localization of epithelial CXCL11 in chronic obstructive pulmonary disease and mechanisms of T cell egression. *J. Immunol.* 180:1866-1877.
 - Prall, F., T.Duhrkop, V.Weirich, C.Ostwald, P.Lenz, H.Nitze, and M.Barten. 2004. Prognostic role of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in stage III colorectal cancer with and without microsatellite instability. *Hum. Pathol.* 35:808-816.
 - Proost, P., E.Schutyser, P.Menten, S.Struyf, A.Wuyts, G.Opendakker, M.Detheux, M.Parmentier, C.Durinx, A.M.Lambeir, J.Neyts, S.Lieken, P.C.Maudgal, A.Billiau, and D.J.Van. 2001. Amino-terminal truncation of CXCR3 agonists impairs receptor signaling and lymphocyte chemotaxis, while preserving antiangiogenic properties. *Blood* 98:3554-3561.
 - Qin, S., J.B.Rottman, P.Myers, N.Kassam, M.Weinblatt, M.Loetscher, A.E.Koch, B.Moser, and C.R.Mackay. 1998. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J. Clin. Invest* 101:746-754.
 - Rabin, R.L., M.K.Park, F.Liao, R.Swofford, D.Stephany, and J.M.Farber. 1999. Chemokine receptor responses on T cells are achieved through regulation of both receptor expression and signaling. *J. Immunol.* 162:3840-3850.
 - Rampias, T., A.Giagini, S.Siolos, H.Matsuzaki, C.Sasaki, A.Scorilas, and A.Psyrrri. 2014. RAS/PI3K Crosstalk and Cetuximab Resistance in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin. Cancer Res.*
 - Rani, M.R., G.R.Foster, S.Leung, D.Leaman, G.R.Stark, and R.M.Ransohoff. 1996. Characterization of beta-R1, a gene that is selectively induced by interferon beta (IFN-beta) compared with IFN-alpha. *J. Biol. Chem.* 271:22878-22884.
 - Regulier, E., S.Paul, M.Marigliano, J.Kintz, Y.Poitevin, C.Ledoux, D.Roecklin, G.Cauet, V.Calenda, and H.E.Homann. 2001. Adenovirus-mediated delivery of antiangiogenic genes as an antitumor approach. *Cancer Gene Ther.* 8:45-54.
 - Rohde, F., C.Rimkus, J.Friederichs, R.Rosenberg, C.Marthen, D.Doll, B.Holzmann, J.R.Siewert, and K.P.Janssen. 2007. Expression of osteopontin, a target gene of de-regulated Wnt signaling, predicts survival in colon cancer. *Int. J. Cancer* 121:1717-1723.

-
- Rollins, B.J. 1997. Chemokines. *Blood* 90:909-928.
 - Romagnani, P., F. Annunziato, L. Lasagni, E. Lazzeri, C. Beltrame, M. Francalanci, M. Uguccioni, G. Galli, L. Cosmi, L. Maurezzig, M. Baggiolini, E. Maggi, S. Romagnani, and M. Serio. 2001. Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. *J. Clin. Invest* 107:53-63.
 - Rosenberg, R., H. Friess, M. Ebert, and R. Schmid. *Colorectal Cancer. second edition.* 2010. Freiburg, Falk Foundation e.V.
 - Ref Type: Generic
 - Rossi, D., and A. Zlotnik. 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 18:217-242.
 - Saif, M.W. 2014. Management of a patient with metastatic colorectal cancer and liver metastases. *Case. Rep. Oncol. Med.* 2014:790192.
 - Saiki, R.K., T.L. Bugawan, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich. 1986. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324:163-166.
 - Salcedo, R., J.H. Resau, D. Halverson, E.A. Hudson, M. Dambach, D. Powell, K. Wasserman, and J.J. Oppenheim. 2000. Differential expression and responsiveness of chemokine receptors (CXCR1-3) by human microvascular endothelial cells and umbilical vein endothelial cells. *FASEB J.* 14:2055-2064.
 - Sallusto, F., D. Lenig, C.R. Mackay, and A. Lanzavecchia. 1998. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J. Exp. Med.* 187:875-883.
 - Sato, E., S.H. Olson, J. Ahn, B. Bundy, H. Nishikawa, F. Qian, A.A. Jungbluth, D. Frosina, S. Gnjatic, C. Ambrosone, J. Kepner, T. Odunsi, G. Ritter, S. Lele, Y.T. Chen, H. Ohtani, L.J. Old, and K. Odunsi. 2005. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102:18538-18543.
 - Scapini, P., J.A. Lapinet-Vera, S. Gasperini, F. Calzetti, F. Bazzoni, and M.A. Cassatella. 2000. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol. Rev.* 177:195-203.
 - Schimanski, C.C., S. Schwald, N. Simiantonaki, C. Jayasinghe, U. Gonner, V. Wilsberg, T. Junginger, M.R. Berger, P.R. Galle, and M. Moehler. 2005. Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 11:1743-1750.
 - Schoenborn, J.R., and C.B. Wilson. 2007. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv. Immunol.* 96:41-101.
 - Severin, I.C., J.P. Gaudry, Z. Johnson, A. Kungl, A. Jansma, B. Gesslbauer, B. Mulloy, C. Power, A.E. Proudfoot, and T. Handel. 2010. Characterization of the chemokine CXCL11-heparin interaction suggests two different affinities for glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* 285:17713-17724.
 - Sgadari, C., A.L. Angiolillo, B.W. Cherney, S.E. Pike, J.M. Farber, L.G. Koniaris, P. Vanguri, P.R. Burd, N. Sheikh, G. Gupta, J. Teruya-Feldstein, and G. Tosato. 1996. Interferon-inducible protein-10 identified as a mediator of tumor necrosis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:13791-13796.
 - Sgadari, C., J.M. Farber, A.L. Angiolillo, F. Liao, J. Teruya-Feldstein, P.R. Burd, L. Yao, G. Gupta, C. Kanegane, and G. Tosato. 1997. Mig, the monokine induced by interferon-gamma, promotes tumor necrosis in vivo. *Blood* 89:2635-2643.
 - Shankaran, V., H. Ikeda, A.T. Bruce, J.M. White, P.E. Swanson, L.J. Old, and R.D. Schreiber. 2001. IFN-gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410:1107-1111.
 - Shields, P.L., C.M. Morland, M. Salmon, S. Qin, S.G. Hubscher, and D.H. Adams. 1999. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J. Immunol.* 163:6236-6243.

-
- Siegel, R., C.Desantis, and A.Jemal. 2014. Colorectal cancer statistics, 2014. *CA Cancer J. Clin.* 64:104-117.
 - Sierro, F., C.Biben, L.Martinez-Munoz, M.Mellado, R.M.Ransohoff, M.Li, B.Woehl, H.Leung, J.Groom, M.Batten, R.P.Harvey, A.Martinez, C.R.Mackay, and F.Mackay. 2007. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104:14759-14764.
 - Singh, U.P., S.Singh, R.Singh, Y.Cong, D.D.Taub, and J.W.Lillard, Jr. 2008. CXCL10-producing mucosal CD4+ T cells, NK cells, and NKT cells are associated with chronic colitis in IL-10(-/-) mice, which can be abrogated by anti-CXCL10 antibody inhibition. *J. Interferon Cytokine Res.* 28:31-43.
 - Sinicrope, F.A., R.L.Rego, S.M.Ansell, K.L.Knutson, N.R.Foster, and D.J.Sargent. 2009. Intraepithelial effector (CD3+)/regulatory (FoxP3+) T-cell ratio predicts a clinical outcome of human colon carcinoma. *Gastroenterology* 137:1270-1279.
 - Smit, M.J., P.Verdijk, van der Raaij-Helmer EM, M.Navis, P.J.Hensbergen, R.Leurs, and C.P.Tensen. 2003. CXCR3-mediated chemotaxis of human T cells is regulated by a Gi- and phospholipase C-dependent pathway and not via activation of MEK/p44/p42 MAPK nor Akt/PI-3 kinase. *Blood* 102:1959-1965.
 - Smyth, M.J., G.P.Dunn, and R.D.Schreiber. 2006. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv. Immunol.* 90:1-50.
 - Sobin, L.H., and I.D.Fleming. 1997. TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition (1997). Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer* 80:1803-1804.
 - Soriano, C., V.Mukaro, G.Hodge, J.Ahern, M.Holmes, H.Jersmann, D.Moffat, D.Meredith, C.Jurisevic, P.N.Reynolds, and S.Hodge. 2012. Increased proteinase inhibitor-9 (PI-9) and reduced granzyme B in lung cancer: mechanism for immune evasion? *Lung Cancer* 77:38-45.
 - Soto, H., W.Wang, R.M.Strieter, N.G.Copeland, D.J.Gilbert, N.A.Jenkins, J.Hedrick, and A.Zlotnik. 1998. The CC chemokine 6CKine binds the CXC chemokine receptor CXCR3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:8205-8210.
 - Strieter, R.M., J.A.Belperio, M.D.Burdick, S.Sharma, S.M.Dubinett, and M.P.Keane. 2004. CXC chemokines: angiogenesis, immunoangiostasis, and metastases in lung cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1028:351-360.
 - Strieter, R.M., M.D.Burdick, B.N.Gomperts, J.A.Belperio, and M.P.Keane. 2005. CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16:593-609.
 - Susanto, O., S.E.Stewart, I.Voskoboinik, D.Brasacchio, M.Hagn, S.Ellis, S.Asquith, K.A.Sedelies, P.I.Bird, N.J.Waterhouse, and J.A.Trapani. 2013. Mouse granzyme A induces a novel death with writhing morphology that is mechanistically distinct from granzyme B-induced apoptosis. *Cell Death. Differ.*
 - Syrbe, U., J.Siveke, and A.Hamann. 1999. Th1/Th2 subsets: distinct differences in homing and chemokine receptor expression? *Springer Semin. Immunopathol.* 21:263-285.
 - Szabo, S.J., B.M.Sullivan, S.L.Peng, and L.H.Glimcher. 2003. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 21:713-758.
 - Tager, A.M., R.L.Kradin, P.LaCamera, S.D.Bercury, G.S.Campanella, C.P.Leary, V.Polosukhin, L.H.Zhao, H.Sakamoto, T.S.Blackwell, and A.D.Luster. 2004. Inhibition of pulmonary fibrosis by the chemokine IP-10/CXCL10. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31:395-404.
 - Tenesa, A., and M.G.Dunlop. 2009. New insights into the aetiology of colorectal cancer from genome-wide association studies. *Nat. Rev. Genet.* 10:353-358.
 - Tensen, C.P., J.Flier, S.S.Rampersad, S.Sampat-Sardjoepersad, R.J.Scheper, D.M.Boorsma, and R.Willemze. 1999. Genomic organization, sequence and transcriptional regulation of the human CXCL 11(1) gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1446:167-172.
 - Terzic, J., S.Grivennikov, E.Karin, and M.Karin. 2010. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 138:2101-2114.

-
- Thelen, M. 2001. *Dancing to the tune of chemokines*. *Nat. Immunol.* 2:129-134.
 - Thomsen, A.R., A.Nansen, A.N.Madsen, C.Bartholdy, and J.P.Christensen. 2003. *Regulation of T cell migration during viral infection: role of adhesion molecules and chemokines*. *Immunol. Lett.* 85:119-127.
 - Ticchioni, M., C.Charvet, N.Noraz, L.Lamy, M.Steinberg, A.Bernard, and M.Deckert. 2002. *Signaling through ZAP-70 is required for CXCL12-mediated T-cell transendothelial migration*. *Blood* 99:3111-3118.
 - Tosolini, M., A. Kirilovsky, B. Mlecnik, T. Fredriksen, S. Mauger, G. Bindea, A. Berger, P. Bruneval, W. H. Fridman, F. Pages, and J. Galon. 2011b. *Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer*. *Cancer Res.* 71:1263-1271.
 - Tosolini, M., A. Kirilovsky, B. Mlecnik, T. Fredriksen, S. Mauger, G. Bindea, A. Berger, P. Bruneval, W. H. Fridman, F. Pages, and J. Galon. 2011a. *Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer*. *Cancer Res.* 71:1263-1271.
 - Tougeron, D., P.Maby, N.Elie, E.Fauquembergue, P.F.Le, M.Cornic, J.C.Sabourin, P.Michel, T.Frebouge, and J.B.Latouche. 2013. *Regulatory T lymphocytes are associated with less aggressive histologic features in microsatellite-unstable colorectal cancers*. *PLoS. One.* 8:e61001.
 - Trainer, D.L., T.Kline, F.L.McCabe, L.F.Faucette, J.Feild, M.Chaikin, M.Anzano, D.Rieman, S.Hoffstein, D.J.Li, and . 1988. *Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines*. *Int. J. Cancer* 41:287-296.
 - Trotta, T., S.Costantini, and G.Colonna. 2009. *Modelling of the membrane receptor CXCR3 and its complexes with CXCL9, CXCL10 and CXCL11 chemokines: putative target for new drug design*. *Mol. Immunol.* 47:332-339.
 - Urošević, M., and R.Dummer. 2003. *HLA-G and IL-10 expression in human cancer--different stories with the same message*. *Semin. Cancer Biol.* 13:337-342.
 - Uysal, M., H.Bozcuk, G.S.Sezgin, T.A.Murat, D.Arslan, S.Gunduz, C.H.Senol, M.Ozdogan, and B.Savas. 2014. *Basal proteinuria as a prognostic factor in patients with metastatic colorectal cancer treated with bevacizumab*. *Biomed. Pharmacother.*
 - Valmori, D., C.Raffin, I.Raimbaud, and M.Ayyoub. 2010. *Human RORgammat+ TH17 cells preferentially differentiate from naive FOXP3+Treg in the presence of lineage-specific polarizing factors*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107:19402-19407.
 - van der Bruggen, P., C.Traversari, P.Chomez, C.Lurquin, P.E.De, B.Van den Eynde, A.Knuth, and T.Boon. 1991. *A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma*. *Science* 254:1643-1647.
 - van der Bruggen, P., C.Traversari, P.Chomez, C.Lurquin, P.E.De, B.J.Van den Eynde, A.Knuth, and T.Boon. 2007. *A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma*. *J. Immunol.* 178:2617-2621.
 - Vandercappellen, J., D.J.Van, and S.Struyf. 2008. *The role of CXC chemokines and their receptors in cancer*. *Cancer Lett.* 267:226-244.
 - Vanderstichele, H., and T.Kodadek. 2014. *Roadblocks for integration of novel biomarker concepts into clinical routine: the peptoid approach*. *Alzheimers. Res. Ther.* 6:23.
 - Vicari, A.P., and C.Caux. 2002. *Chemokines in cancer*. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13:143-154.
 - Vidal, K., I.Grosjean, J.P.evillard, C.Gespach, and D.Kaiserlian. 1993. *Immortalization of mouse intestinal epithelial cells by the SV40-large T gene. Phenotypic and immune characterization of the MODE-K cell line*. *J. Immunol. Methods* 166:63-73.
 - Vitetta, E.S., and V.F.Ghetie. 2006. *Immunology. Considering therapeutic antibodies*. *Science* 313:308-309.

-
- Vogelstein, B., E.R.Fearon, S.R.Hamilton, S.E.Kern, A.C.Preisinger, M.Leppert, Y.Nakamura, R.White, A.M.Smits, and J.L.Bos. 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* 319:525-532.
 - Vogelstein, B., E.R.Fearon, S.E.Kern, S.R.Hamilton, A.C.Preisinger, Y.Nakamura, and R.White. 1989. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 244:207-211.
 - Walser, T.C., S.Rifat, X.Ma, N.Kundu, C.Ward, O.Goloubeva, M.G.Johnson, J.C.Medina, T.L.Collins, and A.M.Fulton. 2006. Antagonism of CXCR3 inhibits lung metastasis in a murine model of metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 66:7701-7707.
 - Wang, P., X.Yang, W.Xu, K.Li, Y.Chu, and S.Xiong. 2010. Integrating individual functional moieties of CXCL10 and CXCL11 into a novel chimeric chemokine leads to synergistic antitumor effects: a strategy for chemokine-based multi-target-directed cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 59:1715-1726.
 - Weinberg, R.A. *The biology of cancer.* 2007. New York, Garland Science, Taylor & Francis Group.
 - Ref Type: Generic
 - Weishaupt, C., K.N.Munoz, E.Buzney, T.S.Kupper, and R.C.Fuhlbrigge. 2007. T-cell distribution and adhesion receptor expression in metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.* 13:2549-2556.
 - Weitz, J., M.Koch, J.Debus, T.Hohler, P.R.Galle, and M.W.Buchler. 2005. Colorectal cancer. *Lancet* 365:153-165.
 - Weng, Y., S.J.Siciliano, K.E.Waldburger, A.Sirotina-Meisher, M.J.Staruch, B.L.Daugherty, S.L.Gould, M.S.Springer, and J.A.DeMartino. 1998. Binding and functional properties of recombinant and endogenous CXCR3 chemokine receptors. *J. Biol. Chem.* 273:18288-18291.
 - Winkler, A.E., J.J.Brotman, M.E.Pittman, N.P.Judd, J.S.Lewis, Jr., R.D.Schreiber, and R.Uppaluri. 2011. CXCR3 enhances a T-cell-dependent epidermal proliferative response and promotes skin tumorigenesis. *Cancer Res.* 71:5707-5716.
 - Wong, M.M., and E.N.Fish. 2003. Chemokines: attractive mediators of the immune response. *Semin. Immunol.* 15:5-14.
 - Wong, P., C.W.Severns, N.B.Guyer, and T.M.Wright. 1994. A unique palindromic element mediates gamma interferon induction of mig gene expression. *Mol. Cell Biol.* 14:914-922.
 - Wright, T.M., and J.M.Farber. 1991. 5' regulatory region of a novel cytokine gene mediates selective activation by interferon gamma. *J. Exp. Med.* 173:417-422.
 - Wu, S., K.J.Rhee, E.Albesiano, S.Rabizadeh, X.Wu, H.R.Yen, D.L.Huso, F.L.Brancati, E.Wick, F.McAllister, F.Housseau, D.M.Pardoll, and C.L.Sears. 2009. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat. Med.* 15:1016-1022.
 - Yang, I.P., H.L.Tsai, C.W.Huang, M.Y.Huang, M.F.Hou, S.H.Juo, and J.Y.Wang. 2013. The functional significance of microRNA-29c in patients with colorectal cancer: a potential circulating biomarker for predicting early relapse. *PLoS. One.* 8:e66842.
 - Yang, J., and A.Richmond. 2004. The angiostatic activity of interferon-inducible protein-10/CXCL10 in human melanoma depends on binding to CXCR3 but not to glycosaminoglycan. *Mol. Ther.* 9:846-855.
 - Yang, S.K., L.Eckmann, A.Panja, and M.F.Kagnoff. 1997. Differential and regulated expression of C-X-C, C-C, and C-chemokines by human colon epithelial cells. *Gastroenterology* 113:1214-1223.
 - Yao, Y.F., C.Z.Du, N.Chen, P.Chen, and J.Gu. 2014. Expression of HER-2 in rectal cancers treated with preoperative radiotherapy: a potential biomarker predictive of metastasis. *Dis. Colon Rectum* 57:602-607.
 - Yeruva, S., G.Ramadori, and D.Raddatz. 2008. NF-kappaB-dependent synergistic regulation of CXCL10 gene expression by IL-1beta and IFN-gamma in human intestinal epithelial cell lines. *Int. J. Colorectal Dis.* 23:305-317.
 - Yoshie, O. 2000. Role of chemokines in trafficking of lymphocytes and dendritic cells. *Int. J. Hematol.* 72:399-407.

-
- Yoshie, O., T.Imai, and H.Nomiyama. 1997. Novel lymphocyte-specific CC chemokines and their receptors. *J. Leukoc. Biol.* 62:634-644.
 - Zavoral, M., S.Suchanek, O.Majek, P.Fric, P.Minarikova, M.Minarik, B.Seifert, and L.Dusek. 2014. Colorectal cancer screening: 20 years of development and recent progress. *World J. Gastroenterol.* 20:3825-3834.
 - Zhang, L., J.R.Conejo-Garcia, D.Katsaros, P.A.Gimotty, M.Massobrio, G.Regnani, A.Makrigiannakis, H.Gray, K.Schlienger, M.N.Liebman, S.C.Rubin, and G.Coukos. 2003. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 348:203-213.
 - Zhang, R., H.Zhang, W.Zhu, A.B.Pardee, R.J.Coffey, Jr., and P.Liang. 1997. Mob-1, a Ras target gene, is overexpressed in colorectal cancer. *Oncogene* 14:1607-1610.
 - Zhou, G., Z.Lu, J.D.McCadden, H.I.Levitsky, and A.L.Marson. 2004. Reciprocal changes in tumor antigenicity and antigen-specific T cell function during tumor progression. *J. Exp. Med.* 200:1581-1592.
 - Zipin-Roitman, A., T.Meshel, O.Sagi-Assif, B.Shalmon, C.Avivi, R.M.Pfeffer, I.P.Witz, and A.Ben-Baruch. 2007. CXCL10 promotes invasion-related properties in human colorectal carcinoma cells. *Cancer Res.* 67:3396-3405.
 - Zitvogel, L., O.Kepp, L.Aymeric, Y.Ma, C.Locher, N.F.Delahaye, F.Andre, and G.Kroemer. 2010. Integration of host-related signatures with cancer cell-derived predictors for the optimal management of anticancer chemotherapy. *Cancer Res.* 70:9538-9543.
 - Zitvogel, L., O.Kepp, and G.Kroemer. 2011. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 8:151-160.
 - Zlotnik, A., and O.Yoshie. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 12:121-127.

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Adenom-Karzinom Sequenz.	- 3 -
Abbildung 2: schematische Darstellung des Dickdarms und die prozentuale Verteilung der CRC.	- 6 -
Abbildung 3: Dickdarmkrebstumorstadien UICC I-IV.	- 7 -
Abbildung 4: Der Tumor als komplexes Gewebe.	- 9 -
Abbildung 5: Das Tumormikromilieu.	- 10 -
Abbildung 6: Chemokine und deren Rezeptoren.	- 16 -
Abbildung 7: Schematische Darstellung der verschiedenen Spleißvarianten des CXCR3 Rezeptors.	- 18 -
Abbildung 8: Modell der Immunmodulation durch interferon-regulierte Chemokine.	- 23 -
Abbildung 9: Trennwert Analyse.	- 62 -
Abbildung 10: Relative Expression von Chemokinen und Granzym B unterteilt nach UICC Stadien im Vergleich zu Normalgewebe.	- 65 -
Abbildung 11: mRNA Expressionslevel von CXCL9, 10, 11 und Granzym B in Normal-, Tumor- und Metastasengewebe.	- 66 -
Abbildung 12: Kaplan-Meier Überlebenskurven für das Gesamtüberleben.	- 67 -
Abbildung 13: Kaplan-Meier Überlebenskurven bezogen auf die Genexpression und Rezidivbildung.	- 69 -
Abbildung 14: Korrelationsmatrix der Granzym B und CXC-Chemokin Expression.	- 70 -
Abbildung 15: Einfluss von CXCL10 auf das Migrationsverhalten verschiedener humaner CRC-Zelllinien.	- 72 -
Abbildung 16: Proliferationsanalyse humaner Zelllinien und der Einfluss auf die Proliferation nach Zugabe von CXCL10.	- 73 -
Abbildung 17: mRNA Expressionslevel von CXCL11 in verschiedenen humanen CRC-Zelllinien.	- 75 -
Abbildung 18: CXCL11 Proteinmenge in humanen CRC-Zelllinien mit und ohne Stimulation.	- 76 -
Abbildung 19: Immunfluoreszenz Färbung zweier verschiedener CRC-Gewebe mit einem Antikörper gegen humanes CXCL11 gerichtet.	- 77 -
Abbildung 20: CD31 IHC Färbung zweier verschiedener CRC-Gewebe.	- 79 -
Abbildung 21: CD31+ Fläche in Patientenproben.	- 79 -
Abbildung 22: IHC Färbung zweier verschiedener CRC-Gewebe gegen CD3.	- 80 -
Abbildung 23: CXCL11 Expression in Korrelation zu CD3+ Zellen.	- 80 -
Abbildung 24: Immunfluoreszenzfärbung von Tumorproben gegen CD4, CD8 und FoxP3.	- 81 -
Abbildung 25: Quantifizierung von T-Zell Subpopulationen in Tumorgeweben.	- 82 -
Abbildung 26: Analyse der Genexpression in Tumorproben mit viel und wenig CXCL11.	- 83 -
Abbildung 27: Ex vivo Organkultur und der Einfluss von IFN γ und TNF α auf die CXCL11 Proteinproduktion.	- 84 -
Abbildung 28: Expression von Granzym B, sowie der Chemokine CXCL9 und CXCL10 unterteilt nach verschiedenen genetischen Mausmodellen mit jeweils Tumor- und Normalgewebe im Vergleich.	- 87 -

Abbildung 29: Proteinmenge von CXCL10 im Kulturmedium von Mode-K, CMT93 und CT26-Zellen mit und ohne Zugabe von IFN γ .	- 88 -
Abbildung 30: Proteinkonzentration von CXCL10 im Zellkulturmedium von CT26-Zellen.	- 89 -
Abbildung 31: Immunzellinfiltrate auf RNA Ebene.	- 90 -
Abbildung 32: Ex vivo Organkultur von Tumorgewebe verschiedener genetischer Mausmodelle.	- 92 -
Abbildung 33: Migrationsanalyse von CT26-Zellen.	- 93 -
Abbildung 34: XTT Assay von CT26-Zellen.	- 94 -
Abbildung 35: Darstellung der für die orthotope Zellimplantation verwendeten Vektoren.	- 95 -
Abbildung 36: CXCL10 ELISA der ausgewählten Klone.	- 96 -
Abbildung 37: XTT Assay von parentalen CT26-Zellen und den generierten stabilen Klonen.	- 97 -
Abbildung 38: Hämatoxylin-Eosin-Färbung vom proximalen und distalen Kolon.	- 98 -
Abbildung 39: Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Tumorproben.	- 99 -
Abbildung 40: Größe der Tumore im orthotopen Modell.	- 101 -
Abbildung 41: CXCL10 Konzentration im Serum der operierten Mäuse.	- 103 -
Abbildung 42: Immunfluoreszenzfärbung von CD3+-Zellen in Balb/c Kolon- und Tumorgewebe.	- 104 -
Abbildung 43: Immunfluoreszenzfärbung von CD3+-Zellen in Tumorgewebe.	- 105 -
Abbildung 44: Relative Expression der Immunzelltranskripte des orthotopen Mausmodells von Tumoren, die kein zusätzliches CXCL10 exprimieren.	- 106 -
Abbildung 45: Modell der Immunmodulation durch interferonregulierte CXC-Chemokine.	- 137 -
Abbildung 47: pBUDCS4.1 Plasmid.	- 169 -
Abbildung 48: pcDNA3.1 / Hygro / lacZ	- 169 -

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zelllinien	- 36 -
Tabelle 2: Bakterien	- 36 -
Tabelle 3: Mausstämme	- 37 -
Tabelle 4: Antikörper für die Immunfluoreszenz	- 40 -
Tabelle 5: Antikörper für die Immunhistochemie	- 41 -
Tabelle 6: Oligonukleotidtablelle für Genotypisierungen	- 42 -
Tabelle 7: Oligonukleotidtablelle für Roche UPL qRT-PCR.	- 43 -
Tabelle 8: Oligonukleotidtablelle Sybr green qRT-PCR.	- 43 -
Tabelle 9: Oligonukleotide für Klonierungen.	- 44 -
Tabelle 10: Oligonukleotidtablelle für Sequenzierungen.	- 44 -
Tabelle 11: Übersicht Patientendaten.	- 61 -
Tabelle 12: Multivariate Analyse der Patientendaten.	- 63 -
Tabelle 13: Spearman-Rho Analyse.	- 70 -
Tabelle 14: Untersuchung der Patientengruppen des Stadiums UICC II mit viel bzw. wenig intratumoralem CXCL11 in Bezug auf Rezidivbildung.	- 71 -
Tabelle 15: Anzahl makroskopisch nachweisbarer Tumore pro Maus.	- 100 -
Tabelle 16: Anzahl der Tiere pro Gruppe, die makroskopische Tumore aufwiesen.	- 102 -

9.3 Abkürzungsverzeichnis

Abgesehen von in deutscher Schriftsprache üblichen Abkürzungen wurden folgende Kürzel verwendet:

(k)-ras	(kirsten) <i>rat sarcome viral oncogene homolog</i>
β-ME	β-Mercaptoethanol
μ	mikro
Abb.	Abbildung
AJCC	American Joint Committee on Cancer
Apc	<i>adenomatous polyposis coli</i>
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	complementary DNA
CI	Konfidenzintervall
CIN	chromosomale Instabilität
CMV	Cytomegalovirus
CRC	<i>colorectal carcinoma</i> (kolorektales Karzinom)
Ct	Zykluszahl
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
CXCL9	MIG
CXCL10	IP10
CXCL11	ITAC
CXCR3	Chemokinrezeptor 3
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
DC	dendritische Zellen
DCC	<i>deleted in colon cancer</i>
dCTP	Desoxycytidin-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanidin-Triphosphat
DGK/AWMF	Deutsche Krebsgesellschaft / Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Mischung aller vier Desoxynukleosid-Triphosphate
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF-1 α	<i>elongation factor-1 alpha</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FCS/FKS	fötale Kälberserum
fwd	<i>forward</i>
GAG	Glykosaminoglykan
GF	Gesichtsfeld
Gln	L-Glutamin
GZMB	Granzym B
H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser
HE	Hämatoxylin-Eosin
HR	<i>hazard ratio</i> (Risikoquotient)
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IP10	<i>Interferon-γ inducible protein 10</i>
IRSE	<i>Interferon-responsive sequence element</i>
ITAC	<i>Interferon-γ inducible T-cell α-chemoattractant</i>
kB	Kilobase
kDa	Kilodalton
Les	Läsion
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
mA	Milliampère
MCM	<i>Main Culture Medium</i>
MDSC	<i>myeloid-derived suppressor cells</i>
MHC-I	<i>Major Histocompatibility Complex I</i>
MIG	<i>monokine induced by interferon-γ</i>
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MW	Mittelwert
mRNA	messenger (Boten-) Ribonukleinsäure

n	nano
N	Normalgewebe
nd	nicht detektierbar
NF- κ B1	<i>nuclear factor kappa B1</i>
NF- κ B2	<i>nuclear factor kappa B2</i>
NK	natürliche Killerzellen
p	Signifikanzwert
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
PI-9	Proteinase Inhibitor-9
qRT-PCR	<i>quantitative real time</i> Polymerase Kettenreaktion
Rag1	<i>recombination activating gen 1</i>
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROR γ t/Rorc	<i>retinoid-related orphan nuclear receptor</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institut Medium
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>real time</i> Polymerase Kettenreaktion
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>
SPF/SOPF	spezifisch pathogenfrei
Strep	Streptomycin
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
T-bet	Transkriptionsfaktor T-box Protein 21
TCM	<i>Tissue Collection Medium</i>
TLR3	<i>Toll like receptor 3</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNM	Tumorlast, Lymphknoten, Metastasen
Treg	regulatorische T-Zellen
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>

üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vs	versus
Wt	Wildtyp
IRE-1	<i>inositol-requiring kinase</i>

9.4 Vektorkarten

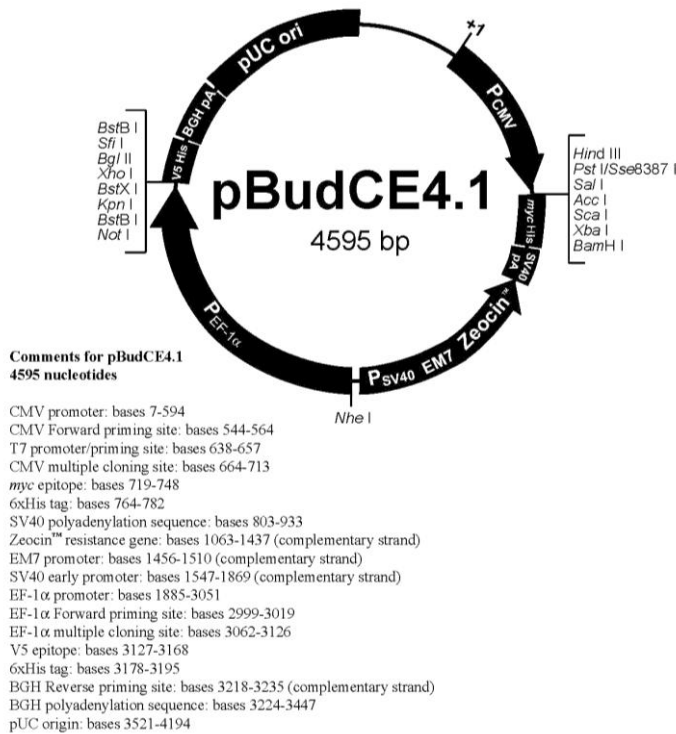


Abbildung 46: pBUDCS4.1 Plasmid.

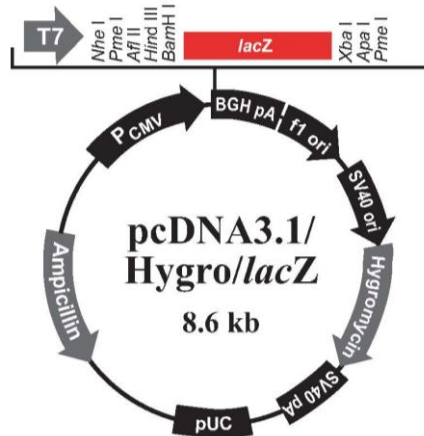


Abbildung 47: pcDNA3.1 / Hygro / lacZ