Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Chirurgie
Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie
Ärztliche Direktorin: Frau Prof. Dr. med. Henne-Bruns

Expression von Interleukin-4, Interleukin-4 Rezeptor, Interleukin-13 und Interleukin-13 Rezeptor in gastrointestinalen Tumoren und deren Rolle als prognostischer Faktor

–

Eine retrospektive Untersuchung am Tumorgewebe von 454 Patienten

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Eingereicht von

Philipp Paul Braun
Tübingen

2012

Amtierender Dekan: Prof. Dr. T. Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Kornmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Kratzer

Tag der Promotion: 26. April 2013

Meinen Eltern gewidmet

Gudrun und Willi

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I
Abkürzungsverzeichnis III
1. Einleitung 1
1.1. Das kolorektale Karzinom 1
1.2. Das Magenkarzinom 1
1.3. Interleukin-4 und Interleukin- 4 Rezeptor 2
1.4. Interleukin- 13 und Interleukin- 13 Rezeptor 6
1.5. Grenzen des UICC Stadiums als Prognosefaktor 9
1.6. Ziel der Studie 10
2. Patienten, Material und Methoden 11
2.1. Patienten 11
2.2. Material, Reagenzien und Gebrauchslösungen 12
2.3. Methoden 14
2.3.1. Prinzip und Verfahren der Immunhistochemie 14
2.3.2. Interpretation der Immunhistochemie 16
2.4. Statistik 17
3. Ergebnisse 19
3.1. Charakterisierung der Patientengruppen 19
3.1.1. Analyse der Patienten mit einem kolorektalen Karzinom 19
3.1.2. Analyse der Patienten mit einem Magenkarzinom 19
3.2. Etablierung und Charakterisierung der Immunhistochemie 21
3.2.1. Etablierung der Immunhistochemie 21
3.2.2. Charakterisierung der Immunhistochemie 22
3.2.3. Beispiele für die Immunhistochemie 24
3.3. Analyse der Interleukin Expression und deren Rezeptoren bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen und Magenkarzinomen 28
3.3.1. IL-4 bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen 28
3.3.2. IL-4 bei Patienten mit Magenkarzinomen 30
3.3.3. IL-4 Rezeptor bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen 32
3.3.4. IL-4 Rezeptor bei Patienten mit Magenkarzinomen 34
3.3.5. IL-13 bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen 36
3.3.6. IL-13 bei Patienten mit Magenkarzinomen 38
3.3.7. IL-13 Rezeptor bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen 40
3.3.8. IL-13 Rezeptor bei Patienten mit Magenkarzinomen 42

3.4. Nicht dargestellte Ergebnisse 44
3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse bei kolorektalen Karzinomen 45
3.6. Zusammenfassung der Ergebnisse bei Magenkarzinomen 45
4. Diskussion 46
5. Zusammenfassung 55
6. Literaturverzeichnis 57
Anhang 66
Danksagung 70
Lebenslauf 71

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Complex
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AK	Antikörper
APES	Aminopropyltriethoxysilan
BALB/c	Bestimmter Stamm von Albinomäusen
BSF-1	B-Zell-stimulierender Faktor-1
CD1-KO	Cluster of differentiation 1 knock out
CD	Cluster of differentiation
CEA	Karcinoembryonales Antigen
CTL	Zytotoxische T- Lymphozyten
DAB	Diaminobenzidin
DFS	Desease free survival
DNA	Desoxyribonucleinacid (dt. Desoxyribonukleinsäure)
G	Grading
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
IFN-gamma-KO	Interferon gamma knock out
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-like growth factor
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IRS	Insulin Rezeptor Substrat/Protein
JAK	Janus-Kinase
5-JÜR	5- Jahres Überlebensrate
kDa	Kilo-Dalton

MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	Messenger ribonucleic acid (dt. mRibonukleinsäure)
n	Anzahl
NF-kB	Nuclear factor 'kappa' of B-cells
NKT	Natürliche Killer-T-Zellen
PAP-PEN	Wasserabweisender Stift für Immunhistochemien
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI	Phosphatidylinositol
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol 3 – Kinase
pM	Pathologisches Fernmetastasenstadium
pN	Pathologisches Lymphknotenstadium
pT	Pathologisches Tumorstadium
R	Rezeptor
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TGF-β	Tumor growth factor-β
TIL	Tumor infiltrating lymphocyte
TNFα	Tumor necrosis factor α
TNM-Stadium	Gebräuchliches Tumorklassifikationssystem
UICC-Stadium	Tumorstadium nach Union Internationale Contre le Cancer

1. Einleitung

1.1. Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Adenokarzinom stellt bei Männern nach Bronchial- und Prostatakarzinom den dritthäufigsten, bei Frauen nach dem Mammakarzinom den zweithäufigsten Tumor dar und ist nach dem Bronchialkarzinom die zweithäufigste Todesursache an einem Malignom in Deutschland. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland beträgt ca. 77/100.000 Einwohner bei Frauen und ca. 90/100.000 Einwohner bei Männern, wobei in dieser Studie Kolon- und Rektumkarzinome zusammengefasst wurden. Die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms steigt ab dem 40. Lebensjahr an, wobei Männer durchschnittlich mit 69 und Frauen mit 75 Jahren erkranken. Die Mortalitätsrate des kolorektalen Karzinoms in Deutschland liegt für Männer bei 32 und für Frauen bei 21 auf 100.000 Einwohner. Nach dem Robert-Koch-Institut beläuft sich die Zahl der Neuerkrankungen in Deutschland bei Männern und Frauen gleichermaßen jeweils auf etwas mehr als 35.000 [Husmann et al. 2010].

Die Prognose des kolorektalen Karzinoms hängt in erster Linie davon ab, ob der Tumor makroskopisch und mikroskopisch komplett entfernt werden konnte. Neben dem TNM- Stadium gibt es eine Reihe von weiteren morphologischen Kriterien, die eine prognostische Aussage zulassen. Bei kurativ resezierten Karzinomen stellt das pathologische, postoperative Tumorstadium (UICC-Stadium) den entscheidenden Prognosefaktor dar [Ruf et al. 2005]. Prognostisch ungünstig ist eine Invasion lymphatischer und venöser Gefäße, eine perineuronale Tumorinfiltration sowie die Entdifferenzierung der Tumorzellen [Ruf et al. 2005]. Die aktuellen 5-Jahres-Überlebensraten (5-JÜR) schwanken zwischen 50% und 60% je nach Tumorstadium und Therapie [Husmann et al. 2010].

1.2. Das Magenkarzinom

Das Adenokarzinom des Magens ist noch immer die zweithäufigste Krebstodesursache weltweit. Insbesondere in vielen asiatischen Ländern und Schwellenländern zählt das Magenkarzinom zu den häufigsten Krebsarten. Einer altersstandardisierten Inzidenz von 15 Neuerkrankungen pro 100.000

Einwohnern[1] in Deutschland steht in Ostasien eine Neuerkrankungsrate von bis zu 62 pro 100.000 Einwohnern gegenüber [Brenner et al. 2009]. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland beträgt ca. 17/100.000 Einwohner bei Frauen und ca. 26/100.000 Einwohner bei Männern. Seit mehr als 30 Jahren ist in Deutschland wie auch in anderen Industrienationen ein stetiger Rückgang der Erkrankungs- und Sterberaten an Magenkrebs zu beobachten. Die altersstandardisierten Inzidenz- und Mortalitätsraten in Deutschland nahmen zwischen 1980 und 2006 um 20% bis 50%, die jährliche Zahl der Sterbe- und Erkrankungsfälle sogar zwischen 45% und 65% ab. Die aktuelle Mortalitätsrate des Magenkarzinoms in Deutschland liegt für Männer bei 12 und für Frauen bei 5 auf 100.000 Einwohner. Nach dem Robert Koch-Institut beläuft sich die Zahl der Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland bei Männern auf ca. 10.500 und bei Frauen auf etwas mehr als 7.000 [Husmann et al. 2010].

Wie auch beim kolorektalen Karzinom ist vor allem die makroskopische sowie mikroskopische Resektion des Tumors für die Prognose ausschlaggebend. Jedoch ist eine R0- Resektion (Entfernung eines Tumors im mikroskopisch gesunden Gewebe) beim Magenkarzinom nur in 30% möglich und bei 40% der Patienten ist das Karzinom bereits bei Diagnosestellung inoperabel [Brenner et al. 2009]. Ebenso wie bei kolorektalen Tumoren stellt das postoperative UICC-Stadium den entscheidenden Prognosefaktor dar. Das Magenkarzinom wird nach dem TNM- Stadium einheitlich klassifiziert. Aus den T-, N- und M- Kategorien werden vier UICC- Tumorstadien abgeleitet. Die Prognose im Vergleich zum kolorektalen Karzinom ist jedoch eher schlecht, bei einer 5-JÜR von um die 30%. Für die meisten Patienten ist damit eine Chemotherapie die wichtigste Therapieoption [Husmann et al. 2010].

1.3. Interleukin-4 und Interleukin- 4 Rezeptor

Interleukin-4 (IL-4), früher auch bekannt als B-Zell-stimulierender Faktor-1(BSF-1), ist ein monomeres, ungefähr 18 kDa großes Zytokin, welches zu pleiotropen Effekten während der Immunantwort führt und viele seiner biologischen Aktivitäten mit Interleukin 13 (IL-13) teilt [Benczik et al. 2004, Chomarat et al. 1998, Yokota et

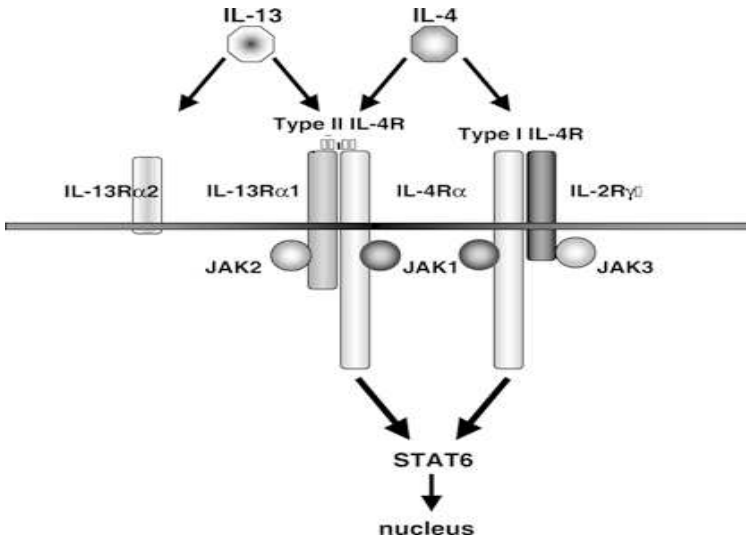
[1] Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird auf die gleichzeitige Verwendung männlicher und weiblicher Sprachformen verzichtet. Das jeweils nicht genannte Geschlecht gilt jedoch als einbezogen.

al. 1986]. Es ist ein glykosyliertes Polypeptid mit drei Disulfidbrücken und wird aus einer konservierten Typ II-Vier-Helix-Bündel-Struktur und einem zweisträngigen β-Faltblatt gebildet, dabei handelt es sich um ein monomeres Molekül, das aus 129 Aminosäuren besteht [Redfield et al. 1991]. Interessanterweise teilt Humanes IL-4 55%, 39% und 43% seiner Aminosäure Sequenz mit Rinder-, Maus- und Ratten-Interleukin, allerdings sind diese Interleukine speziesspezifisch in ihren Aktivitäten [Leitenberg et al. 1988, Mosman et al. 1987]. Hauptsächlich wird IL-4 von einer Subpopulation aktivierter T-Zellen, den Th-2 CD4+ - Helferzellen, produziert. Außerdem sezernieren auch Th-1-Zellen, Mastzellen, Eosinophile und Basophile geringe Mengen von IL-4 [Benczik et al. 2004, Chomarat et al. 1998]. Zuerst wurde es als Verstärker der DNA- Synthese von isolierten ruhenden B-Zellen von Mäusen beschrieben [Paul 1991, Puri et al. 1993]. Zum einen wird die Differenzierung, die Proliferation, das Überleben und der Immunglobulin-Klassen-Wechsel zu IgG1, IgG4 und IgE von aktivierten B-Zellen, zum anderen die Expression von Klasse II Major Histocompatibility Complex (MHC) Antigenen und die Expression von niedrig-affinen IgE-Rezeptoren in ruhenden B-Zellen durch IL-4 begünstigt. Außerdem inhibiert IL-4 die Synthese von IgM, IgG3, IgG2a und IgG2b [Keegan et al. 1994, Paul 1991]. Zusätzlich stimuliert IL-4 naive CD4+ T-Zellen zur Annahme des Th-2 Phänotyps; Mastzellen, Eosinophile und Basophile zur Chemotaxis; sowie die Proliferation und Aktivierung von epithelialen Zellen [Grone 2002, Rosenberg et al. 2007, Ryan et al. 2007].

Die biologische Aktivität von IL-4 wird über einen spezifischen IL-4 Rezeptor (Typ I- Rezeptor), der mit einer Dichte von 100 – 5000 Kopien/Zelle exprimiert wird, vermittelt. Mehrere Studien konnten zeigen, dass IL-4 seine Effekte über mehrere Rezeptor-Komplexe vermittelt [Mueller et al. 2002, Nelms et al. 1999]. Der Typ I IL-4 Rezeptor besteht aus dem IL-4Rα und dem IL-2Rγ (γ_c), welcher auf Zellen, die sich von hämatopoetischen Stammzellen ableiten, exprimiert wird. Der Typ II Rezeptor, bestehend aus IL-4Rα und einer IL-13Rα1 Kette (auch bekannt als IL-13Rα'), wird auch von IL-13 benutzt und nur auf Zellen mit nicht-hämatopoetischer Herkunft exprimiert [Kawakami et al. 2002, Nelms et al. 1999]. Der Typ II IL-4R kann auf vielen verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden, unter anderem auf malignen Melanomen [Obiri et al. 1994b], Brusttumoren [Obiri et al. 1994b], Ovarialtumoren [Obiri et al. 1994b], Mesotheliomen [Beseth et al. 2004], Nierenzelltumoren [Obiri et al. 1994a],

Pankreastumoren [Propopchuk et al. 2005], Plattenepithelkarzinomen [Kawakami et al. 2003] und AIDS assoziierten Karposi-Sarkomen [Tamburini et al. 2007].

Obwohl Zytokinrezeptoren in ihren zytoplasmatischen Domänen keine Tyrosinkinasen präsentieren, verbinden sie sich unter Stimulation mit zytoplasmatischen Tyrosinkinasen, um daraufhin Liganden aktivieren zu können. Somit resultiert eine Stimulation des Rezeptors mit IL-4 in einer schnellen Aktivierung von Mitgliedern der Janus-Kinasen (JAK) Familie [Jiang et al. 2000], Phosphorylierung des Tyrosins in Proteinen des Insulin Rezeptor Substrat (IRS) Komplexes und Aktivierung von Phosphatidylinositol 3-Kinasen (PI3-Kinase), welche unter anderem die mitogenen Effekte von Insulin und insulinähnlichen Wachstumsfaktoren (IGFs) regulieren [Jiang et al. 2000]. Zusätzlich zu diesen JAKs wurde die Src- Familien Kinase Fes identifiziert, welche sich mit dem IL4-Rα unter IL-4 Stimulation verbindet und dadurch aktiviert wird. Deren genaue Funktionsweise ist jedoch aber noch nicht ausreichend geklärt. Ein weiterer wichtiger Signalweg wird über Signal Transducer and Activator of Transcriptions (STATs) reguliert, welche nach der Bindung eines Signalmoleküls an den Rezeptor als second Messenger fungieren [Müller-Ladner et al. 2000] (vgl. Abbildung 1).



Legende: *IL: Interleukin, JAK: Janus Kinase, STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription*

Mit freundlicher Genehmigung von: Springer Science + Business Media:
[Terabe et al. 2004, S. 80, Fig. 1]

Abbildung 1: IL-4 und IL-13 Signalkaskade

Phosphoryliertes STAT 6 dimerisiert und transloziert zum Nukleus, wo es viele der transkriptionsfördernden Wirkungen von IL-4 initiiert, unter anderem auch den Immunoglobulin-Klassen-Switch zu IgE und die Differenzierung von naiven zu reifen Th-2-Zellen. Eine Interaktion des SOCS (Suppressor of Cytokine Signaling) Proteins mit dem IL-4 R resultiert wiederum in der Unterdrückung von IL-4 induzierter STAT6 Aktivierung [Seki et al. 2002]. Neuere Studien konnten zeigen, dass die Insulin Rezeptor Substrat (IRS)- Komplex-Aktivierung, verbunden mit einer Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-Kinase) zu einer Aktivierung des Akt- Signalweges führt. Dieser scheint eine Rolle bei der Regulation der Apoptose zu spielen und über ihn werden von IL-4 anti-apototische Effekte vermittelt [Lin et al. 2007]. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Bindung von IL-4 an seinem Rezeptor folgende wichtige Signalwege induziert: IRS-Komplex-Aktivierung, STAT6-Aktivierung und STAT1/STAT3-Aktivierung. Die Aktivierung des IRS-Komplexes führt zu Zellproliferation, der STAT6 Signalweg führt zur Regulation des Immunsystems (T-Helfer-Zell Differenzierung und IgE-Klassen-Switch) und die Aktivierung von STAT1/STAT3 ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

Im Gegensatz zu der wachstumsstimulierenden Wirkung des IL-4 auf Lymphozyten wurde demonstriert, dass es leichte aber direkte inhibitorische Effekte auf das Wachstum von hämatopoetischen und nichthämatopoetischen Tumorzellen in vivo und in vitro vermittelt [Chang et al. 2000]. Ebenso kann IL-4 das Wachstum von reifen humanen Astrozyten [Estes et al. 1993], das Wachstum von glatten Gefäßmuskelzellen [Vadiveloo et al. 1994], die Angiogenese von Kapillaren [Nishimura et al. 2008] und die osteoklastische Resorption der Knochenmatrix [Stein et al. 2008] hemmen.

Diese hemmende Wirkung konnte auch bei malignen Melanomen [Noffz et al. 1998], bei malignen Non-Hodgking-Lymphomen [DeFrance et al. 1992], bei Fibrosarkomen [Noffz et al. 1998, Eguchi et al. 2005] und bei Kolon- [Rodolfo et al. 1999], Nieren- [Golumbek et al. 1999], Magen- [Morisaki et al. 1992], Lungen- [Chi et al. 2010] und Brusttumoren [Pericle et al.1994] demonstriert werden.

Doch es existieren auch einige Studien, die eher eine wachstumsfördernde Wirkung von IL-4 vermuten. Myers und seine Koautoren konnten eine Stimulation des Wachstums von Plattenepithelkarzinomen durch IL-4 nachweisen [Myers et al. 1996]. Shurin et al. trugen die Daten von mehreren Studien zusammen, die das

Th-1/Th-2 Verhältnis bei Tumorpatienten untersuchten. Es zeigt sich, dass IL-4 sowie andere Th-2 Zytokine bei verschiedenen Tumorentitäten normalerweise hochreguliert werden, dies konnte bei Nierenzelltumoren, nicht-kleinzelligen Lungentumoren, Prostatatumoren, Kolontumoren, Brusttumoren und anderen Tumorarten nachgewiesen werden [Shurin et al. 1999]. Onishi et al. konnten sogar einen Zusammenhang der in Nierenzelltumoren sezernierten IL-4 Menge mit dem Grading und der Stadieneinteilung nach TNM beweisen [Onishi et al. 1999].
Über dosisabhängige wachstumsstimulierende Wirkungen des IL-4 wurden auch beim Burkitt Lymphom [Chang et al. 2000] und beim Hodgkin Lymphom [Newcom et al. 1992] berichtet. Des Weiteren spielt IL-4 eine wichtige Rolle in der Entstehung von Asthma [Ryan et al. 2007], atopischer Dermatitis [Ryan et al. 2007], Allergien im Allgemeinen [Rosenberg et al. 2007], entzündlichen Darmerkrankungen [Akiho et al. 2005], Lupus erythematodes, rheumatischer Arthritis [Elwakkad et al. 2007] und bei der Abwehr von parasitären Infektionen [Berry et al. 2007]. Diese paradoxen Wirkungsweisen des IL-4 sind bis dato nicht vollständig aufgeklärt und es bleibt weiter unklar, unter welchen Umständen IL-4 Zellwachstum inhibiert oder stimuliert und inwiefern es sich als prognostischer Marker bei Tumorerkrankungen hilfreich erweisen kann.

1.4. Interleukin- 13 und Interleukin- 13 Rezeptor

Interleukin-13 (IL-13) ist ein Typ I Zytokin, welches zu pleiotropen Effekten im Immunsystem führt und viele Eigenschaften von IL-4 teilt. Es ist ein nicht-glykosiliertes monomeres 10 kDa Polypeptid bestehend aus 146 Aminosäuren, dessen Gencluster, eng verbunden mit dem von IL-4, auf Chromosom 5q 23-31 liegt [Minty et al. 1993]. Hauptsächlich wird IL-13 von T Helferzellen Typ II (Th-2) – Lymphozyten sezerniert, doch auch andere Zellen wie Mastzellen, Basophile, Eosinophile, dendritische Zellen, Th-1 CD4+ T-Lymphozyten, Th-0- und CD8+ T-Lymphozyten sind dazu fähig [Hershey 2003]. IL-13 gehört wie IL-4 zur Klasse der Typ I Zytokine und wird wie IL-4 aus einer Typ II-Vier-Helix-Bündel-Struktur gebildet, im Gegensatz zu IL-4 besitzt es jedoch nur zwei Disulfidbrücken anstatt drei, wobei die komplette Tertiärstruktur noch nicht vollständig geklärt ist [Tsarbopoulus et al. 2000]. Auf der Aminosäurenebene zeigt sich IL-13 zu 25% homolog zu IL-4, im Gegensatz zu IL- 4 ist IL-13 aber nicht Spezies-spezifisch

[Minty et al. 1993]. Wie IL-4 reguliert IL-13 bei humanen B-Zellen Proliferation, Differenzierung, Überleben und den Immunglobulinklassen Wechsel zu IgG4 und IgE [Oettgen et al. 2001]. Des Weiteren führt die Stimulation mit IL-13 bei Eosinophilen zu einer Verlängerung des Überlebens, Aktivierung und Chemotaxis derselben, bei Mastzellen zu einer Aktivierung und Förderung der IgE Synthese und bei Monozyten und Makrophagen zu einer Förderung der Antigenpräsentation, Inhibierung der Synthese von Prostaglandinen, reaktivem Sauerstoff und intermediärem Stickstoff [Hershey 2003]. Außerdem vermittelt IL-13 wichtige Funktionen von nicht-hämatopoetischen Zellen einschließlich Endothelzellen, weichen Muskelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen [Chapoval et al. 2007].

Die Signaltransduktion von IL-13 wird vor allem über zwei Rezeptorsysteme reguliert, zum einen kann IL-13 wie IL-4 auch den Typ II –Rezeptor (IL-4R), bestehend aus IL-4Rα und IL-13Rα1 [Kawakami et al. 2002], stimulieren, zum anderen kann IL-13 an den IL-13Rα2 binden [Jiang et al. 2000] (vgl. Abbildung 1). IL-13 bindet an die IL-13Rα1 Kette, welche IL-13 spezifisch eine geringe Affinität aufweist und für sich allein keine intrazelluläre Signalkapazität besitzt. Doch in Kombination mit der transmembranösen IL-4Rα Kette bildet sich ein hochaffiner Rezeptor-Komplex, welcher dann auch zur Signalttransduktion fähig ist [Hershey 2003]. Der zweite IL-13 Rezeptor, IL-13Rα2, hat im Gegensatz zu IL-13Rα1 eine hohe Affinität zu IL-13, doch schien er lange ein nicht-signaltransduktionsfähiger Köder-Rezeptor zu sein, welcher keine Signalkapazität besitzt und nicht benötigt wird für die IL-13 Funktion. Neuere Studien vermuten jedoch, IL-13Rα2 sei zwar zum Einen ein nicht-signaltransduktionsfähiger Köder-Rezeptor, zum Anderen aber ein Rezeptor, der über den mitogen activated protein kinase (MAPK) Weg Zelldifferenzierung, Zellwachstum und Apoptose reguliert. Wann der Rezeptor welche Funktion übernimmt, scheint über die Konzentration von IL-13 am IL-13Rα2 gesteuert zu werden [Mandal et al. 2010]. Es wird vermutet, dass er zusätzlich bei der Bindung und Internalisierung von IL-13 eine wichtige Rolle spielt [Kawakami et al. 2001]. Da Zytokinrezeptoren, wie bereits oben beschrieben, keine katalytischen Tyrosinkinasen in ihren zytoplasmatischen Domänen exprimieren, verbinden sie sich mit zytoplasmatischen Tyrosinkinasen, um daraufhin ihre Liganden zu stimulieren. Wie bei IL-4 führt eine Stimulation mit IL-13 zu einer schnellen Aktivierung von Janus- und PI3- Kinasen und zu einer

schnellen Phosphorylierung von Insulin-Rezeptor Substraten (IRS) [Jiang et al. 2000]. Auch IL-13 wirkt über den STAT6 Signalweg auf das Immunsystem ein und reguliert wichtige Funktionen wie Zell Differenzierung und IgE-Klassen-Switch [Müller-Ladner et al. 2000].

Es gibt jedoch auch entscheidende Unterschiede der zwei Interleukine, die sich zum Beispiel darin zeigen, dass die Induktion der Th-2 Entwicklung nur über IL-4 reguliert wird, da T-Zellen nicht den Typ II IL-4R exprimieren und deshalb auf IL-13 nicht ansprechen [Yokota et al. 1986, Chomarat et al. 1998]. Außerdem kann IL-4 die zytotoxische T-Zell Aktivität verstärken und regt dendritische Zellen zur IL-12 p70 Produktion an, wozu IL-13 nicht fähig ist [Terabe et al. 2004].

IL-13 ist ein wichtiger Mediator mit vielen verschiedenen biologischen sowie pathologischen Aktivitäten, einschließlich der Regulation von Abwehrmechanismen bei gastrointestinalen parasitären Infektionen, der Entstehung von Colitis ulcerosa [Akiho et al. 2005], der Verstärkung der Atemwegshyperreaktivität bei Asthma [Kelly-Welch et al. 2005], der Regulation allergischer Entzündungen [Oettgen et al. 2001], der Regulation von Gewebseosinophilie, der Entstehung der Mastozytose, der Regulation der IgE Antikörper Produktion [Rosenberg et al. 2007], der Hemmung der Angiogenese [Nishimura et al. 2008], der Entstehung von Lungenfibrose [Blease 2008] und bei der Regulation des Tumorzellwachstums bei Kolonkarzinomen [Mandal et al. 2010].

Wie IL-4 zeigt auch IL-13 paradoxe Wirkungen bei der Beeinflussung des Tumorzellwachstums. Eine Stimulation mit IL-13 kann sowohl in einer Inhibition als auch in einer Förderung des Tumorwachstums resultieren. IL-13 inhibiert das Wachstum von mehreren humanen Tumorzelllinien wie z.B. verschiedenen hämatologischen Tumorentitäten, nicht-kleinzelligen Lungentumoren [Wynn 2003], Plattenepithelkarzinomen [Wynn 2003], Brusttumoren [Kawakami et al. 2004], Nierenzelltumoren [Obiri et al. 1996], Pankreastumoren [Shimamura et al. 2010], akuter lymphatischer Leukämie [Renard et al. 1994], Melanomen [Ma et al. 2004], Prostatatumoren [Joshi et al. 2008] und Glioblastomen [Kawakami et al. 2005]. Doch gibt es auch andere Evidenzen, die das Gegenteil implizieren. So hat Formentini aus unserer Arbeitsgruppe beispielsweise gezeigt, dass bei humanen Pankreastumoren IL-13 als autokriner Wachstumsstimulator fungieren kann und auch das Risiko für Lymphknotenmetastasen erhöht [Formentini et al. 2009]. Wie

oben bereits beschrieben, wird der Typ II IL-4R von verschiedenen Tumorentitäten exprimiert, jedoch ist bis jetzt die Rolle des Typ II Rezeptors und seine Stimulation durch IL-13 nur bei Hodgkin-Lymphomen ausreichend untersucht worden. Es zeigt sich, dass die für das Hodgkin-Lymphom pathognomonischen Reed-Sternberg Zellen IL-13 als autokrinen Wachstumsfaktor in vivo und in vitro benutzen da eine Blockade von IL-13 in einer dosisabhängigen Relation zur Apoptose der Tumorzellen führt [Skinnider et al. 2001, Andersson et al. 2010].

Einer der Mechanismen, die zur Erhöhung der Metastasierungsrate und zur Abschwächung der Tumor-spezifischen Immunüberwachung führen könnten, scheint die Verringerung der Zell-Zell Adhäsion zu sein. In Kolontumorzelllinien, die den Typ II IL-4R exprimieren, regulieren beide IL-4 und IL-13 die Expression von E-Cadherin und karcinoembryonalen Antigen (CEA), welche für die Zell-Adhäsion wichtig sind, nach unten [Kanai et al. 2000]. Außerdem zeigten einige Studien, dass ein Zusammenhang von sezernierten IL-13 und einer Verstärkung des Tumorwachstums besteht. Dies wurde bei Brusttumoren [Aspord et al. 2007], Pankreastumoren [Shimamura et al. 2010] und bei Leukämie [Tangye et al. 1997] demonstriert.

Zusammenfassend hat IL-13 direkte Auswirkungen auf das Tumorwachstum, Metastasen und Schutz der Tumorzellen vor Apoptose. Da IL-13 viele seiner Aktivitäten mit IL-4 über den Typ II Rezeptor teilt, scheint dieser einen sinnvollen zukünftigen Angriffspunkt für anti-Tumor-Immuntherapien darzustellen, entweder über eine Blockade des Rezeptors allein oder in Kombination mit einem geeigneten IL-13 Inhibitor oder sogar auch synergistisch mit Krebsimpfstoffen.

Da viele der Regelkreise von IL-13 und IL-4 noch nicht vollständig aufgeklärt sind, sollten sie zum Zustand intensiver Forschung in den nächsten Jahren werden, um spezifische Antitumortherapien entwickeln zu können.

1.5. Grenzen des UICC Stadiums als Prognosefaktor

Obwohl die UICC-Stadieneinteilung derzeit der wichtigste und anerkannteste Prognosefaktor und Entscheidungsparameter zur Indikationsstellung einer adjuvanten Behandlung ist, stellt sie lediglich eine “statische” Beschreibung der Tumorausdehnung dar und berücksichtigt die “dynamischen” Eigenschaften (Biologie) des Tumors nicht. Eine weitere Identifizierung von Faktoren, die

prognostisch relevant sind und das biologische Verhalten des Tumors berücksichtigen, erscheint deshalb sinnvoll und notwendig.

1.6. Ziel der Studie

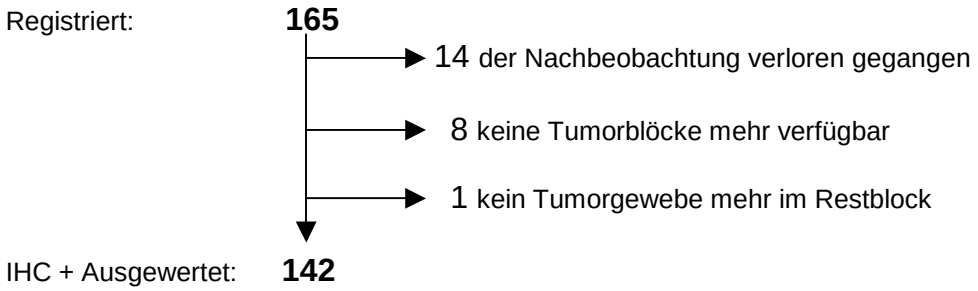
Ziel dieser Studie ist die Etablierung einer reproduzierbaren Methodik für eine Immunhistochemie von IL-4, IL-13, IL-4R und IL-13R und die Untersuchung des prognostischen Wertes dieser Zytokine bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen und bei Patienten mit Magenkarzinomen.
Um eine Korrelation der Expression dieser Interleukine mit prognostischen Parametern herzustellen, wurden im Rahmen dieser Arbeit 359 primäre kolorektale und 95 primäre Magenkarzinome, immunhistochemisch auf die Expression von IL-4, IL-13, IL-4R und IL-13R gefärbt, untersucht und die Ergebnisse mit den klinischen und pathologischen Daten sowie dem Verlauf verglichen. Der Einsatz von molekularen Markern mit validiertem prognostischem Wert könnte dabei helfen, Risikopatienten zu identifizieren, die von einer adjuvanten Behandlung profitieren würden, und somit den Weg zu einer individualisierten Indikationsstellung einer postoperativen Chemotherapie eröffnen. Nach unserem Wissen ist dies die erste Arbeit, die sich diesem Thema widmet.

2. Patienten, Material und Methoden

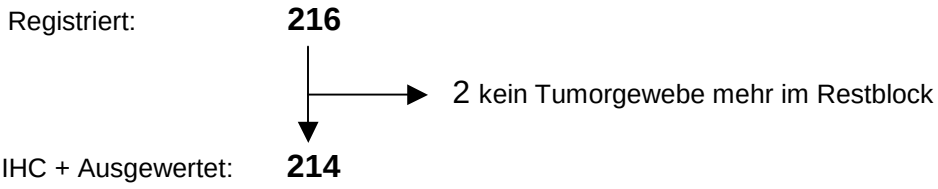
2.1. Patienten

Die erfassten Patientenkollektive dieser retrospektiven Untersuchung entstammen dem Tumornachsorgeregister der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie des Universitätsklinikums Ulm.

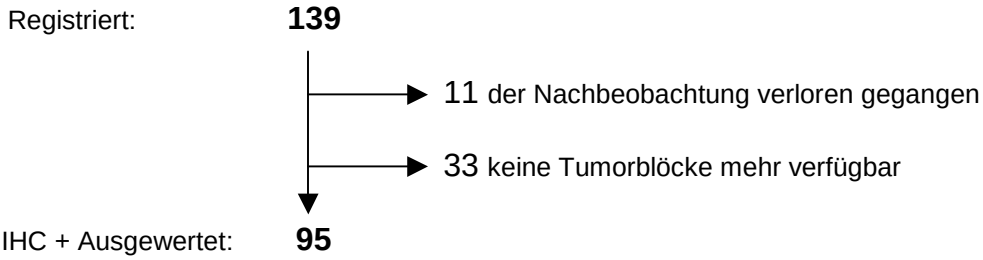
Es wurden chemonaive Patienten mit einem kolorektalen Karzinom Stadium I und II nach der UICC-Klassifikation (Gruppe I), chemotherapierte Patienten mit einem kolorektalen Karzinom Stadium II und III nach der UICC-Klassifikation (Gruppe II) und Patienten mit einem Magenkarzinom aller UICC-Stadien (Gruppe III) untersucht. Die folgenden Abbildungen 2 a-c zeigen, wie viele Patienten jeweils in die Auswertung einbezogen bzw. nicht einbezogen wurden.



a) Studieneinschluss von Patienten mit kolorektalen Karzinomen (Gruppe I)



b) Studieneinschluss von Patienten mit kolorektalen Karzinomen (Gruppe II)



c) Studieneinschluss von Patienten mit Magenkarzinomen (Gruppe III)

Abbildung 2 a-c: Flussdiagramme Studieneinschluss

Legende Abbildung 2 a-c: *IHC: Immunhistochemie*

Folgende Daten wurden erhoben: Name, Vorname, Geburtsdatum, Alter und Geschlecht des Patienten, Lokalisation des Tumors, durchgeführte Operation sowie Datum der Operation, Stadieneinteilung nach UICC sowie TNM Klassifikation, histologischer Tumortyp, Differenzierungsgrad (G), Radikalität der Operation (R), Angabe über mögliche adjuvante Therapien, Auftreten und Lokalisation eines Rezidivs sowie gesamte und krankheitsfreie Überlebenszeit.
Der klinische Verlauf der Patienten wurde sowohl anhand des in der Klinik durchgeführten Nachsorgeprogramms, den Informationen des Studiensekretariats der Universität Ulm, als auch durch Befragung der Hausärzte bzw. der Patienten erhoben. Die Patienten mit kolorektalen Karzinomen wurden im Zeitraum von 02/2001 bis 03/2007 operiert, die mit Magenkarzinomen im Zeitraum von 06/1998 bis 02/2004. Eine letzte Aktualisierung der Daten fand im November 2010 statt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Ulm genehmigt (Gruppe I: 05/02; Gruppe II: 72/01; Gruppe III: 211/02).

2.2. Material, Reagenzien und Gebrauchslösungen

Materialien:
Deckgläser = P. Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, Deutschland
Schüttler = IKA- Werke, Staufen, Deutschland
Superfrost-Objektträger = Menzel- Gläser®, Braunschweig, Deutschland

Reagenzien:
Aceton = J.T.Baker, Deventer Holland
APES (3-Aminopropyltriethoxysilan) = Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Interleukin-4 (Monoklonaler Maus IgG_1 Antikörper, MAB 304) = R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Interleukin-4-Rezeptor (Monoklonaler Maus IgG_{2A} Antikörper, MAB230) = R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Interleukin-13 (Monoklonaler Ratte IgG_1 Antikörper, AHCO132) = Biosource, Camarillo, CA, USA
Interleukin-13-Rezeptor (Polyklonaler Ziege IgG Antikörper, AF152) = R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

DAB (3,3'- Diaminobenzidin)- Peroxidase Substrate Kit = Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

Etellan-Schnelleindeckmittel = Merck, Darmstadt, Deutschland

Ethanol absolut = Merck, Darmstadt, Deutschland

H_2O_2 – Hydrogen Peroxid (30%) = J.T. Baker, Deventer, Holland

Isopropanol = Merck, Darmstadt, Deutschland

Mayers- Hämalaun = Merck, Darmstadt, Deutschland

PAP-PEN = SCI- Science Services, München, Deutschland

PBS DULBECCO'S (10 x PBS) = Gibco™, Eggenstein, Deutschland

Vectastain® Elite ABC-Kit (Universal IgG/PK6200) = Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

Vectastain® Elite ABC-Kit (Goat IgG/PK6105) = Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

Vectastain® Peroxidase-Substrat-Kit DAB/ Ni- Substrate(SK-4100) = Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

Xylol = Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Tabelle 1: Gebrauchslösungen

1%ige APES / Aceton Lösung	200 ml Aceton + 2ml APES
1%ige Wasserstoffperoxyd / Methanol Lösung	200 ml Methanol + 2 ml H_2O_2 (auf einem Schüttler)
PBS-Puffer (pH 7,5)	50 ml 10 x PBS + 450 ml destilliertes H_2O (auf einem Schüttler)
1%iges Hase-Normalserum (Normal-Blocking-Serum)	5ml PBS-Puffer + 50 µl Hase Normal Serum
1%iges Pferde-Normalserum (Normal-Blocking-Serum)	5ml PBS-Puffer + 50 µl Pferde Normal Serum
Biotin- konjugierter Sekundärantikörper	5 ml PBS Puffer + 100 µl 1%iges Normalserum + 100 µl der Biotin-konjugierten Antikörper Stammlösung
ABC-Komplex	5 ml PBS Puffer + 100 µl Reagenz A (aus ABC-Kit) + 100 µl Reagenz B (aus ABC-Kit) – gut schütteln und mind. 30 min. vor Gebrauch ansetzen
DAB-Lösung	3 - 5 min. im Dunkeln entwickeln (etwas anders als im Peroxidase-Substrat-Kit beschrieben), 5 ml destilliertes H_2O + 100 µl Puffer pH 7,5, schütteln + 200 µl DAB-Stock, schütteln + 100 µl H_2O_2, schütteln

Verwendung der Kits:

Vectastain® Elite ABC-Kit (Universal IgG)	Bei IL-4, IL-4R und Il-13
Vectastain® Elite ABC-Kit (Goat IgG)	Bei IL-13R

Legende: *APES: Aminopropyltriethoxysilan, PBS: phosphate buffered saline, DAB: Diaminobenzidin, ABC: Avidin-Biotin-Complex*

Die einzelnen Schritte wurden wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt. Im Folgenden werden die untersuchten Rezeptoren IL-4Rα und IL-13Rα1 zur vereinfachten Darstellung als IL-4R und IL-13R bezeichnet.

2.3. Methoden

2.3.1. Prinzip und Verfahren der Immunhistochemie

Die intrazelluläre Darstellung der Interleukine IL-4 und IL-13 und deren Rezeptoren IL-4R und IL-13R erfolgte mit Hilfe eines indirekten Immunperoxidase-Verfahrens nach dem Prinzip der Doppelmarkierung. Bei diesem Verfahren ist der erste Antikörper spezifisch gegen eine Antigendeterminante des nachzuweisenden Interleukins oder Rezeptors gerichtet und wird mit einem zweiten Biotin-konjugierten Antikörper markiert. Die entsprechenden Antigen/Antikörper-Komplexe können mittels der ABC-Technik (Avidin-Biotin-Complex-Methode) detektiert werden. Bei dieser Technik macht man sich die außergewöhnlich hohe Affinität des Avidins zu dem Vitamin Biotin zunutze. Die Bindung ist praktisch irreversibel und aufgrund der vier potentiellen Bindungsstellen des Avidinmoleküls kann eine Verstärkung des Signals erreicht werden. Der zweite Antikörper ist durch seine Biotinmarkierung in der Lage präformierte Avidin-Peroxidase-Komplexe zu binden und schafft somit eine Verbindung (Brückenantikörper) zwischen diesem Komplex und dem Interleukin. In der folgenden Reaktion katalysiert die Peroxidase die Übertragung von Wasserstoffionen aus 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) auf Wasserstoffperoxyd unter Abspaltung von Wasser. Durch diese Oxidation entsteht ein unlöslicher brauner Farbstoff und die Interleukine bzw. ihre Rezeptoren lassen sich in der Zelle lokalisieren.

Vor dem Färben wurden die Objektträger mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APES) beschichtet, um eine bessere Gewebehaftung zu erreichen und ein Ablösen des Gewebeschnittes vom Objektträger während des Färbevorgangs zu verhindern. Dafür wurden die einzelnen Objektträger für 2 Minuten in einer 1%igen APES/Aceton-Lösung gewaschen und danach zum Auswaschen des überschüssigen APES 10 x mit 100%igem Aceton gespült. Anschließend wurden sie 10-mal kurz in destilliertem H_2O gewaschen und daraufhin nochmals mit

destilliertem H_2O 2 Minuten gespült. Dann wurden die Objektträger in einem Brutschrank bei 37° C über Nacht getrocknet. Am Mikrotom wurden von den in Paraffin eingebetteten Geweben 4 µm dicke Schnitte angefertigt und auf die mit APES beschichteten Objektträger aufgezogen. Die Herauslösung des Paraffins erfolgte in drei Arbeitsschritten von jeweils 10 Minuten, in denen die Objektträger in Xylol 1 – 3 gestellt wurden. Im Anschluss daran erfolgte die Hydratisierung der Schnitte durch eine absteigende Isopropanolreihe, beginnend mit 100% für 5 Minuten, anschließend mit 90%, 80%, 70% und 50% für jeweils 5 Minuten und darauf folgendes zweimaliges Waschen in destilliertem H_2O für jeweils 5 Minuten, wobei das Wasser mehrmals gewechselt wurde. Nun wurde die endogene Peroxidaseaktivität mit 1% Wasserstoffperoxyd / Methanol Lösung für 30 Minuten geblockt. Bevor und nachdem die Gewebeschnitte mit einem PAP-PEN (Fettstift) umkreist wurden, wurden die Objektträger 5 Minuten in PBS- Puffer mit einem pH-Wert von 7,5 gespült. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Schnitte mit 100 µl 1%igem Normalserum pro Schnitt für 20 Minuten, um die unspezifische Hintergrundfärbung zu unterbinden.

Nach Abtropfen des überschüssigen Blockserums erfolgte ein erneutes kurzes Spülen in PBS-Puffer mit einem pH-Wert von 7,5, um noch vorhandenes Serum zu eliminieren. Anschließend wurden die Schnitte mit 100 µl des verdünnten primären Antikörpers für 24 Stunden bei 4° C in einer feuchten Kammer inkubiert. Verwendet wurden die Antikörper in folgenden Verdünnungen mit PBS-Puffer: Interleukin 4 -AK = 1 : 500, Interleukin 4R-AK = 1 : 4.000; Interleukin 13-AK = 1 : 500, Interleukin 13R-AK = 1 : 250. Die geeigneten Antikörpertiter wurden anhand von Verdünnungsreihen ermittelt. Ziel war dabei, eine möglichst klare und spezifische Anfärbung der Antigene bei geringst möglicher Hintergrundfärbung zu erreichen.

Am darauffolgenden Tag erfolgte das Abtropfen des überschüssigen Antikörpers und erneutes zweimaliges Spülen mit PBS-Puffer für jeweils 5 Minuten, bevor die Schnitte mit 100 µl des Biotin-konjugierten Sekundärantikörpers für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach Abtropfen des überschüssigen Antikörpers erfolgte wieder das zweimalige Waschen mit PBS-Puffer für jeweils 5 Minuten, um anschließend die Schnitte mit 100 µl des ABC-Komplexes, der 30 Minuten früher angesetzt und bis zum Gebrauch im Kühlschrank gelagert wurde, für 45 Minuten bei Raumtemperatur zu inkubieren. Daraufhin wurden die Schnitte

nach Abtropfen der überschüssigen Reagenz erneut zweimal mit PBS-Puffer gespült. Mit Hilfe von pro Schnitt 100 µl DAB-Lösung als Peroxidasesubstrat und Chromogen erfolgte nun die Färbung an einem lichtgeschützten Ort für 3-5 Minuten. Nach erneutem Spülen mit destilliertem H_2O für 5 Minuten (wobei das Wasser mehrmals gewechselt wurde) wurden die Präparate zur Darstellung der Zellkerne mit 100%igem Mayers Hämalaun für 15 Sekunden gegengefärbt und gründlich für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser durch eine pH-Verschiebung gebläut. Nun folgten wieder 5 Minuten Spülen mit destilliertem H_2O, wobei das Wasser mehrmals gewechselt wurde.

Abschließend erfolgte eine aufsteigende Isopropanolreihe beginnend mit 50%igem, 70%igem, 80%igem, 90%igem und endend mit 100%igem Isopropanolol für 5 Minuten, bevor die Präparate dreimalig in Xylol 4–5 für jeweils 10 Minuten und anschließend in Xylol 6 für 20-30 Minuten gewaschen und schließlich mit Entellan, einer Polymerisationslösung in Xylol, eingedeckelt wurden. Hierbei musste unbedingt darauf geachtet werden, dass sich keine Luftblasen zwischen den Deckgläsern befanden. Als Negativkontrollen wurden Proben verwendet, bei denen der Primärantikörper durch PBS-Puffer ersetzt wurde.

Die Immunhistochemie wurde im Zeitraum 11/08 - 12/09 durchgeführt.

2.3.2. Interpretation der Immunhistochemie

Die Auswertung und Begutachtung der gefärbten Schnitte erfolgte nach der Intensität der Färbung der Interleukine im Zytoplasma. Es wurden weitere Merkmale erhoben, wie zum Beispiel die Verteilung der Antikörper im Zytoplasma (homogen vs. granulär), die Lokalisation der angefärbten Bereiche im Tumor (fokal vs. diffus) und die Kernfärbung (negativ vs. positiv), die aber mangels statistischer Signifikanz nicht dargestellt werden.

Vor dem Beginn der eigentlichen immunhistochemischen Färbungen wurde in einer eigenen Verdünnungsreihe für die verschiedenen Antikörper die Verdünnung mit dem besten Ergebnis austitriert. Es wurde jeweils mit Verdünnungen 1 : 50 begonnen, um anschließend immer stärkere Verdünnungen auszuprobieren, bis das für die Untersuchung optimale Ergebnis erreicht wurde: Eine möglichst geringe Hintergrundfärbung und ein spezifisches Signal in den zu untersuchenden

Zellen. Ferner wurde in der Fachliteratur nach Arbeiten mit ähnlicher Fragestellung und der Verwendung der gleichen Antikörper recherchiert. Dabei stellte sich heraus, dass für alle Antikörper bereits Referenzen bestanden, jedoch für andere Gewebearten: Interleukin-4 Antikörper [Oliveira et al. 2009], Interleukin-4Rα Antikörper [Mandruzzato et al. 2006], Interleukin-13 Antikörper [Knörr et al. 1999] und Interleukin-13Rα1 Antikörper [Lama et al. 2006].

Die immunhistochemische Interpretation zum Nachweis der Interleukine wurde blind ohne Kenntnis der pathologischen Daten durchgeführt. Die Schnitte wurden mit einem Zeiss Axioplan 2® Mikroskop bei 10- und 40-facher Vergrößerung lichtmikroskopisch begutachtet. Die Intensität der Färbung des Zytoplasmas wurde auf einer vierstufigen visuellen Skala beurteilt: 0= keine Färbung, 1= schwach positive Färbung, 2= mäßig positive Färbung, 3= stark positive Färbung [Formentini et al. 2007]. Die höchste beobachtete Färbeintensität im Tumorgewebe des jeweiligen Präparates bestimmte die Klassifikation der Gesamtintensität. Daraufhin wurden die gemessenen Intensitäten zur vereinfachten statistischen Verarbeitung in zwei Klassen unterteilt:

Intensität 0 + Intensität 1 = negative Expression

Intensität 2 + Intensität 3 = positive Expression.

Zur Qualitätssicherung wurden zu Beginn der Auswertung Referenzschnitte der jeweiligen Färbeintensitäten ermittelt, die in der folgenden Auswertung als Orientierungshilfe benutzt wurden. Darüber hinaus wurden die Schnitte von zwei unabhängigen Untersuchern ausgewertet und bei Diskrepanzen erneut beurteilt, so dass am Ende eine eindeutige Färbeintensität zu erheben war. Die Qualität wurde weiterhin dadurch gesichert, dass die immunhistochemischen Färbungen immer an einer Serie von Gewebsschnitten ausgeführt wurden, so dass vom gleichen Gewebeareal immer mehrere Schnitte zur Färbung mit den verschiedenen Antikörpern zur Verfügung standen. Zudem wurden einfach Hämatoxylin-Eosin gefärbte Schnitte als Negativkontrollen herangezogen.

2.4. Statistik

Die statistische Analyse wurde mit der Probeversion der MedCalc Software Version 11.4.2.0. und mittels WinSTAT Version 2009.1. für Microsoft EXCEL durchgeführt. Ergebnisse wurden für die deskriptive Analyse als Median

(Maximum, Minimum) dargestellt. Ergebnisse der einzelnen Gruppen wurden anhand des Chi-square-Tests verglichen. Die Überlebenszeit wurde als Zeitintervall zwischen dem Operationsdatum und dem tumorbedingten Tod (Ereignisse) oder bis zum nicht tumorbedingten Tod bzw. bis zum letzten Beobachtungsdatum für Patienten, die am Leben sind (zensierte Ereignisse), definiert. Die krankheitsfreie Überlebenszeit wurde als Zeitintervall zwischen dem Operationsdatum und dem Diagnosedatum des Tumorrezidivs oder des tumorbedingten Todes (Ereignisse) bzw. bis zum nicht tumorbedingten Tod bzw. bis zum letzten Beobachtungsdatum für Patienten, die am Leben sind (zensierte Ereignisse), definiert.

Überlebenskurven wurden nach der Kaplan-Meier-Methode [Kaplan et al. 1958] dargestellt. Die Signifikanztestung zwischen den einzelnen Kurven wurde mit dem Long-Rank-Test (zweiseitige Fragestellung) durchgeführt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als Signifikanzniveau festgelegt (2-seitig).

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Patientengruppen

3.1.1. Analyse der Patienten mit einem kolorektalen Karzinom

Die insgesamt 359 identifizierten Patienten mit einem kolorektalen Karzinom setzen sich aus zwei Gruppen zusammen. Die Patienten der Gruppe I (UICC Stadium I + II) wurden in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie des Universitätsklinikums Ulm im Zeitraum von 2001-2006 operiert und keiner Chemotherapie unterzogen. Die Patienten der Gruppe II (UICC Stadium II + III) wurden über eine Studie erfasst, an der sich die Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie des Universitätsklinikums Ulm beteiligte. Die Studie verglich die Therapie mit 5-Fluoruracil + Folinsäure versus 5-Fluoruracil + Folinsäure + Irinotecan. Diese Patienten wurden im Zeitraum 2002-2007 operiert. Diese beiden Gruppen wurden in der weiteren statistischen Analyse zusammengefasst. Eine letzte Aktualisierung der Patientendaten erfolgte im November 2010. Es wurde keine intra- bzw. postoperative (30-Tage) Mortalität beobachtet. Nähere Angaben sind Tabelle 2 zu entnehmen.

3.1.2. Analyse der Patienten mit einem Magenkarzinom

Die 95 erfassten Patienten mit einem Magenkarzinom wurden in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie des Universitätsklinikums Ulm im Zeitraum von 1998-2004 operiert. Bis auf einen Fall, bei dem sich postoperativ eine Anastomoseninsuffizienz entwickelte und der daraufhin an einer Sepsis verstarb, wurde keine intra- bzw. postoperative (30-Tage) Mortalität beobachtet. Eine letzte Aktualisierung der Patientendaten erfolgte im November 2010. Nähere Angaben sind Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Beschreibung der Studienkollektive

(Erfassungszeitraum 1998-2010, Universitätsklinik Ulm)

Legende: *UICC: Union internationale contre le cancer, pT/pN/pM : pathologisches Tumorklassifikationssystem*

	Total	**Kolorektale Karzinome** (Gruppe I+II)	**Magenkarzinome** (Gruppe III)
	454 (100%)	359 (100%)	95 (100%)
Medianes Alter	66 Jahre (31-85)	66 Jahre (36 - 85)	64 Jahre (31 – 85)
< 65 Jahre	188 (41%)	153 (43%)	35 (37%)
≥ 65 Jahre	266 (59%)	206 (57%)	60 (63%)
Geschlecht			
Männlich	270 (60%)	215 (60%)	55 (58%)
Weiblich	184 (40%)	144 (40%)	40 (42%)
UICC - Tumor Stadium			
Stadium I		98 (27%)	27 (28%)
Stadium II		77 (22%)	20 (21%)
Stadium III		184 (51%)	18 (19%)
Stadium IV		0 (0%)	30 (32%)
pT Klassifikation			
pT_1		20 (6%)	15 (16%)
pT_2		96 (27%)	43 (45%)
pT_3		184 (51%)	30 (32%)
pT_4		59 (16%)	7 (7%)
pN Klassifikation			
pN_0		175 (49%)	28 (30%)
pN_1		184 (51%)	67 (70%)
pM Klassifikation			
pM_0		309 (86%)	70 (74%)
pM_1		0 (0%)	25 (26%)
pM nicht klassifizierbar		50 (14%)	0 (0%)
Histologisches Grading			
1 - 2		277 (77%)	47 (50%)
3 - 4		82 (23%)	48 (50%)
Residualtumorstatus			
R 0		359 (100%)	63 (66%)
R 1		0 (0%)	8 (8%)
R 2		0 (0%)	24 (25%)
Tumor Rezidive			
Kein Rezidiv		281 (78%)	42 (44%)
Rezidiv		78 (22%)	53 (56%)
Adjuvante Therapie			
Nein		142 (40%)	8 (8%)
Ja		217 (60%)	87 (92%)
Überlebensraten			
1 Jahr		96%	75%
2 Jahre		90%	57%
5 Jahre		66%	35%
Krankheitsfreie Überlebensraten			
1 Jahr		90%	61%
2 Jahre		82%	49%
5 Jahre		56%	32%

3.2. Etablierung und Charakterisierung der Immunhistochemie

3.2.1. Etablierung der Immunhistochemie

Wie bereits in den Methoden erläutert, mussten für die verschiedenen Antikörper geeignete Verdünnungen gefunden werden, bevor die Immunhistochemie durchgeführt werden konnte. Es gab zwar bereits Referenzen für die jeweiligen Antikörper, jedoch nicht für die in dieser Studie untersuchten Gewebe. Demnach mussten die geeigneten Verdünnungen erst ermittelt werden.

Die Antikörper wurden durch ansteigende Verdünnungsreihen titriert und dann unter dem Mikroskop begutachtet. Diejenigen Verdünnungen, die eine möglichst klare abgrenzbare Färbung der Tumorzellen und eine möglichst geringe Färbung des umliegenden Gewebes lieferten, also eine optimale Reaktivität bei einem guten Signal-Rausch Verhältnis, wurden verwendet. Die jeweiligen Verdünnungen werden in den Methoden bereits erläutert. Die Bewertung der Immunhistochemie erfolgte semiquantitativ, die Intensitäten wurden, wie bei anderen Immunhistochemien üblich, einem Wert zugeordnet (0= keine Färbung, 1= schwach positive Färbung, 2= mäßig positive Färbung, 3= starke Färbung). Daraufhin erfolgte, nach statistischem Ausloten, die Zuordnung anhand der Färbeintensität in folgende Scores:

Negative Färbung = Intensität 0 + 1, Positive Färbung = Intensität 2 + 3.

Diese Gruppierung wurde im Folgenden für die statistische Auswertung benutzt. Das Bewertungssystem konnte bereits bei vorausgegangenen Untersuchungen mit Immunhistochemien in unserer Arbeitsgruppe verwendet werden.

Bei der Begutachtung der Immunhistochemie unter dem Mikroskop wurden außer der Intensität der Färbung im Zytoplasma auch andere Merkmale der Färbung ermittelt, wie zum Beispiel die Verteilung des Antikörpers im Zytoplasma der Tumorzellen (homogen vs. granulär), die Verteilung des Antikörpers im Tumor (diffus vs. fokal), die Anfärbung der Zellkerne (positiv vs. negativ) und die Verteilung der Färbung in den Zellkernen (fokal vs. diffus). Insgesamt zeigte sich jedoch für alle Antikörper ein homogenes zytoplasmatisches Verteilungsmuster, so dass diese oben beschriebenen Merkmale nicht weiter ausgewertet wurden und hier nur am Rande erwähnt werden.

3.2.2. Charakterisierung der Immunhistochemie

Die mit den Antikörpern gefärbten Paraffinschnitte wurden nun unter dem Mikroskop untersucht und anhand des oben beschriebenen Bewertungssystems klassifiziert. Bei der Begutachtung der Schnitte fiel auf, dass sich die Zellkerne der Tumorzellen selten anfärben ließen, auch die Becherzellen, die in den untersuchten Tumorschnitten lagen, wiesen selbst bei starker Färbung der umliegenden Tumorzellen keine Färbung auf. Die Antikörperverteilung in den Zytoplasmen der Tumorzellen zeigte sich so gut wie immer homogen. Der IL-4 Antikörper wies bspw. bei chemonaiven kolorektalen Tumoren in nur 7/142 (5%) Präparaten eine granuläre Färbung auf, bei chemotherapierten kolorektalen Karzinomen waren es 4/217 (2%) und bei Magenkarzinomen waren es 3/95 (3%). Bei den anderen Antikörpern zeigte sich ein ähnliches Bild, weshalb ihre Antikörperverteilungen im Zytoplasma hier nicht näher beschrieben wurden.

Bei der Begutachtung der Verteilung der Antikörper im Tumorgewebe zeigte sich, dass es einige Tumore gab, die sich nur an einer Stelle anfärbten (fokal) und andere, die sich im Ganzen vom Schnitt erfassten Tumorareal (diffus) anfärben ließen. Es konnte eine große Bandbreite der zytoplasmatischen Immunoreaktivität der zwei Zytokine und ihrer Rezeptoren in den 454 untersuchten Tumoren festgestellt werden. In den angrenzenden Normalgeweben konnte keine oder nur eine schwach positive Immunoreaktivität nachgewiesen werden.

Eine positive Immunoreaktivitat (Färbeintensitäten 2 + 3) für IL-4, IL-13, IL-4R und IL-13R konnte in bis zu 50% der untersuchten Tumore festgestellt werden. Dies legt nahe, dass IL-4 und IL-13, genauso wie deren Rezeptoren, von einer großen Anzahl von Magen- und kolorektalen Tumoren exprimiert werden. Die prozentualen Anteile der Antikörperintensitäten wiesen häufig eine ähnliche Verteilung auf, so entfielen jeweils 10% auf die Intensitäten 0 und 3 und ca. jeweils 40% auf die Intensitäten 1 und 2.

Die ermittelten Intensitäten der jeweiligen Antikörper in den jeweiligen Tumorkollektiven sind in Tabelle 3 dargestellt.

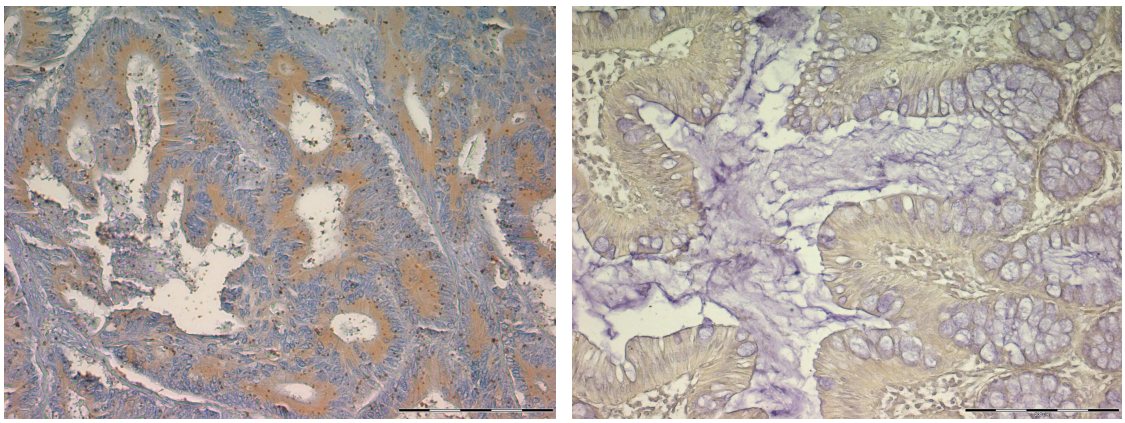
Tabelle 3: Verteilung der Färbeintensitäten der Immunhistochemie

(Erfassungszeitraum 1998-2010, Universitätsklinik Ulm)

Legende: *IL : Interleukin, Pat.: Patienten*

Kollektiv / Intensität	Total (454 Pat.)	Kolorektale Karzinome (359 Pat.)	Magen-karzinome (95 Pat.)
IL-4			
0 = keine Färbung	40 (9%)	33 (9%)	7 (7%)
1 = schwach positive Färbung	238 (52%)	208 (58%)	30 (32%)
2 = mäßig positive Färbung	131 (29%)	95 (27%)	36 (38%)
3 = stark positive Färbung	45 (10%)	23 (6%)	22 (23%)
IL-4 Rezeptor			
0 = keine Färbung	64 (14%)	40 (11%)	24 (25%)
1 = schwach positive Färbung	233 (51%)	190 (53%)	43 (46%)
2 = mäßig positive Färbung	130 (29%)	108 (30%)	22 (23%)
3 = stark positive Färbung	27 (6%)	21 (6%)	6 (6%)
IL-13			
0 = keine Färbung	39 (9%)	32 (9%)	7 (7%)
1 = schwach positive Färbung	179 (39%)	146 (41%)	33 (35%)
2 = mäßig positive Färbung	176 (39%)	142 (39%)	34 (36%)
3 = stark positive Färbung	60 (13%)	39 (11%)	21 (22%)
IL-13 Rezeptor			
0 = keine Färbung	57 (13%)	46 (13%)	11 (12%)
1 = schwach positive Färbung	188 (41%)	161 (45%)	27 (28%)
2 = mäßig positive Färbung	165 (36%)	121 (34%)	44 (46%)
3 = stark positive Färbung	44 (10%)	31 (8%)	13 (14%)

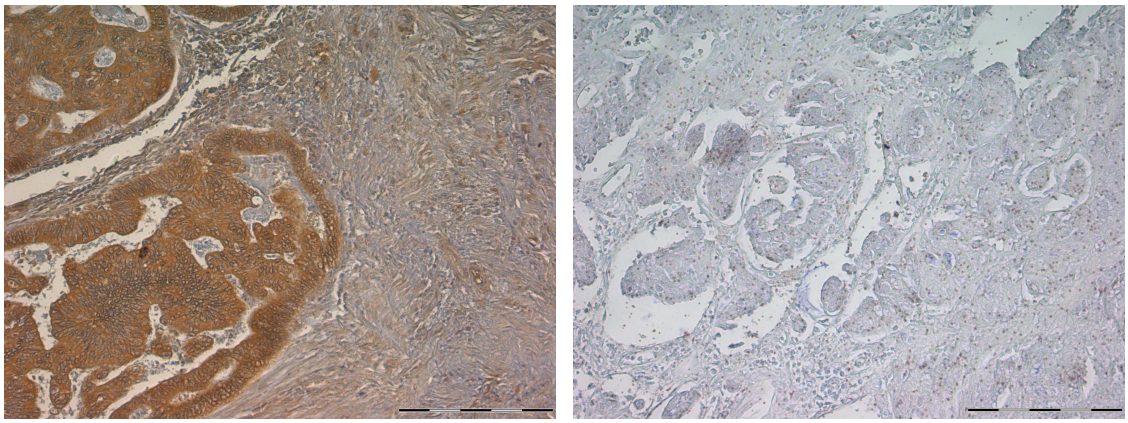
3.2.3. Beispiele für die Immunhistochemie



a) positive IL-4 Expression b) negative IL-4 Expression

Abbildung 3: IL-4 Immunhistochemie bei einem kolorektalen Karzinom bei 10-facher Vergrößerung (der Balken am rechten unteren Bildrand entspricht 200µm)

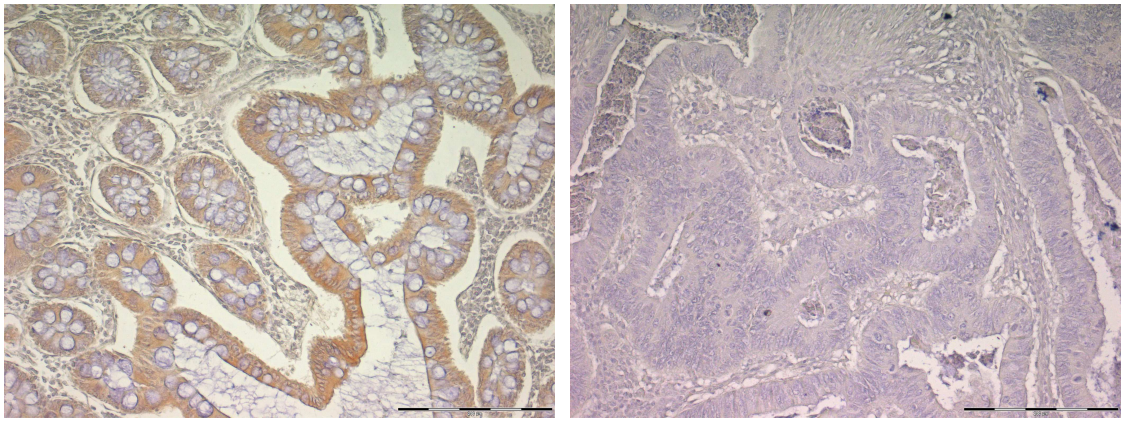
In Abbildung 3a kann man deutlich die zytoplasmatische Anfärbung der Tumorzellen erkennen. Es dominiert ein diffuses homogenes Färbemuster. Das Stroma wird nicht angefärbt. In Abbildung 3b wird ein Tumor mit negativer IL-4 Expression gezeigt.



a) positive IL-4 Rezeptor Expression b) negative IL-4 Rezeptor Expression

Abbildung 4: IL-4 Rezeptor Immunhistochemie bei einem kolorektalen Karzinom bei 10-facher Vergrößerung (der Balken am rechten unteren Bildrand entspricht 200µm)

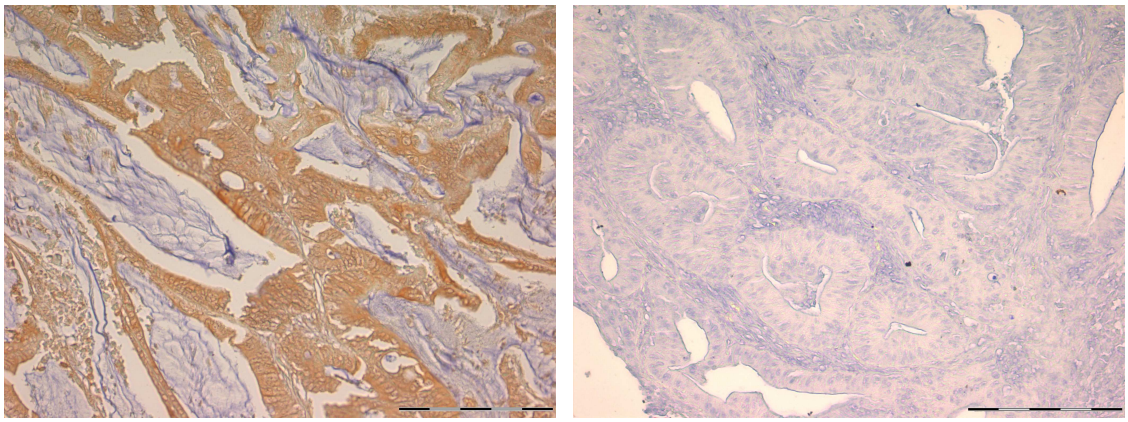
In Abbildung 4a wird die spezifische Anfärbung des Tumorgewebes deutlich, bei gleichzeitiger allenfalls schwach positiver Färbung im anliegenden Interstitium. Abbildung 4b zeigt einen Schnitt mit negativer IL-4 Expression.



a) positive IL-13 Expression b) negative IL-13 Expression

Abbildung 5: IL-13 Immunhistochemie bei einem kolorektalen Karzinom bei 10-facher Vergrößerung (der Balken am rechten unteren Bildrand entspricht 200µm)

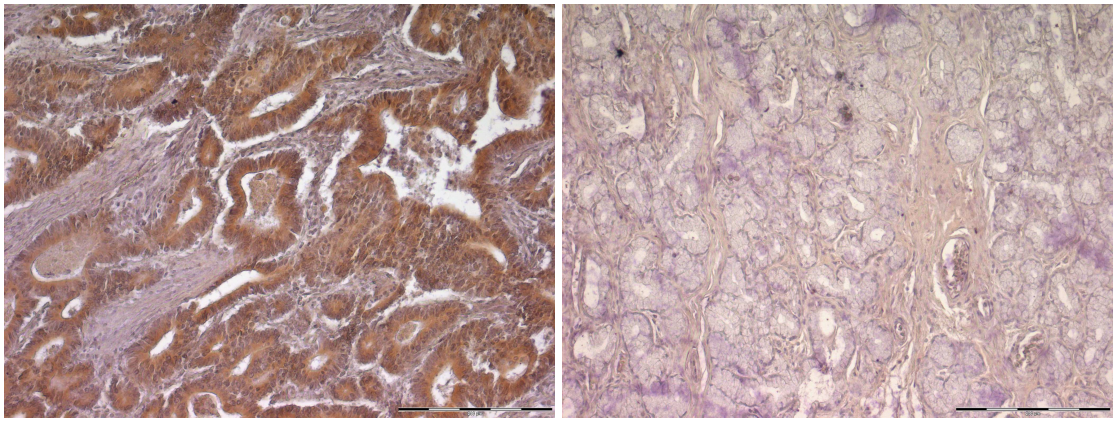
Abbildung 5a demonstriert eine zytoplasmatische, homogene und diffuse IL-13 Expression. Die Becherzellen färben sich nicht an. Das Interstitium bleibt ungefärbt und nur die Tumorzellen zeigen eine spezifische Färbung. In Abbildung 5b wird ein Beispiel für eine negative IL-13 Expression gezeigt.



a) positive IL-13 Rezeptor Expression b) negative IL-13 Rezeptor Expression

Abbildung 6: IL-13 Rezeptor Immunhistochemie bei einem kolorektalen Karzinom bei 10-facher Vergrößerung (der Balken am rechten unteren Bildrand entspricht 200µm)

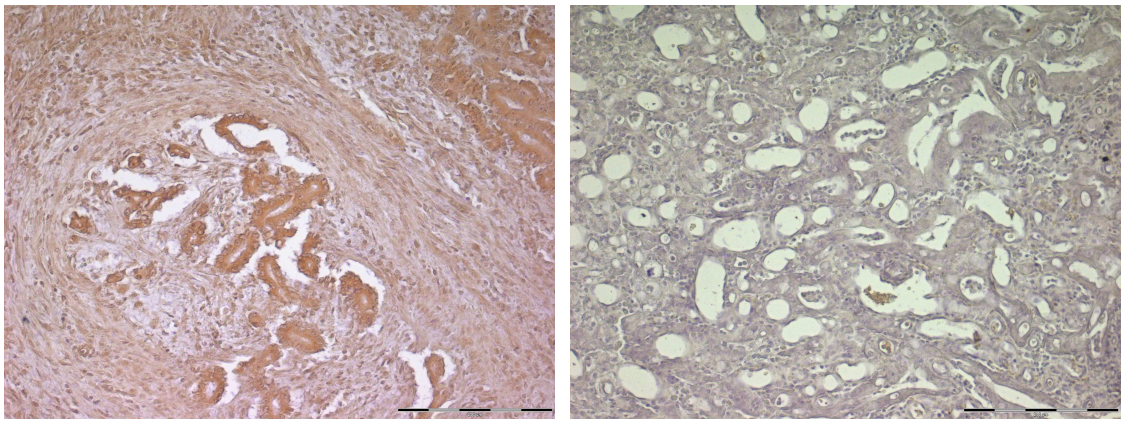
In Abbildung 6a findet sich ein schleimproduzierender, relativ unorganisierter Tumor, dessen Zellen sich diffus zytoplasmatisch anfärben lassen. An einigen Stellen imponiert die Färbung sehr prominent. In diesem Schnitt wurde auch das Interstitium, wenn auch schwach, angefärbt. In Abbildung 6b ist ein Schnitt mit negativer IL-13 Expression dargestellt. Hier findet sich kein Areal, was einer positiven Färbung zugeordnet werden könnte.



a) positive IL-4 Expression b) negative IL-4 Expression

Abbildung 7: IL-4 Immunhistochemie bei einem Magenkarzinom bei 10-facher Vergrößerung (der Balken am rechten unteren Bildrand entspricht 200µm)

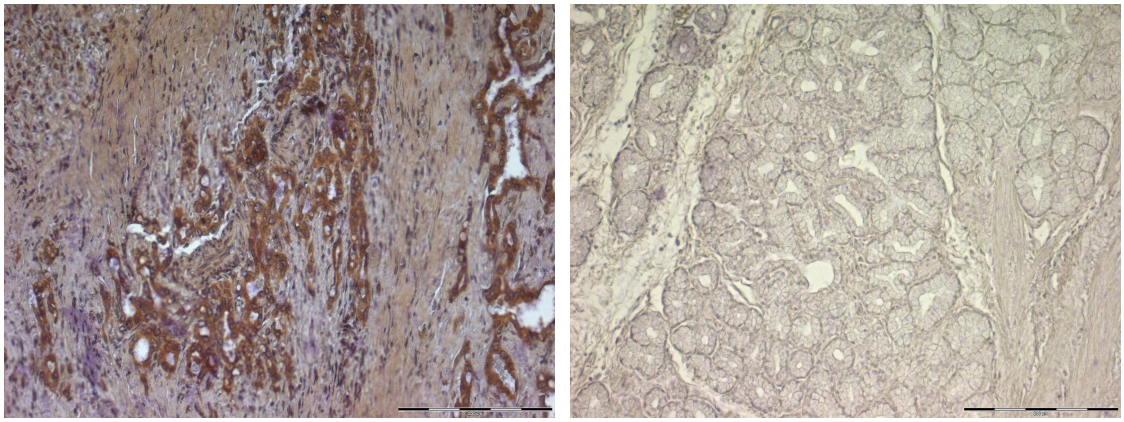
Abbildung 7a demonstriert eine positive IL-4 Expression bei einem Magenkarzinom. Man erkennt die gleichmäßige Hintergrundfärbung mittels Hämatoxylin und die prominent zytoplasmatisch gefärbten Tumorzellen. In Abbildung 7b wird wieder ein Tumor mit einer negativen IL-4 Expression gezeigt.



a) positive IL-4 Rezeptor Expression b) negative IL-4 Rezeptor Expression

Abbildung 8: IL-4 Rezeptor Immunhistochemie bei einem Magenkarzinom bei 10-facher Vergrößerung (der Balken am rechten unteren Bildrand entspricht 200µm)

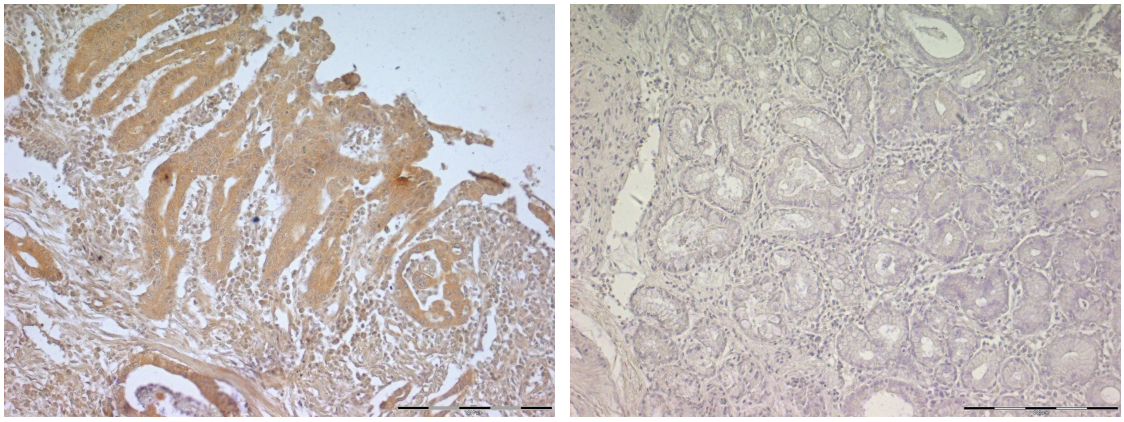
Abbildung 8a zeigt versprengte Tumorzellen unter dem Endothel im Bindegewebe des Magens. Sehr deutlich wird wieder die spezifische Anfärbung der Tumorzellen. In diesem Schnitt ist jedoch das Interstitium nicht unbeträchtlich gefärbt. In Abbildung 8b wird eine negative Expression von IL-4 Rezeptor in einem Präparat dargestellt.



a) positive IL-13 Expression b) negative IL-13 Expression

Abbildung 9: IL-13 Immunhistochemie bei einem Magenkarzinom bei 10-facher Vergrößerung (der Balken am rechten unteren Bildrand entspricht 200µm)

Abbildung 9a zeigt einen Schnitt mit einer positiven IL-13 Expression bei diffuser, zytoplasmatischer und leicht granulärer Färbung. Die Färbung imponiert wieder sehr tumorzellspezifisch, doch auch das Stroma weist fokal leichte Färbungen auf. Rechts davon (Abbildung 9b) ist wieder ein Schnitt mit einer negativen IL-13 Expression. Die Hämatoxylin-Färbung zeigt sich durchgängig homogen.



a) positive IL-13 Rezeptor Expression b) negative IL-13 Rezeptor Expression

Abbildung 10: IL-13 Rezeptor Immunhistochemie bei einem Magenkarzinom bei 10-facher Vergrößerung (der Balken am rechten unteren Bildrand entspricht 200µm)

In Abbildung 10a ist eine positive IL-13 Rezeptor Expression zu erkennen. Das Gewebe ist diffus positiv angefärbt, die Färbeintensität der Mucosazellen ist deutlich höher einzustufen als die des umgebenden Stromas. An einigen Stellen gibt es punktförmige Anreicherungen der Färbung. Diese sind als Artefakte zu werten und werden durch den Färbevorgang bedingt.

3.3. Analyse der Interleukin Expression und deren Rezeptoren bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen und Magenkarzinomen

Die mit den Antikörpern gefärbten Paraffinschnitte wurden, wie in den Methoden beschrieben, zunächst einer Intensität (0= keine Färbung, 1= schwach positive Färbung, 2= mäßig positive Färbung, 3= starke Färbung) zugeordnet und anschließend einem Score (negativ = Intensität 0 + 1, positiv = Intensität 2 + 3) zugewiesen. Die Unterteilung in diesen Score wurde für die Berechnung der Vier-Felder-Tafeln und der Überlebenskurven benutzt. Alle Antikörper wurden nach dem gleichen System bewertet. Von allen in die Studie eingeschlossenen Patienten standen geeignete Präparate zur Verfügung, die Drop-Outs sind in den Methoden zu finden. Die Analyse der Antikörper wurde jeweils nach dem gleichen Schema durchgeführt.

Im ersten Schritt der Antikörper-Analyse wurde versucht, eine Korrelation der spezifischen Interleukin-Intensitäten mit klinischen Parametern wie Tumorstatus (T), Lymphknotenstatus (N) und Grading (G) anhand von Vier-Felder-Tafeln herzustellen. Die p-Werte wurden mit dem Chi-Square-Test errechnet. In einem zweiten Schritt wurde anhand von Kaplan-Meier Kurven Überlebenszeit und krankheitsfreie Überlebenszeit analysiert, hier wurden die p-Werte mit dem Log-rank Test errechnet. Da die Analyse bei allen Antikörpern analog und wie hier beschrieben durchgeführt wurde, wird sie unten an den entsprechenden Stellen nicht mehr weiter erläutert.

Zudem wurde die Interleukin Expression in Korrelation mit den Rezidiven untersucht. Hier konnte kein Zusammenhang hergestellt werden, deshalb werden die einzelnen Ergebnisse nicht weiter aufgeführt.

3.3.1. IL-4 bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen

Die mit dem monoklonalen Maus IgG1 Antikörper (MAB 304) angefärbten Paraffinschnitte wurden, wie oben beschrieben, bewertet und analysiert. Klinische Parameter wurden in Zusammenhang mit den IL-4 Intensitäten untersucht (vgl. Tabelle 4). Hierbei konnte kein Zusammenhang der IL-4 Expression in Beziehung zu Tumorstadium, Grading und Überleben hergestellt werden. Doch scheint eine niedrige IL-4 Expression die Entstehung von Lymphknotenmetastasen zu

begünstigen bzw. vice versa eine hohe IL-4 Expression die Entstehung von Lymphknotenmetastasen zu vermindern.

Tabelle 4: IL-4 in Beziehung zu Tumorstadium, Lymphknotenstadium, Grading und Überleben bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen

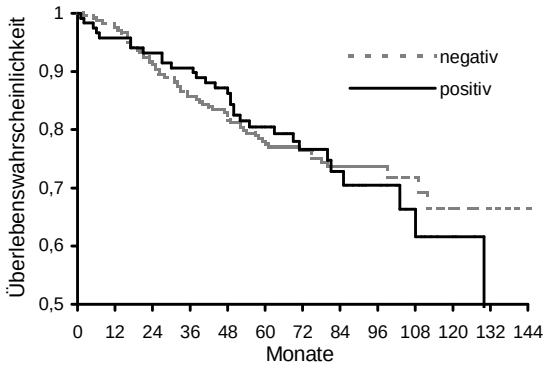
(Erfassungszeitraum 2001-2010, Universitätsklinik Ulm)

Legende: *IL: Interleukin, n: Anzahl, T: Tumorstadium, N_x: Lymphknotenstadium, G: Grading, p: p-Wert (Chi-square-Test)*

	n	**Tumorstadium**		
		$T_{1+}T_2$	$T_{3+}T_4$	*p*
Total	359 (100%)	116 (32%)	243 (68%)	
IL-4 Färbeintensität				
negativ (0+1)	241 (100%)	78 (32%)	163 (68%)	0,9288
positiv (2+3)	118 (100%)	38 (32%)	80 (68%)	
	n	**Lymphknotenstadium**		
		N_0	N_+	*p*
Total	359 (100%)	184 (51%)	175 (49%)	
IL-4 Färbeintensität				
negativ (0+1)	241 (100%)	110 (46%)	131 (54%)	0,0034
positiv (2+3)	118 (100%)	74 (63%)	44 (37%)	
	n	**Grading**		
		G_{1+2}	G_{3+4}	*p*
Total	359 (100%)	276 (77%)	83 (23%)	
IL-4 Färbeintensität				
negativ (0+1)	241 (100%)	181 (75%)	60 (25%)	0,3136
positiv (2+3)	118 (100%)	95 (81%)	23 (19%)	

Anschließend wurden die IL-4 Intensitäten in Beziehung zu Überlebenszeit und krankheitsfreier Überlebenszeit in Kaplan-Meier Kurven analysiert (vgl. Abbildung 13). Hier konnte kein Zusammenhang festgestellt werden.

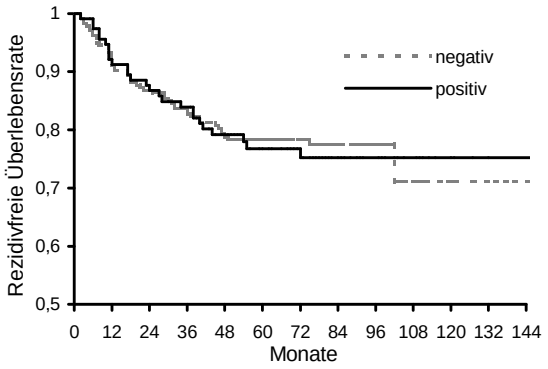
a)



Überlebenskurve für Patienten mit negativer (n=241) und positiver (n=118) IL-4 Intensitäts-Bewertung im Primärtumor (Log-rank Test: p= 0,8185)

Legende: *IL : Interleukin, n: Anzahl, p: p-Wert*

b)



Rezidivfreie Überlebensrate für Patienten mit negativer (n=241) und positiver (n=118) IL-4 Intensitäts-Bewertung im Primärtumor (Log-rank Test: p= 0,9252)

Legende: *IL : Interleukin, n: Anzahl, p: p-Wert*

Abbildung 11: Darstellung des allgemeinen und des krankheitsfreien Überlebens bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen anhand einer Kaplan-Meier Kurve für negative und positive Intensität von IL-4 (Erfassungszeitraum 2001-2010, Universitätsklinik Ulm)

3.3.2. IL-4 bei Patienten mit Magenkarzinomen

Die Auswertung der mit dem monoklonalen Maus IgG1 Antikörper (MAB 304) gefärbten Paraffinschnitte der Magenkarzinome wurde, wie oben beschrieben, durchgeführt. Tabelle 5 zeigt klinische Parameter in Abhängigkeit der IL-4 Expression. Hierbei gab es keine offensichtlichen Zusammenhänge.

Es folgt in Abbildung 14 die Darstellung des Überlebens und des krankheitsfreien Überlebens anhand von Kaplan-Meier-Kurven. Hier konnten keine eindeutigen Zusammenhänge festgestellt werden. In Abbildung 14a ist jedoch zu erkennen, dass es nach 24 Monaten einen deutlichen Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit zwischen den für IL-4 positiv und negativ klassifizierten Magenkarzinomen gab, der sich aber nicht als signifikant erwies.

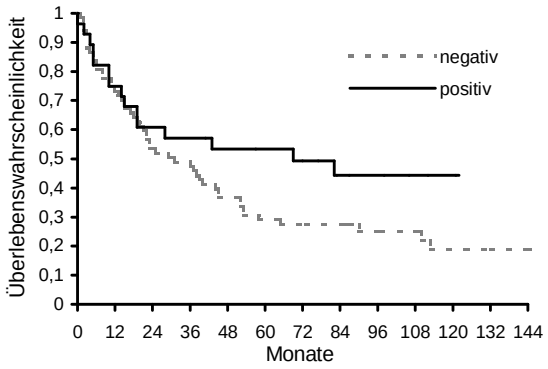
Tabelle 5: IL-4 in Beziehung zu Tumorstadium, Lymphknotenstadium, Grading und Überleben bei Patienten mit Magenkarzinomen

(Erfassungszeitraum 1998-2010, Universitätsklinik Ulm)

Legende: *IL : Interleukin, n: Anzahl, T: Tumorstadium, N_x: Lymphknotenstadium, G: Grading, p: p-Wert (Chi-square-Test)*

		Tumorstadium		
	n	$T_{1+}T_2$	$T_{3+}T_4$	*p*
Total	95 (100%)	58 (61%)	37 (39%)	
IL-4 Färbeintensität				
negativ (0+1)	37 (100%)	21 (57%)	16 (43%)	0,6383
positiv (2+3)	58 (100%)	37 (64%)	21 (36%)	
		Lymphknotenstadium		
	n	N_0	N_+	*p*
Total	95 (100%)	28 (29%)	67 (71%)	
IL-4 Färbeintensität				
negativ (0+1)	37 (100%)	9 (24%)	28 (76%)	0,5167
positiv (2+3)	58 (100%)	19 (33%)	39 (67%)	
		Grading		
	n	G_{1+2}	G_{3+4}	*p*
Total	95 (100%)	20 (21%)	75 (79%)	
IL-4 Färbeintensität				
negativ (0+1)	37 (100%)	5 (14%)	32 (86%)	0,2374
positiv (2+3)	58 (100%)	15 (26%)	43 (74%)	

a)

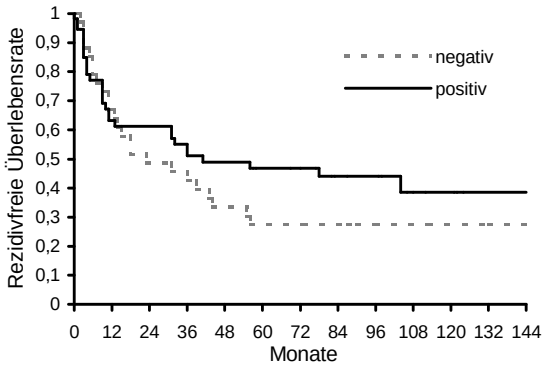


Überlebenskurve für Patienten mit negativer (n=37) und positiver (n=58) IL-4 Intensitäts-Bewertung im Primärtumor

(Log-rank Test: p= 0,5600)

Legende: *IL : Interleukin, n: Anzahl, p: p-Wert*

b)



Rezidivfreie Überlebensrate für Patienten mit negativer (n=37) und positiver (n=58) IL-4 Intensitäts-Bewertung im Primärtumor (Log-rank Test: p= 0,2926)

Legende: *IL : Interleukin, n: Anzahl, p: p-Wert*

Abbildung 12: Darstellung des allgemeinen und des krankheitsfreien Überlebens bei Patienten mit Magenkarzinomen anhand einer Kaplan-Meier Kurve für negative und positive Intensität von IL-4 (Erfassungszeitraum 1998-2010, Universitätsklinik Ulm)

3.3.3. IL-4 Rezeptor bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen

Die mit dem monoklonalen Maus IgG_{2A} Antikörper (MAB230) angefärbten Paraffinschnitte wurden, wie oben beschrieben, in die Auswertung einbezogen.

Zunächst wurde wieder versucht, einen Zusammenhang zwischen der IL-4 Rezeptor Expression und klinischen Parametern herzustellen (vgl. Tabelle 6). Hierbei zeigte sich ein klarer Zusammenhang zwischen IL-4 Rezeptor Expression und Lymphknotenstadium. Eine hohe Expression des IL-4 Rezeptors führte zu signifikant weniger Lymphknotenmetastasen. Beim Grading ließ sich der Trend feststellen, dass eine hohe IL-4 Expression häufiger bei G_1 und G_2 klassifizierten Tumoren vorzufinden ist. Beim Tumorstadium und Überleben konnten keine Zusammenhänge mit der IL-4 Rezeptor Expression festgestellt werden. Abbildung 15 zeigt das allgemeine und krankheitsfreie Überleben in Abhängigkeit von der IL-4 Rezeptor Expression mittels Kaplan-Meier Kurven. Hier wurde keine Korrelation ersichtlich.

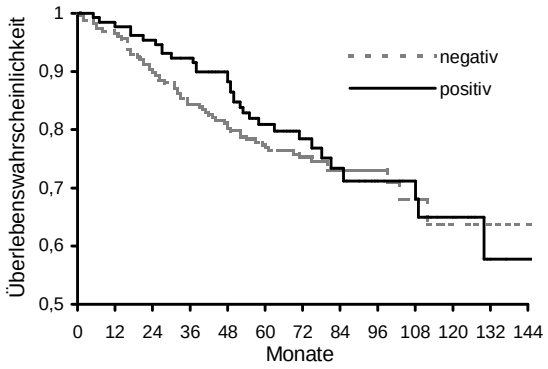
Tabelle 6: IL-4 Rezeptor in Beziehung zu Tumorstadium, Lymphknotenstadium, Grading und Überleben bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen

(Erfassungszeitraum 2001-2010, Universitätsklinik Ulm)

Legende: *IL : Interleukin, n: Anzahl, T: Tumorstadium, N_x: Lymphknotenstadium, G: Grading, p: p-Wert (Chi-square-Test)*

	n	**Tumorstadium**		
		$T_{1+}T_2$	$T_{3+}T_4$	*p*
Total	359 (100%)	116 (32%)	243 (68%)	
IL-4 R- Färbeintensität				
negativ (0+1)	229 (100%)	69 (30%)	160 (70%)	0,2913
positiv (2+3)	130 (100%)	47 (36%)	83 (64%)	
	n	**Lymphknotenstadium**		
		N_0	N_+	*p*
Total	359 (100%)	184 (51%)	175 (49%)	
IL-4 R- Färbeintensität				
negativ (0+1)	229 (100%)	94 (41%)	135 (59%)	0,0001
positiv (2+3)	130 (100%)	90 (69%)	40 (31%)	
	n	**Grading**		
		G_{1+2}	G_{3+4}	*p*
Total	359 (100%)	276 (77%)	83 (23%)	
IL-4 R- Färbeintensität				
negativ (0+1)	229 (100%)	169 (74%)	60 (26%)	0,0877
positiv (2+3)	130 (100%)	107 (82%)	23 (18%)	

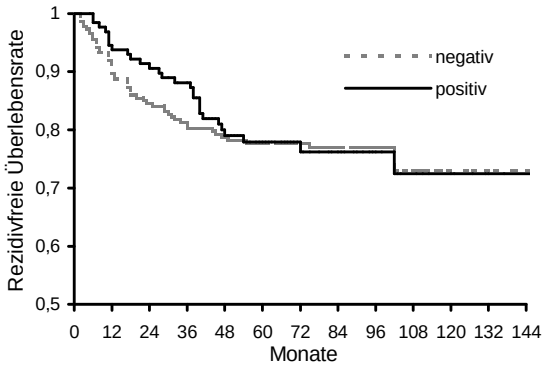
a)



Überlebenskurve für Patienten mit negativer (n=229) und positiver (n=130) IL-4 Rezeptor Intensitäts-Bewertung im Primärtumor (Log-rank Test: p= 0,7412)

Legende: *IL : Interleukin, n: Anzahl, p: p-Wert*

b)



Rezidivfreie Überlebensrate für Patienten mit negativer (n=229) und positiver (n=130) IL-4 Rezeptor Intensitäts-Bewertung im Primärtumor (Log- rank Test: p= 0,7740)

Legende: *IL : Interleukin, n: Anzahl, p: p-Wert*

Abbildung 13: Darstellung des allgemeinen und des krankheitsfreien Überlebens bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen anhand einer Kaplan-Meier Kurve für negative und positive Intensität von IL-4 Rezeptor (Erfassungszeitraum 2001-2010, Universitätsklinik Ulm)

3.3.4. IL-4 Rezeptor bei Patienten mit Magenkarzinomen

Die mit dem monoklonalen Maus IgG_{2A} Antikörper (MAB230) gefärbten Paraffinschnitte der Magenkarzinome wurden, wie oben beschrieben, anhand ihrer Intensität bewertet und in die Auswertung einbezogen. Anhand von Vier-Felder Tafeln (vgl. Tabelle 7) wurde versucht, eine Korrelation der IL-4 Rezeptor Expression mit klinischen Parametern herzustellen. Hierbei zeigte sich ein nicht signifikanter Trend zwischen IL-4 Rezeptor Expression und Überleben. Es scheint, dass eine hohe IL-4 Rezeptor Expression in den Karzinomen zu einer höheren Überlebenswahrscheinlichkeit führen könnte. Bei den anderen klinischen Parametern konnte kein Zusammenhang hergestellt werden.

Nun wurde erneut anhand von Kaplan-Meier Kurven (vgl. Abbildung 16) das Überleben und das krankheitsfreie Überleben analysiert. Die Darstellung für die rezidivfreie Überlebensrate in Abbildung 16b zeigt einen deutlichen Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit von negativ und positiv klassifizierten Karzinomen. Eine hohe IL-4 Rezeptor Expression wirkt sich damit prognostisch

günstig auf das rezidivfreie Überleben aus. Auch in der Überlebenskurve lassen sich Anzeichen für eine prognostisch günstige Beeinflussung durch eine hohe IL-4 Rezeptor Expression erkennen, auch wenn sich diese als nicht signifikant erwies.

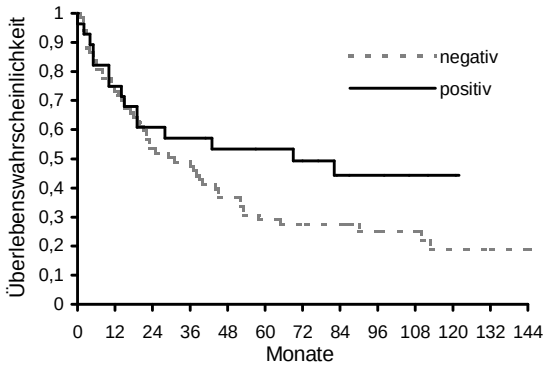
Tabelle 7: IL-4 Rezeptor in Beziehung zu Tumorstadium, Lymphknotenstadium, Grading und Überleben bei Patienten mit Magenkarzinomen

(Erfassungszeitraum 1998-2010, Universitätsklinik Ulm)

Legende: *IL : Interleukin, n: Anzahl, T: Tumorstadium, N_x: Lymphknotenstadium, G: Grading, p: p-Wert (Chi-square-Test)*

		Tumorstadium		
	n	$T_{1+}T_2$	$T_{3+}T_4$	*p*
Total	95 (100%)	58 (61%)	37 (39%)	
IL-4 R- Färbeintensität				
negativ (0+1)	67 (100%)	40 (60%)	27 (40%)	0,8516
positiv (2+3)	28 (100%)	18 (64%)	10 (36%)	
		Lymphknotenstadium		
	n	N_0	N_+	*p*
Total	95 (100%)	28 (29%)	67 (71%)	
IL-4 R- Färbeintensität				
negativ (0+1)	67 (100%)	19 (28%)	48 (72%)	0,9012
positiv (2+3)	28 (100%)	9 (32%)	19 (68%)	
		Grading		
	n	G_{1+2}	G_{3+4}	*p*
Total	95 (100%)	20 (21%)	75 (79%)	
IL-4 R- Färbeintensität				
negativ (0+1)	67 (100%)	12 (18%)	55 (82%)	0,3756
positiv (2+3)	28 (100%)	8 (29%)	20 (71%)	

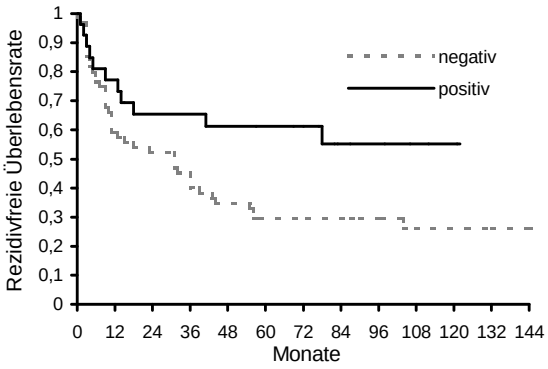
a)



Überlebenskurve für Patienten mit negativer (n=67) und positiver (n=28) IL-4 Rezeptor Intensitäts-Bewertung im Primärtumor (Log-rank Test: p= 0,1121)

Legende: *IL : Interleukin, n: Anzahl, p: p-Wert*

b)



Rezidivfreie Überlebensrate für Patienten mit negativer (n=67) und positiver (n=28) IL-4 Rezeptor Intensitäts-Bewertung im Primärtumor (Log-rank Test: p= 0,0355)

Legende: *IL : Interleukin, n: Anzahl, p: p-Wert*

Abbildung 14: Darstellung des allgemeinen und des krankheitsfreien Überlebens anhand einer Kaplan-Meier Kurve für negative und positive Intensität von IL-4 Rezeptor bei Patienten mit Magenkarzinomen (Erfassungszeitraum 1998-2010, Universitätsklinik Ulm)

3.3.5. IL-13 bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen

Die mit dem monoklonalen Ratte IgG_1 Antikörper (AHCO1329) angefärbten Paraffinschnitte wurden, wie oben bereits erwähnt, ihrer Intensität entsprechend in die Analyse einbezogen.

Zunächst wurden wieder anhand von Vier-Felder Tafeln die klinischen Parameter in Zusammenhang mit der IL-13 Expression analysiert (vgl. Tabelle 8). Beim Überleben stellte sich heraus, dass sich eine hohe IL-13 Expression prognostisch günstig auf das Überleben auswirkt, beziehungsweise vice versa eine niedrige Expression sich prognostisch ungünstig auswirken kann. Beim Tumorstadium scheint es einen Trend zu geben, der bei fortgeschritteneren Tumorstadien (T_3 + T_4) zu einer höheren IL-13 Expression führt. Anschließend wurde wieder die Überlebenszeit und die krankheitsfreie Überlebenszeit in Abhängigkeit zur IL-13 Expression analysiert (vgl. Abbildung 17). Hier zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang von IL-13 Expression und Überlebenswahrscheinlichkeit. Eine

hohe IL-13 Expression führt, wie Abbildung 17a zeigt, zu einer signifikant höheren Überlebenswahrscheinlichkeit bei kolorektalen Karzinomen.

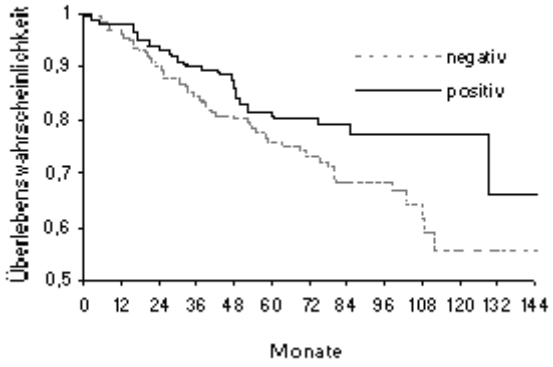
Tabelle 8: IL-13 in Beziehung zu Tumorstadium, Lymphknotenstadium, Grading und Überleben bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen

(Erfassungszeitraum 2001-2010, Universitätsklinik Ulm)

Legende: *IL : Interleukin, n: Anzahl, T: Tumorstadium, N_x: Lymphknotenstadium, G: Grading, p: p-Wert (Chi-square-Test)*

		Tumorstadium		
	n	$T_{1+}T_2$	$T_{3+}T_4$	*p*
Total	359 (100%)	116 (32%)	243 (68%)	
IL-13 Färbeintensität				
negativ (0+1)	178 (100%)	65 (37%)	113 (63%)	0,1149
positiv (2+3)	181 (100%)	51 (28%)	130 (72%)	
		Lymphknotenstadium		
	n	N_0	N_+	*p*
Total	359 (100%)	184 (51%)	175 (49%)	
IL-13 Färbeintensität				
negativ (0+1)	178 (100%)	88 (49%)	90 (51%)	0,5641
positiv (2+3)	181 (100%)	96 (53%)	85 (47%)	
		Grading		
	n	G_{1+2}	G_{3+4}	*p*
Total	359 (100%)	276 (77%)	83 (23%)	
IL-13 Färbeintensität				
negativ (0+1)	178 (100%)	138 (78%)	40 (22%)	0,8701
positiv (2+3)	181 (100%)	138 (76%)	43 (24%)	

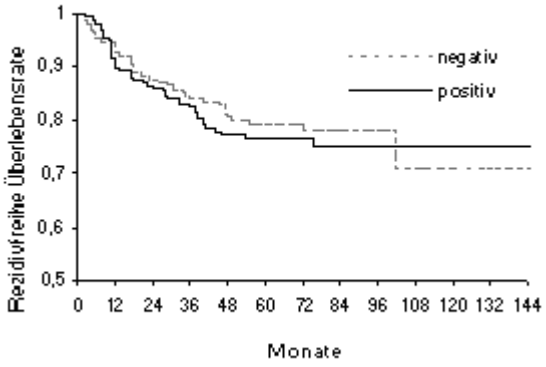
a)



Überlebenskurve für Patienten mit negativer (n=178) und positiver (n=181) IL-13 Intensitäts-Bewertung im Primärtumor (Log-rank Test: p= 0,0414)

Legende: *IL : Interleukin, n: Anzahl, p: p-Wert*

b)



Rezidivfreie Überlebensrate für Patienten mit negativer (n=178) und positiver (n=181) IL-13 Intensitäts-Bewertung im Primärtumor (Log-rank Test: p= 0,7000)

Legende: *IL : Interleukin, n: Anzahl, p: p-Wert*

Abbildung 15: Darstellung des allgemeinen und des krankheitsfreien Überlebens bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen anhand einer Kaplan-Meier Kurve für negative und positive Intensität von IL-13 (Erfassungszeitraum 2001-2010, Universitätsklinik Ulm)

3.3.6. IL-13 bei Patienten mit Magenkarzinomen

Die mit dem monoklonalen Ratte IgG_1 Antikörper (AHCO1329) angefärbten Paraffinschnitte wurden, wie oben bereits erwähnt, in die Analyse aufgenommen.

In einem ersten Schritt wurde wieder anhand von Vier-Felder Tafeln versucht Korrelationen zwischen klinischen Parametern und IL-13 Expression herzustellen (vgl. Tabelle 9). Ein Zusammenhang konnte beim Grading festgestellt werden. In Tabelle 9 wird ersichtlich, dass eine hohe IL-13 Expression verhältnismäßig häufiger bei G_1 und G_2 klassifizierten Karzinomen vorzufinden ist, beziehungsweise eine niedrige IL-13 Expression häufiger bei G_3 und G_4 klassifizierten Karzinomen. Bei den anderen klinischen Parametern ließ sich kein Zusammenhang feststellen.

In einem zweiten Schritt wurde mittels Kaplan-Meier Kurven das Überleben und die rezidivfreie Überlebenszeit analysiert (vgl. Abbildung 18). Hier konnte kein Zusammenhang nachgewiesen werden.

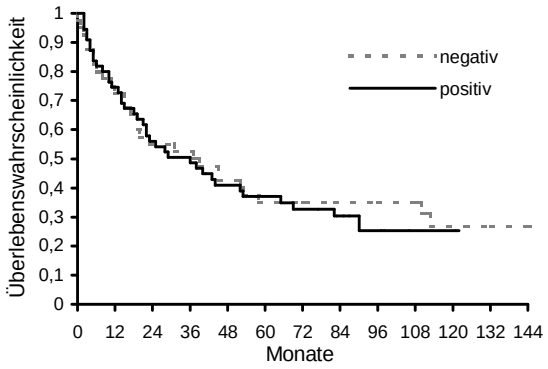
Tabelle 9: IL-13 in Beziehung zu Tumorstadium, Lymphknotenstadium, Grading und Überleben bei Patienten mit Magenkarzinomen

(Erfassungszeitraum 1998-2010, Universitätsklinik Ulm)

Legende: *IL : Interleukin, n: Anzahl, T: Tumorstadium, N_x: Lymphknotenstadium, G: Grading, p: p-Wert (Chi-square-Test)*

	n	**Tumorstadium**		
		$T_{1+}T_2$	$T_{3+}T_4$	*p*
Total	95 (100%)	58 (61%)	37 (39%)	
IL-13 Färbeintensität				
negativ (0+1)	40 (100%)	24 (60%)	16 (40%)	0,9732
positiv (2+3)	55 (100%)	34 (62%)	21 (38%)	
	n	**Lymphknotenstadium**		
		N_0	N_+	*p*
Total	95 (100%)	28 (29%)	67 (71%)	
IL-13 Färbeintensität				
negativ (0+1)	40 (100%)	13 (33%)	27 (67%)	0,7461
positiv (2+3)	55 (100%)	15 (27%)	40 (73%)	
	n	**Grading**		
		G_{1+2}	G_{3+4}	*p*
Total	95 (100%)	20 (21%)	75 (79%)	
IL-13 Färbeintensität				
negativ (0+1)	40 (100%)	4 (10%)	36 (90%)	0,0456
positiv (2+3)	55 (100%)	16 (29%)	39 (71%)	

a)

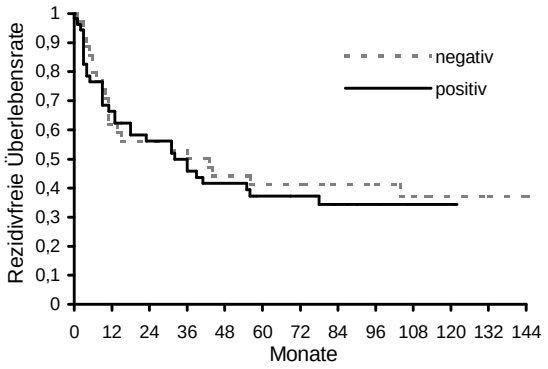


Überlebenskurve für Patienten mit negativer (n=40) und positiver (n=55) IL-13 Intensitäts-Bewertung im Primärtumor

(Log-rank Test: p= 0,7547)

Legende: *IL : Interleukin, n: Anzahl, p: p-Wert*

b)



Rezidivfreie Überlebensrate für Patienten mit negativer (n=40) und positiver (n=55) IL-13 Intensitäts-Bewertung im Primärtumor

(Log-rank Test: p= 0,6428)

Legende: *IL : Interleukin, n: Anzahl, p: p-Wert*

Abbildung 16: Darstellung des allgemeinen und des krankheitsfreien Überlebens anhand einer Kaplan-Meier Kurve für negative und positive Intensität von IL-13 bei Patienten mit Magenkarzinomen (Erfassungszeitraum 1998-2010, Universitätsklinik Ulm)

3.3.7. IL-13 Rezeptor bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen

Die mit dem polyklonalen Ziege IgG Antikörper (AF152) angefärbten Paraffinschnitte wurden, wie oben bereits erwähnt, anhand ihrer Intensität bewertet und in die Analyse aufgenommen.

Es wurden wieder die klinischen Parameter in Beziehung zur IL-13 Rezeptor Expression untersucht (vgl. Tabelle 10). Hierbei zeigte sich ein klarer Zusammenhang zwischen IL-13 Rezeptor Expression und Lymphknoten-Stadium. Eine hohe IL-13 Rezeptor Expression unterdrückt und eine niedrige Expression befördert die Entstehung von Lymphknotenmetastasen bei kolorektalen Karzinomen.

Beim Grading zeigte sich, dass G_1 und G_2 klassifizierte Karzinome häufiger hohe IL-13 Rezeptor Expressionen aufweisen als dies bei höher klassifizierten Karzinomen der Fall war. Nun wurde in Abbildung 19 Überleben und krankheitsfreies Überleben anhand von Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Hierbei konnten keine Zusammenhänge nachgewiesen werden.

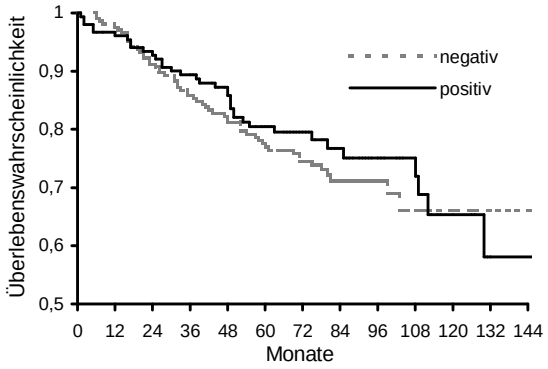
Tabelle 10: IL-13 Rezeptor in Beziehung zu Tumorstadium, Lymphknotenstadium, Grading und Überleben bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen

(Erfassungszeitraum 2001-2010, Universitätsklinik Ulm)

Legende: *IL : Interleukin, n: Anzahl, T: Tumorstadium, N_x: Lymphknotenstadium, G: Grading, p: p-Wert (Chi-square-Test)*

		Tumorstadium		
	n	$T_{1+}T_2$	$T_{3+}T_4$	*p*
Total	359 (100%)	116 (32%)	243 (68%)	
IL-13 R- Färbeintensität				
negativ (0+1)	207 (100%)	62 (30%)	145 (70%)	0,3165
positiv (2+3)	152 (100%)	54 (36%)	98 (64%)	
		Lymphknotenstadium		
	n	N_0	N_+	*p*
Total	359 (100%)	184 (51%)	175 (49%)	
IL-13 R- Färbeintensität				
negativ (0+1)	207 (100%)	78 (38%)	129 (62%)	0,0001
positiv (2+3)	152 (100%)	106 (70%)	46 (30%)	
		Grading		
	n	G_{1+2}	G_{3+4}	*p*
Total	359 (100%)	276 (77%)	83 (23%)	
IL-13 R- Färbeintensität				
negativ (0+1)	207 (100%)	150 (72%)	57 (28%)	0,0286
positiv (2+3)	152 (100%)	126 (83%)	26 (17%)	

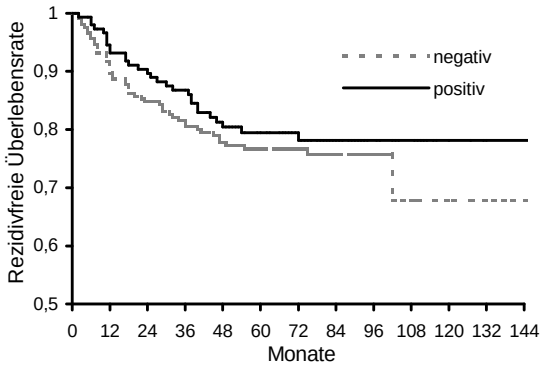
a)



Überlebenskurve für Patienten mit negativer (n=207) und positiver (n=152) IL-13 Rezeptor Intensitäts-Bewertung im Primärtumor (Log-rank Test: p= 0,4683)

Legende: *IL : Interleukin, n: Anzahl, p: p-Wert*

b)



Rezidivfreie Überlebensrate für Patienten mit negativer (n=207) und positiver (n=152) IL-13 Rezeptor Intensitäts-Bewertung im Primärtumor (Log-rank Test: p= 0,3404)

Legende: *IL : Interleukin, n: Anzahl, p: p-Wert*

Abbildung 17: Darstellung des allgemeinen und des krankheitsfreien Überlebens bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen anhand einer Kaplan-Meier Kurve für negative und positive Intensität von IL-13 Rezeptor (Erfassungszeitraum 2001-2010, Universitätsklinik Ulm)

3.3.8. IL-13 Rezeptor bei Patienten mit Magenkarzinomen

Die mit dem polyklonalen Ziege IgG Antikörper (AF152) angefärbten Paraffinschnitte wurden, wie oben bereits erwähnt, einer Intensität zugeordnet, danach bewertet und analysiert. In einem ersten Schritt wurde anhand von Vier-Felder Tafeln versucht, Korrelationen zwischen klinischen Parametern und IL-13 Rezeptor Expression herzustellen (vgl. Tabelle 11). In einem zweiten Schritt wurde mittels Kaplan-Meier Kurven das Überleben und die rezidivfreie Überlebenszeit analysiert (vgl. Abbildung 20). Bei beiden Analysen konnten keine Zusammenhänge von IL-13 Rezeptor Expression und klinischen Parametern, bzw. krankheitsfreien Überleben und Überleben hergestellt werden.

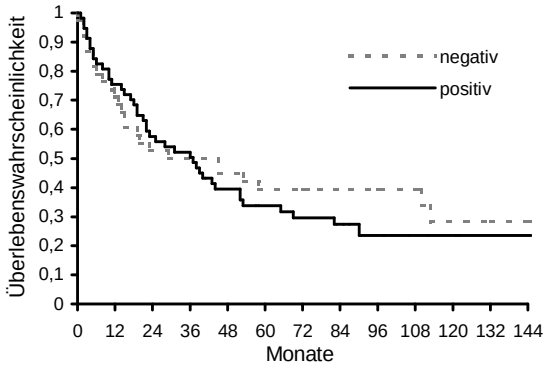
Tabelle 11: IL-13 Rezeptor in Beziehung zu Tumorstadium, Lymphknotenstadium, Grading und Überleben bei Patienten mit Magenkarzinomen

(Erfassungszeitraum 1998-2010, Universitätsklinik Ulm)

Legende: *IL : Interleukin, N: Anzahl, T: Tumorstadium, N_x: Lymphknotenstadium, G: Grading, P: p-Wert (Chi-square-Test)*

		Tumorstadium		
	n	$T_{1+}T_2$	$T_{3+}T_4$	*p*
Total	95 (100%)	58 (61%)	37 (39%)	
IL-13 R- Färbeintensität				
negativ (0+1)	38 (100%)	24 (63%)	14 (37%)	0,8975
positiv (2+3)	57 (100%)	34 (60%)	23 (40%)	
		Lymphknotenstadium		
	n	N_0	N_+	*p*
Total	95 (100%)	28 (29%)	67 (71%)	
IL-13 R- Färbeintensität				
negativ (0+1)	38 (100%)	13 (34%)	25 (66%)	0,5504
positiv (2+3)	57 (100%)	15 (26%)	42 (74%)	
		Grading		
	n	G_{1+2}	G_{3+4}	*p*
Total	95 (100%)	20 (21%)	75 (79%)	
IL-13 R- Färbeintensität				
negativ (0+1)	38 (100%)	5 (13%)	33 (87%)	0,1991
positiv (2+3)	57 (100%)	15 (26%)	42 (74%)	

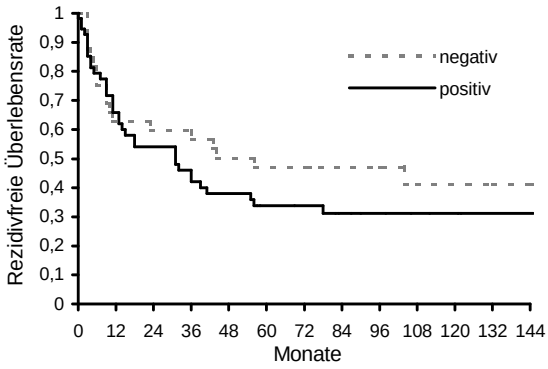
a)



Überlebenskurve für Patienten mit negativer (n=38) und positiver (n=57) IL-13 Rezeptor-Intensitäts-Bewertung im Primärtumor (Log-rank Test: p= 0,5421)

Legende: *IL : Interleukin, n: Anzahl, p: p-Wert*

b)



Rezidivfreie Überlebensrate für Patienten mit negativer (n=38) und positiver (n=57) IL-13 Rezeptor-Intensitäts-Bewertung im Primärtumor (Log-rank Test: p= 0,2763)

Legende: *IL : Interleukin, n: Anzahl, p: p-Wert*

Abbildung 18: Darstellung des allgemeinen und des krankheitsfreien Überlebens bei Patienten mit Magenkarzinomen anhand einer Kaplan-Meier Kurve für negative und positive Intensität von IL-13 Rezeptor (Erfassungszeitraum 1998-2010, Universitätsklinik Ulm)

3.4. Nicht dargestellte Ergebnisse

Bei allen untersuchten Antikörpern wurde versucht, eine Korrelation zwischen der Intensität der Expression und der Tumorgröße (T), dem Fernmetastasenstatus (M) und der Rezidivhäufigkeit mittels Chi-Square Test herzustellen. Außerdem wurden die Darstellung der Antikörper in den gefärbten Präparaten (granulär vs. homogen) und die Verteilung derselben im Tumor (fokal vs. diffus) ausgewertet und untersucht. Hierbei konnten jedoch keine Zusammenhänge mit prognostischen Parametern ermittelt werden. Zusätzlich wurde mittels des Chi-Square Tests untersucht, ob sich eine hohe IL-13 Expression in Kombination mit einer hohen IL-13R Expression auf die Prognose oder klinische Parameter auswirkt. Dies konnte nicht bestätigt werden. Des Weiteren wurde der gleiche Zusammenhang bei hohen IL-4 Expression und einer hohen IL-4R Expression untersucht, was ebenfalls nicht bestätigt werden konnte. Schließlich wurde die Kombination einer hohen Expression von IL-13, IL-13R und IL-4R mit klinischen und prognostischen

Parametern korreliert. Hierbei zeigten sich auch keine Zusammenhänge. Die Daten dieser Analysen werden hier nicht weiter aufgeführt.

3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse bei kolorektalen Karzinomen

Die Ergebnisse veranschaulichen, dass Patienten mit einer hohen Expression von IL-13 im Vergleich zu solchen mit einer niedrigen Expression von einem signifikant längerem Gesamtüberleben profitierten (p=0,04). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Patienten mit hohen IL-4, IL-4R und IL-13R exprimierenden Karzinomen eine signifikant niedrigere Rate an Lymphknotenbefall (N) aufwiesen (p=0,003, p=0,0001, p=0,0001).
Außerdem wurde dargestellt, dass Karzinome mit einer hohen IL-13R Expression häufiger mit einem niedrigen histologischem Grading (1+2) klassifiziert wurden (p=0,02).

3.6. Zusammenfassung der Ergebnisse bei Magenkarzinomen

Es wurde ermittelt, dass Patienten, deren Magenkarzinome eine hohe Expression von IL-4R aufwiesen, von einer signifikant längeren rezidivfreien Überlebenszeit profitierten (p=0,03).
Zudem konnte nachgewiesen werden, dass Karzinome mit einer hohen Expression von IL-13 häufiger mit einem niedrigerem histologischen Grading (1+2) klassifiziert wurden (p=0,04).

4. Diskussion

Die vorliegende Studie untersucht die Expression und den prognostischen Wert von Interleukin (IL-) 4, IL-13 und deren Rezeptoren bei Patienten mit kolorektalen und Magenkarzinomen. Die Entscheidung zu einer Untersuchung der Zytokine IL-4 und IL-13 und deren Rezeptoren bei kolorektalen und Magenkarzinomen basiert auf zwei Gründen: Zum Einen aufgrund ihrer wichtigen Rolle im Bereich der Tumorimmunologie und zum Anderen aufgrund der bereits bestehenden Erfahrung unserer Arbeitsgruppe bezüglich der Analyse von IL-4 und IL-13 in Tumorgeweben.

Bis heute ist nur sehr wenig über die Expression dieser Zytokine und ihren korrespondierenden Rezeptoren bei kolorektalen und besonders bei Magenkarzinomen bekannt. Wie bereits erwähnt ist dies, nach unserem Wissen, die erste Untersuchung, welche die Expression der oben genannten Zytokine und ihrer Rezeptoren in Tumorpräparaten von primären kolorektalen und Magenkarzinomen mittels Immunhistochemie evaluiert, um diese als zusätzliche prognosebestimmende Faktoren zu identifizieren. Hier könnte in Zukunft eine Möglichkeit liegen, um zu einer optimierten Therapiefindung beizutragen.

Die Etablierung einer reproduzierbaren Immunhistochemie, welche zu einer optimalen Beurteilbarkeit der oben genannten Zytokine und ihrer Rezeptoren führt, und die anschließende Analyse der angefärbten Tumorschnitte unter dem Mikroskop, stellen wesentliche Teile dieser Arbeit dar.

Die Vorteile der Immunhistochemie bestehen in der Einfachheit der Methode, den niedrigen Kosten und der Möglichkeit, auch aus alten Paraffinblöcken verwertbare Präparate zu erhalten. Die größten Nachteile bestehen in der Subjektivität der Auswertung, die auf einer visuellen Skala und nicht auf tatsächlich gemessenen Werten basiert, und in dem hohen Zeitaufwand, welcher zur Färbung und Beurteilung der Präparate benötigt wird.

Die Prognose von Patienten mit einem kolorektalen oder Magenkarzinom hängt von klinischen, pathologischen und molekulargenetischen Faktoren ab. Der mit Abstand wichtigste Prognosefaktor ist jedoch bis dato das pathologische, postoperative Tumorstadium, ermittelt nach dem TNM-System der UICC. Die lokale Tiefeinfiltration des Karzinoms in die Darmwand und Umgebung (Kategorie T), der Befall der drainierenden Lymphknoten (Kategorie N) und die

Fernmetastasierung (Kategorie M), stellen die entscheidenden Parameter zur Indikationsstellung einer postoperativen adjuvanten Behandlung sowohl für das kolorektale als auch für das Magenkarzinom dar (detaillierte Tabellen der TNM und UICC Klassifikation sind im Anhang zu finden) [Wittekind et al. 2010]. Das TNM-System gibt jedoch nur eine statische Momentaufnahme des jeweiligen untersuchten Karzinoms wieder. Gebräuchliche dynamische Klassifikationssysteme, die auch die individuelle Tumorbiologie berücksichtigen, fehlen bis heute.

Bisher konnte, wie Klampfer zusammenfasst, nachgewiesen werden, dass Zytokine und Chemokine durch Tumorzellen oder durch Zellen, die sich im Mikromillieu der Tumore befinden, produziert werden und diese das Tumorwachstum, die Differenzierung und das Überleben der Tumorzellen beeinflussen. Die Tumorzellen werden somit maßgeblich von dem sie umgebenen entzündeten Stroma beeinflusst, was nahe legt, dass das Tumormikromilieu einen attraktiven Angriffspunkt für präventive, diagnostische und therapeutische Strategien bietet. Proinflammatorische Zytokine, wie TNFα, IL-6 und IL-1 oder Transkriptionsfaktoren, welche von diesem Mikromilieu produziert werden und unter anderem auch NF-kB und STATs, stellen neue potentielle Ziele für Strategien der Antitumortherapie dar. Für einen TNFα- Antagonisten läuft bereits eine klinische Studie in Phase I/II [Klampfer 2011].

In früheren Untersuchungen, unter anderem durch unsere Arbeitsgruppe, wurde bei Pankreaskarzinomzellen gezeigt, dass IL-4 und IL-13 die gegen den Tumor gerichtete Immunüberwachung unterdrücken und die Tumormetastasierung befördern können. IL-4 und IL-13 werden nachweislich von Pankreaskarzinomzellen exprimiert und können diese durch eine autokrine Stimulierung zum Wachstum anregen [Prokopchuk et al. 2005, Formentini et al. 2009].

IL-13 ist ein immunmodulierendes und anti-inflammatorisches Zytokin, das einen direkten Einfluss auf B-Zellen, auf die Population der Monozyten und auf Makrophagen ausübt und das normalerweise von aktivierten Th-2 Lymphozyten exprimiert wird [Minty et al. 1993]. Obwohl IL-13 prinzipiell ein wichtiger Mediator der Regulation von Interaktionen zwischen hämatopoetischen Zelllinien ist [Zurawski et al. 1994], moduliert es auch viele Mechanismen in endothelialen, mesothelialen und epithelialen Zellarten [Kanai et al. 2000]. IL-13R wird unter

anderem großflächig in nicht-hämatopoetischen Geweben wie Herz, Leber, Muskel, Ovar und Pankreas exprimiert [Aman et al. 1996, Prokopchuk et al. 2005].
Im Forschungsfeld der Tumorimmunologie ist bekannt, dass die Induktion der Th1 und/oder der zytotoxischen T-Zell (CTL) Antwort im Allgemeinen sehr wichtig ist für die Abstoßungsreaktionen von Tumoren. Bei tumorerkrankten Tieren und Menschen konnte gezeigt werden, dass die Th1 Antwort (zuständig für antikörpervermittelte Anaphylaxien/ zellvermittelte Allergien/ CD8+ CTL Antwort) durch die Tumorerkrankung unterdrückt wurde. Eine Erklärung dieser Immunsuppression ist der Wechsel der gegen die Tumorerkrankung gerichteten Immunantwort auf das Th2- System, das die für Abstoßungsreaktionen wichtige Th1-Immunantwort unterdrückt [Terabe et al. 2004]. In vorausgegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass IL-13 das hauptverantwortliche Zytokin darstellt, welches zur Unterdrückung der CTL- gesteuerten Tumorimmunüberwachung und damit auch der Th1 Antwort führt [Terabe et al. 2000]. Zudem führt das von Tumorantigenen aktivierten, natürlichen Killer-T-Zellen (NKT) produzierte IL-13 zu einer Aktivierung von CD11b+Gr-1+ Zellen der myeloiden Reihe. Dadurch werden diese dazu angeregt TGF-β zu produzieren. TGF-β wirkt hingegen direkt auf CD8+ T-Zellen und führt dadurch ebenso zu einer Unterdrückung der tumorspezifischen CTL Antwort [Terabe et al. 2003]. Terabe postuliert in diesem Sinne die Annahme, dass hohe Expressionen von IL-13 zu einer Unterdrückung der immunologischen Tumorabwehr führt, sich also prognostisch ungünstig auswirken.
Im Gegensatz dazu konnten Ma und seine Mitarbeiter demonstrieren, dass IL-13 das Tumorwachstum von B16F1 Melanomen und MethA Fibrosarkomen *in vivo* signifikant reduziert. Dies geschieht möglicherweise durch die Rekrutierung von Neutrophilen, Makrophagen und durch die Steigerung der natürlichen Anti-Tumorimmunität [Ma et al. 2004]. Diese Aussagen decken sich mit den Ergebnissen von Lebel-Binay und seiner Arbeitsgruppe. Hier führte lokal appliziertes IL-13 zu einer Inhibition des Wachstums von Lungenkarzinom- und Mastozytomzellen bei Mäusen [Lebel-Binay et al. 1995]. Diese Untersuchung konnte rekonstruieren, dass IL-13 unter anderem auch zu der Ausbildung einer systemischen, spezifischen Anti-Tumor Antwort führt, die schließlich eine langandauernde protektive Immunität garantiert. Die Ergebnisse dieser experimentellen Studie scheinen unsere Beobachtung zu bestätigen, dass Patienten mit einer hohen IL-13 Expression in ihren kolorektalen Karzinomen eine

bessere Prognose aufwiesen. Dies ist ebenso mit unserer Beobachtung in Einklang zu bringen, dass bei Magenkarzinompatienten eine hohe IL-4R Expression zu einer längeren rezidivfreien Überlebenszeit führt, da IL-13, wie in der Einleitung und weiter unten beschrieben, auch den IL-4R aktivieren kann.

Eine weitere experimentelle Studie von Murata und seinen Mitarbeitern beschreibt, dass sich sowohl IL-4 als auch IL-13 Signaltransduktionswege in den humanen Kolonkarzinomzelllinien HT-29 und WiDr teilen. Beide Interleukine regten die Janus-Kinasen (JAK) 1, 2, und 4 und deren Substrate zur Phosphorylierung an [Murata et al. 1996]. Die Autoren stellten des weiteren fest, dass IL-4 und IL-13 die Phosphorylierung von IL-4 STAT (STAT 6) induzieren. Dies bestätigt erneut, dass IL-13 den IL-4R und seine Signaltransduktionswege benutzen kann. Außerdem scheint die JAK 2 eine wichtige Rolle in der Funktion des IL-4R und des IL-13R bei kolorektalen Karzinomzellen zu spielen.

Mandal et al. untersuchten die Expression von IL-13R (α1 und α2) auf intestinalen epithelialen Zellen bei Colitis Ulcerosa, Kolonkarzinomen und zur Kontrolle bei nicht erkrankten intestinalen Zellen. Sie konnten beweisen, dass IL-13Rα1 und α2 auf Zellen bei Patienten mit Colitis Ulcerosa und Kolonkarzinomen signifikant höher exprimiert werden als auf Zellen von gesunden oder an Morbus Crohn erkrankten Patienten. Um die Aktivierung der signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) und der mitogen activated protein kinase (MAPK) Signaltransduktionswege zu untersuchen, wurden isolierte epitheliale intestinale Zellen und mehrere Zelllinien, die verschiedene Verhältnisse von IL-13Rα1 und α2 exprimierten, *in vitro* mit IL-13 stimuliert. Trotz der sehr ähnlichen erhöhten Rezeptorexpression bei Colitis Ulcerosa und bei Kolonkarzinomen aktivierte IL-13 bei mit Colitis Ulcerosa befallenen Zellen nicht die Signaltransduktionswege von STAT6 oder MAPK, während bei entsprechender Stimulierung der Kolonkarzinomzellen der STAT6 Signalweg aktiviert wurde. Unter Benutzung von neutralisierenden Antikörpern und Zelllinien, die eine weite Bandbreite der Dichte an Oberflächenexpression von IL-13Rα1 und α2 aufwiesen, konnten die Autoren demonstrieren, dass IL-13Rα2 eine ambivalente Rolle besitzt. Zum Einen als Initiator des MAPK Signalweges bei niedrigen Konzentrationen und zum Anderen als Inhibitor oder Köder-Rezeptor bei hohen IL-13Rα2/IL-13Rα1 Expressionsverhältnissen. Demzufolge scheint IL-13Rα2 beides zu sein. Ein Köder-Rezeptor, dem sich ein blind endender Signalweg anschließt, und ein

Induktor des MAPK Signaltransduktionsweges, abhängig von der relativen Expression der IL-13 Rezeptoren und der lokalen Konzentration von IL-13. Diese beiden Mechanismen modulieren zusammen die Balance und Ausprägung der bei Colitis Ulcerosa und Kolonkarzinomen initiierten Signaltransduktionswege [Mandal et al. 2010].

Kanai et al. untersuchten die Rolle von IL-4 und IL-13 bezüglich der Zell-Zell Adhäsion in der humanen Kolonkarzinomzellreihe Colo205 [Kanai et al. 2000]. IL-4R wurde auf den Zelloberflächen der Colo205 Reihe durchgängig exprimiert und rekombinantes IL-4 konnte die Zell-Zell Adhäsion der Colo205 Zellen nachweislich unterdrücken, ohne jedoch die Zellproliferation zu beeinflussen. Eine Durchflusszytometrieanalyse ergab, dass gegen E-Cadherin und CEA gerichtete monoklonale Antikörper die Zell-Zell Adhäsion der Colo205 Reihe inhibieren und eine Inkubation mit IL-4 zudem zu einer signifikanten Inhibition der Expression von E-Cadherin und CEA führt. Ähnliches wurde bei IL-13 beobachtet, welches auch zu einer Inhibition der Zell-Zell Adhäsion in der Colo205 Reihe führt. Diese Ergebnisse implizieren, dass IL-4 und IL-13 die Zell-Zell Adhäsion der Kolontumorzellen, via Verminderung der Expression von E-Cadherin und CEA, beeinflussen. Des Weiteren untersuchten die oben genannten Autoren die Expression von IL-4 und IL-13 auf isolierten, die Kolontumorzellen infiltrierenden Lymphozyten (TIL). Diese exprimierten IL-4, IL-13 mRNA und IL-13 durchgängig. Es zeigte sich auch hier, dass von den TIL lokal produziertes IL-4 und IL-13 die Adhäsionsfähigkeit der Kolonkarzinomzellen durch Steuerung von Adhäsionsmolekülen beeinflusst. Diese Ergebnisse unterstreichen die wichtige Rolle von IL-4 und IL-13 beim Verständnis des Tumormikromillieus und bei der Adhäsion von Karzinomzellen.

Von einem klinischen Gesichtspunkt aus untersuchten Barth et al. anhand von Immunhistochemien die Expression von IL-4 durch TIL in 49 primären Kolonkarzinomen und 20 Metastasen. Diese Studie demonstrierte, dass die Patienten mit primären Kolonkarzinomen, welche eine positive IL-4 Expression bei über 20% ihrer TIL aufwiesen, von einem signifikant höherem Gesamtüberleben profitierten als Vergleichsgruppen, in denen die TIL kein IL-4 exprimierten (5-JÜR: 87% vs. 50%, p=0,01) [Barth et al. 1996]. Barth et al. konnten, wie oben beschrieben, eine Korrelation von hoher IL-4 Expression und gesteigertem Gesamtüberleben nachweisen. In der vorliegenden Untersuchung bestätigte sich

dies in Bezug auf das gesamte Überleben nicht, jedoch konnten wir einen Zusammenhang von hoher IL-4 Expression in kolorektalen Karzinomen und einer niedrigeren Lymphknotenmetastasenrate herstellen, was ebenso als prognostisch günstig zu werten ist. Aufgrund der großen methodischen Unterschiede der Studien lassen sich die Ergebnisse jedoch nicht sinnvoll vergleichen.

Park und seine Mitarbeiter untersuchten die spezifische anti-Tumor Immunüberwachung bei Mäusen mit Lungenmetastasen, einer Kolonkarzinomreihe, indem sie die negativen Regulationsmechanismen von IL-13 bei den Mäusen unterdrückten. Die Lungenmetastasen wurden durch die Behandlung der Mäuse mit einem IL-13 Inhibitor signifikant vermindert, dies konnte aber analog bei IL-4 durch dessen Depletion oder dessen Inhibition nicht nachgewiesen werden. Folglich existiert bei dieser Kolonkarzinomreihe eine Immunüberwachung, die anscheinend negativ durch IL-13 reguliert wird. Somit resultierte eine hohe Expression von IL-13 in einer Zunahme der pulmonalen Metastasierung [Park et al. 2005]. Im Widerspruch dazu konnte in unserer Studie bei den Patienten mit kolorektalen Karzinomen eine Verlängerung der Überlebenszeit bei hoher IL-13 Expression festgestellt werden, was sich prinzipiell nicht mit einer gesteigerten Lymphknotenmetastasenrate vereinbaren lässt. Analog führte in der vorliegenden Studie eine erhöhte Expression von IL-4R, welcher unter bestimmten Umständen auch von IL-13 benutzt werden kann, zu einer niedrigen Lymphknotenmetastasenrate, was sich ebenso nicht mit Parks Ergebnissen deckt.

Rodolfo und seine Mitarbeiter untersuchten Mäuse, welche pulmonale Metastasen von Kolonkarzinomzellen besaßen. Sie fanden heraus, dass eine Beimpfung mit veränderten, zur IL-4 Produktion angeregten, Kolonkarzinomzellen dazu führte, dass 30% dieser Mäuse von ihren pulmonalen Metastasen kuriert wurden. Unter anderem konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Tumorabwehr, die bis dato hauptsächlich den Th-1 Zellen zugeschrieben wurde, teilweise auch über die Th-2 vermittelte Zellantwort reguliert wird [Rodolfo et al. 1999].

Leider ist bisher wenig bekannt über die Rolle von IL-4 und IL13 bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen und sehr wenig über die Rolle bei Patienten mit Magenkarzinomen.

Eine der wenigen Studien zu Magenkarzinomen stammt von Morisaki und demonstriert mittels eines Zellproliferationtests eine dosisabhängige

Wachstumsinhibierung von Magenkarzinomzelllinien durch IL-4. Die durch IL-4 modulierte Wachstumsinhibierung konnte durch den Einsatz eines spezifischen IL-4 Antikörpers aufgehoben werden. Außerdem konnte eine positive Korrelation zwischen der IL-4 vermittelten Wachstumsinhibierung und der IL-4R Expression hergestellt werden. Daraus lässt sich schließen, dass IL-4 zu einer signifikanten Inhibition des Wachstums von Magenkarzinomzelllinien in Abhängigkeit von der IL-4R Expression führt [Morisaki et al. 1992]. Diese Ergebnisse bestätigen sich teilweise in der hier vorliegenden Studie, in welcher die Patienten mit einer hohen Expression von IL-4R von einer signifikant längeren rezidivfreien Überlebenszeit profitierten. Allerdings bleibt eine Bestätigung des nun zu vermutenden Zusammenhangs von hoher IL-4 Expression und niedrigerem Tumorstadium bei Magenkarzinomen aus. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass Morisakis Experiment *in vitro* durchgeführt wurde und *in vivo* möglicherweise komplexere Regulationsmechanismen eine Rolle spielen.

Unsere Arbeitsgruppe untersuchte in früheren Studien unter anderem die Rolle von IL-4 und IL-13 in Pankreaskarzinomen. Die Expression von IL-4 in Pankreaskarzinomzelllinien *in vitro* wurde analysiert und es konnte nachgewiesen werden, dass IL-4 zum Einen von Pankreaskarzinomzellen selbst produziert wird und dass es zum Anderen auf diese selbst als autokriner Wachstumsfaktor wirken kann.

In Kombination mit der Beobachtung, dass neutralisierende IL-4 Antikörper das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen inhibieren können, implizieren diese Ergebnisse, dass IL-4 bei Pankreaskarzinomen als autokriner Wachstumsfaktor agiert. Außerdem unterdrückt von Tumorzellen produziertes IL-4 möglicherweise die anti-Tumor gerichtete Immunabwehr *in vivo,* wodurch das Wachstum von Pankreaskarzinomen und deren Metastasierung ermöglicht und befördert wird [Prokopchuk et al. 2005]. In einer weiteren Studie unserer Arbeitsgruppe zeigte sich, dass auch IL-13 von Pankreaskarzinomzellen exprimiert wird und deren Wachstum befördert, und dass eine Neutralisation von IL-13 durch Antikörper *in vitro* zu einer Inhibition dieses Wachstums führt. Des Weiteren wurde in einer Immunhistochemieanalyse von resezierten primär duktalen Adenokarzinomen des Pankreas aufgedeckt, dass eine hohe Koexpression von IL-13 und IL-4R zu einer signifikant höheren Rate an Lymphknotenmetastasen führt (94% (hoch) vs. 56% (niedrig)). Daraus wurde geschlussfolgert, dass auch IL-13 als autokriner

Wachstumsfaktor in Pankreaskarzinomen fungiert und dass eine hohe endogene Expression von IL-13, in Verbindung mit einer hohen Expression von IL-4R, in diesen Karzinomzellen die Lymphknotenmetastasierung durch eine Modulation der Interaktionen zwischen Tumor- und Immunzellen befördert [Formentini et al. 2009]. Es wurde versucht, diesen Zusammenhang auch in der vorliegenden Untersuchung herzustellen, was jedoch bei kolorektalen oder Magenkarzinomen nicht nachvollzogen werden konnte (Daten werden nicht gezeigt).

Obwohl Pankreas-, kolorektale- und Magenkarzinome nicht miteinander verglichen werden können, wäre dennoch zu erwarten, dass die von den Karzinomen exprimierten Zytokine zu ähnlichen immunologischen Reaktionen bei den Patienten führen. Warum nun eine hohe Expression der Interleukine und ihrer Rezeptoren beim Pankreaskarzinom zu einer prognostisch ungünstigen Situation und beim kolorektalen- bzw. Magenkarzinom zu einer prognostisch günstigen Beeinflussung führt, bleibt unklar.

Die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Studie basieren auf der Korrelation von hoher IL-13 Expression mit einem gesteigerten Gesamtüberleben und auf der Korrelation von einer hohen IL-4, IL-4R und IL-13R Expression mit einer niedrigeren Lymphknotenmetastasenrate bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen. Zusätzlich zeigte sich bei Patienten mit Magenkarzinomen eine Assoziation von hoher IL-4R Expression und einer gesteigerten rezidivfreien Überlebensrate. Die Ergebnisse dieser Studie fügen sich somit nicht mit allen vorausgegangenen Studien in ein konsistentes Modell ein. Die meisten Resultate der verschiedenen, oben genannten, Studien sind aber letztendlich nicht eins zu eins vergleichbar, da deren Ergebnisse teilweise auf unterschiedlichen Tumor- und Tiermodellen beruhen, und es nachgewiesenermaßen tumor- und speziesspezifische Unterschiede bei der Wirkungsweise der beschriebenen Interleukine gibt. Zusätzlich wurden zum großen Teil unterschiedliche Zielgrößen in den Studien untersucht. Sicherlich sind die Studien auch wegen der zum Teil großen methodischen Unterschiede nicht unmittelbar vergleichbar, wurden aber aus Mangel an geeigneten vergleichbaren Evidenzen trotzdem genannt. Jedoch gibt es viele Evidenzen, welche die Relevanz der untersuchten Interleukine und ihrer Rezeptoren im Forschungsfeld der Tumorimmunologie unterstreichen.

Aktuell erscheint es nicht möglich, ein in sich stimmiges Modell zu erschaffen, das die Unstimmigkeiten in der heutigen Datenlage erklären kann.

Entsprechend dem überwiegendem Teil der Publikationen über IL-4 und IL-13, könnte man davon ausgehen, dass Patienten mit Tumoren hoher IL-4, IL-13, IL-4R und IL-13R Expression eine schlechtere Prognose und/oder eine höhere Lymphknotenmetastasenrate aufweisen als Patienten mit einer niedrigen Expression der oben genannten Zytokine und ihrer entsprechenden Rezeptoren. Dies vermutete auch unsere Arbeitsgruppe zu Beginn dieser Untersuchung, entsprechend unseren Erfahrungen bei Pankreaskarzinomen. Überraschenderweise konnten wir feststellen, dass alle gefundenen signifikanten Korrelationen bei Patienten mit einer hohen Expression der Interleukine oder ihrer Rezeptoren sich als prognostisch günstig erwiesen.

Bei der genaueren Literaturrecherche konnten einige Studien (s.o.) ausfindig gemacht werden, die unsere Ergebnisse teilweise bestätigen. Es muss jedoch festgehalten werden, dass diese aufgrund der zum Teil gravierenden methodischen Unterschiede nur bedingt mit der vorliegenden Studie zu vergleichen sind. Trotzdem unterstreichen sie, dass es auch Evidenzen für eine prognostisch günstige Beeinflussung durch die Expression der untersuchten Interleukine und ihrer Rezeptoren gibt. Dennoch widersprechen mehrere Evidenzen den vorliegenden Ergebnissen stark. Die Datenlage hierzu bleibt also kontrovers. Sicherlich stellt sich die Rolle von IL-4 und IL-13 in der Tumorimmunologie als sehr komplex dar und ist möglicherweise abhängig von der Art des Tumors und von der genetischen Ausstattung des Patienten. Erklärungsversuche für diese Diskrepanzen könnten möglicherweise auch genauere Untersuchungen bezüglich des Interleukin/Interleukinrezeptor-Verhältnisses der untersuchten Interleukine bei gastrointestinalen Karzinomen liefern.

Aufgrund der heterogenen Literatur werden ergänzende prospektive Studien benötigt, um die Rolle von IL-4, IL-13, IL-4R und IL-13R im Feld der Tumorimmunologie bei gastrointestinalen Karzinomen zu untersuchen und die bestehenden Widersprüche zu klären.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war zum Einen, eine reproduzierbare Methodik für eine Immunhistochemie von Interleukin (IL-) 4, IL-13, IL-4R und IL-13R bei kolorektalen und Magenkarzinomen zu etablieren. Zum Anderen wurde versucht, eine Korrelation der Expression dieser Interleukine und ihrer Rezeptoren mit prognostischen Parametern wie der gesamten Überlebenszeit, der rezidivfreien Überlebenszeit, dem Tumorstadium (T), dem Lymphknotenstatus (N), dem Fernmetastasenstatus (M) und dem Grading (G) herzustellen.

Nach unserem Wissen ist dies die erste Arbeit, die sich diesem Thema widmet.

Insgesamt wurden 454 Patienten, davon 95 mit Magenkarzinomen und 359 mit kolorektalen Karzinomen, in die Untersuchung einbezogen. Von den vorliegenden Karzinompräparaten wurde eine Immunhistochemie für jeweils IL-4, IL-13, IL-4R und IL-13R durchgeführt. Anschließend wurden die gefärbten Schnitte unter dem Mikroskop begutachtet und einer Intensität zugewiesen (positiv=hoch vs. negativ=niedrig). Bei der Immunhistochemie zeigte sich bei den kolorektalen- und Magenkarzinomen für alle Antikörper eine positive Färbeintensität mit einer Bandbreite von 29% - 61%. Das heißt kolorektale- und Magenkarzinome exprimieren IL-4, IL-13, IL-4R und IL-13R.

Im Anschluss wurden die in den Karzinomgeweben gefundenen Intensitäten mit klinischen Daten korreliert, um die prognostische Wertigkeit der jeweiligen Expressionsmuster bestimmen zu können. Hierzu wurden die gesamte Überlebenszeit und die krankheitsfreie Überlebenszeit der Patienten, die eine positive Expression der Interleukine oder ihrer Rezeptoren in ihren Karzinomen aufwiesen, gegenüber denen, die eine negative Expression in ihren Karzinomen aufzeigten, nach Kaplan-Meier gezeichnet und mit dem Log-rank-Test verglichen. Hierbei zeigte sich bei den kolorektalen Karzinomen, dass eine positive IL-13 Expression mit einem längeren Gesamtüberleben einhergeht ($p=0,0414$). Bei den Magenkarzinomen konnte ein Zusammenhang von positiver IL-4R Expression mit einer gesteigerten rezidivfreien Überlebensrate hergestellt werden ($p=0,0355$). Im nächsten Schritt wurden weitere klinische Parameter der Patienten mit kolorektalen und Magenkarzinomen wie Tumorstadium (T), Lymphknotenstatus (N), Fernmetastasenstatus (M), Grading (G) und Rezidivhäufigkeit, in Korrelation zu der Expression der Interleukine und ihrer Rezeptoren in Vier-Felder-Tafeln

verglichen und mit dem Chi-Square-Test ausgewertet. Dabei zeigte sich bei den kolorektalen Karzinomen ein Zusammenhang hoher IL-4, IL-4R und IL13R Expression und einer geringeren Rate an Lymphknotenmetastasen (p=0,0034, p=0,0001 und p=0,0001). Beim Grading konnte bei den kolorektalen Karzinomen eine Korrelation von positiver IL-13R Expression und einer häufigen Einstufung als G_1- und G_2- klassifizierter Tumor nachgewiesen werden (p=0,0286).

Bei den Magenkarzinomen zeigte sich lediglich beim Grading ein signifikanter Zusammenhang. Hier ließ sich bei den als G_1- und G_2- klassifizierten Karzinomen eine signifikant häufigere positive Expression von IL-13 nachweisen (p=0,0456). Die Analyse von weiteren klinischen und in der Immunhistochemie erhobenen Parametern konnte keine signifikanten Zusammenhänge feststellen.

Trotz der Tatsache, dass sich die Ergebnisse dieser Arbeit mit der gesichteten Literatur nicht durchgängig in ein konsistentes Gedankenmodell einfügen, unterstreichen die Resultate dieser Studie die Relevanz der untersuchten Interleukine und ihrer Rezeptoren bezüglich Prognose und Lymphknotenmetastasenrate bei kolorektalen und Magenkarzinomen.

Es ist festzuhalten, dass die Interleukine 4 und 13 und deren Rezeptoren eine wichtige Rolle im Forschungsfeld der Tumorimmunologie bei gastrointestinalen Tumoren spielen und Gegenstand weiterer prospektiver Studien sein sollten. So könnten in Zukunft Patienten mit hohem Risiko für Lymphknotenmetastasen oder für ein gemindertes Überleben identifiziert werden und bestehende oder etwaige zukünftige Therapien darauf angepasst werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Akiho H, Lovato P, Deng Y, Ceponis PJ, Blennerhassett P, Collins SM: Interleukin-4- and -13-induced hypercontractility of human intestinal muscle cells-implication for motility changes in Crohn's disease. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 288: 609-615 (2005)

2. Aman MJ, Tayebi N, Obiri NI, Puri RK, Modi WS, Leonard WJ: cDNA cloning and characterization of the human interleukin 13 receptor alpha chain. J Biol Chem 271: 29265–29270 (1996)

3. Andersson E, Schain F, Sjöberg J, Björkholm M, Claesson HE: Interleukin-13 stimulation of the mediastinal B-cell lymphoma cell line Karpas-1106P induces a phenotype resembling the Hodgkin lymphoma cell line L1236. Exp Hematol 38: 116–123 (2010)

4. Aspord C, Pedroza-Gonzalez A, Gallegos M, Tindle S, Burton EC, Su D, Marches F, Banchereau J, Palucka AK: Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. J Exp Med 204: 1037–1047 (2007)

5. Barth RJ, Camp BJ, Martuscello TA, Dain BJ, Memoli VA: The cytokine microenvironment of human colon carcinoma. Lymphocyte expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-4 predicts improved survival. Cancer 78: 1168–1178 (1996)

6. Benczik M, Gaffen SL: The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes. Immunol Invest 33: 109–142 (2004)

7. Berry A, Balard P, Coste A, Olagnier D, Lagane C, Authier H, Benoit Vical F, Lepert JC, Séguéla JP, Magnaval JF, Chambon P, Metzger D, Desvergne B, Wahli W, Auwerx J, Pipy B: IL-13 induces expression of CD36 in human monocytes through PPARgamma activation. Eur J Immunol 37: 1642–1652 (2007)

8. Beseth BD, Cameron RB, Leland P, You L, Varricchio F, Kreitman RJ, Maki RA, Jablons DM, Husain SR, Puri RK: Interleukin-4 receptor cytotoxin as therapy for human malignant pleural mesothelioma xenografts. Ann Thorac Surg 78: 436-443 (2004)

9. Blease K: Therapeutics targeting IL-13 for the treatment of pulmonary inflammation and airway remodeling. Curr Opin Investig Drugs 9: 1180–1184 (2008)

10. Brenner H, Rothenbacher D, Arndt V: Epidemiology of stomach cancer. Methods Mol Biol 472: 467–477 (2009)

11. Chang TL, Peng X, Fu XY: Interleukin-4 mediates cell growth inhibition through activation of Stat1. J Biol Chem 275: 10212–10217 (2000)

12. Chapoval SP, Al-Garawi A , Lora JM, Strickland I, Ma B, Lee PJ, Homer RJ, Ghosh S, Coyle AJ, Elias JA: Inhibition of NF-kappaB activation reduces the tissue effects of transgenic IL-13. J Immunol 179: 7030–7041 (2007)

13. Chi X, Tai HH: Interleukin-4 UP-regulates 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) in human lung cancer cells. Exp Cell Res 316: 2251–2259 (2010)

14. Chomarat P, Banchereau J: Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. Int Rev Immunol 17: 1–52 (1998)

15. DeFrance T, Fluckiger AC, Rossi JF, Magaud JP, Sotto JJ, Banchereau J: Antiproliferative effects of interleukin-4 on freshly isolated non-Hodgkin malignant B-lymphoma cells. Blood 79: 990–996 (1992)

16. Eguchi J, Kuwashima N, Hatano M, Nishimura F, Dusak JE, Storkus WJ, Okada H: IL-4-transfected tumor cell vaccines activate tumor-infiltrating dendritic cells and promote type-1 immunity. J Immunol 174: 7194–7201 (2005)

17. Elwakkad AS, Said RN, Muhammad SI, Saleh MT, Elhamshary A: Role for leptin and prolactin in human juvenile rheumatic diseases. Pak J Biol Sci 10: 1984–1989 (2007)

18. Estes ML, Iwasaki K, Jacobs BS, Barna BP: Interleukin-4 down-regulates adult human astrocyte DNA synthesis and proliferation. Am J Pathol 143: 337–341 (1993)

19. Formentini A, Sander S, Denzer S, Straeter J, Henne-Bruns D, Kornmann M: Thymidylate synthase expression in resectable and unresectable pancreatic cancer: role as predictive or prognostic marker? Int J Colorectal Dis 22: 49–55 (2007)

20. Formentini A, Prokopchuk O, Sträter J, Kleeff J, Grochola LF, Leder G, Henne-Bruns D, Korc M, Kornmann M: Interleukin-13 exerts autocrine growth-promoting effects on human pancreatic cancer, and its expression correlates with a propensity for lymph node metastases. Int J Colorectal Dis 24: 57–67 (2009)

21. Golumbek PT, Lazenby AJ, Levitsky HI, Jaffee LM, Karasuyama H, Baker M, Pardoll DM: Treatment of established renal cancer by tumor cells engineered to secrete interleukin-4. Science 254: 713–716 (1991)

22. Gröne A: Keratinocytes and cytokines. Vet Immunol Immunopathol 88: 1–12 (2002)

23. Hershey GK: IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. J Allergy Clin Immunol 111: 677–690 (2003)

24. Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A, Bertz J, Haberland J, Kraywinkel K, Wolf U: Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.). Berlin, S. 32–40 (2010)

25. Jiang H, Harris MB, Rothman P: IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT. J Allergy Clin Immunol 105: 1063–1070 (2000)

26. Joshi BH, Leland P, Calvo A, Green JE, Puri RK: Human adrenomedullin up-regulates interleukin-13 receptor alpha2 chain in prostate cancer in vitro and in vivo: a novel approach to sensitize prostate cancer to anticancer therapy. Cancer Res 68: 9311–9317 (2008)

27. Kanai T, Watanabe M, Hayashi A, Nakazawa A, Yajima T, Okazawa A, Yamazaki M, Ishii H, Hibi T: Regulatory effect of interleukin-4 and interleukin-13 on colon cancer cell adhesion. Br J Cancer 82: 1717–1723 (2000)

28. Kaplan EL, Meier P: Nonparametric estimation from incomplete observations. J Am Stat Assoc 53: 457–481 (1958)

29. Kawakami K, Takeshita F, Puri RK: Identification of distinct roles for a dileucine and a tyrosine internalization motif in the interleukin (IL)-13 binding component IL-13 receptor alpha 2 chain. J Biol Chem 276: 25114–25120 (2001)

30. Kawakami K, Kawakami M, Husain SR, Puri RK: Targeting interleukin-4 receptors for effective pancreatic cancer therapy. Cancer Res 62: 3575–3580 (2002)

31. Kawakami M, Kawakami K, Kasperbauer JL, Hinkley LL, Tsukuda M, Strome SE, Puri RK: Interleukin-13 receptor alpha2 chain in human head and neck cancer serves as a unique diagnostic marker. Clin Cancer Res 9: 6381–6388 (2003)

32. Kawakami K, Kawakami M, Puri RK: Specifically targeted killing of interleukin-13 (IL-13) receptor-expressing breast cancer by IL-13 fusion cytotoxin in animal model of human disease. Mol Cancer Ther 3: 137–147 (2004)

33. Kawakami K, Kawakami M, Liu Q, Puri RK: Combined effects of radiation and interleukin-13 receptor-targeted cytotoxin on glioblastoma cell lines. Int J Radiat Oncol Biol Phys 63: 230–237 (2005)

34. Keegan A, Nelms K, Paul WE: The IL-4 receptor-signaling mechanisms. Adv Exp Med Biol 365: 211–215 (1994)

35. Kelly-Welch A, Hanson EM, Keegan AD: Interleukin-13 (IL-13) pathway. Sci STKE 293: 115–121 (2005)

36. Klampfer L: Cytokines, Inflammation and Colon Cancer. Curr Cancer Drug Targets 11: 451–464 (2011)

37. Knörr C, Amrehn C, Seeberger H, Rosenwald A, Stilgenbauer S, Ott G, Müller Hermelink HK, Greiner A: Expression of costimulatory molecules in low-grade mucosa-associated lymphoid tissue-type lymphomas in vivo. Am J Pathol 155: 2019–2027 (1999)

38. Lama VN, Harada H, Badri LN, Flint A, Hogaboam CM, McKenzie A, Martinez FJ, Toews GB, Moore BB, Pinsky DJ: Obligatory role for interleukin-13 in obstructive lesion development in airway allografts. Am J Pathol 169: 47–60 (2006)

39. Lebel-Binay S, Laguerre B, Quintin-Colonna F, Conjeaud H, Magazin M, Miloux B, Pecceu F, Caput D, Ferrara P, Fradelizi D: Experimental gene therapy of cancer using tumor cells engineered to secrete interleukin-13. Eur J Immunol 25: 2340–2348 (1995)

40. Leitenberg D, Burg DL, Feldbush TL: Lymphokine-induction of memory B-cell differentiation: differential stimulation of large virgin and memory B-cell differentiation. Cell Immunol 114: 83–95 (1988)

41. Lin SJ, Chang C, Ng AK, Wang SH, Li JJ, Hu CP: Prevention of TGF-beta-induced apoptosis by interlukin-4 through Akt activation and p70S6K survival signaling pathways. Apoptosis 12: 1659–1670 (2007)

42. Ma HL, Whitters MJ, Jacobson BA, Donaldson DD, Collins M, Dunussi-Joannopoulos K: Tumor cells secreting IL-13 but not IL-13Ralpha2 fusion protein have reduced tumorigenicity in vivo. Int Immunol 16: 1009–1017 (2004)

43. Mandal D, Levine AD: Elevated IL-13Ralpha2 in intestinal epithelial cells from ulcerative colitis or colorectal cancer initiates MAPK pathway. Inflamm Bowel Dis 16: 753–764 (2010)

44. Mandruzzato S, Callegaro A, Turcatel G, Francescato S, Montesco MC, Chiarion-Sileni V, Mocellin S, Rossi CR, Bicciato S, Wang E, Marincola FM, Zanovello, P: A gene expression signature associated with survival in metastatic melanoma. J Transl Med 4: 50–61 (2006)

45. Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, Labit C, Leplatois P, Liauzun P, Miloux B: Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. Nature 362: 248–250 (1993)

46. Morisaki T, Yuzuki DH, Lin RT, Foshag LJ, Morton DL, Hoon DS: Interleukin 4 receptor expression and growth inhibition of gastric carcinoma cells by interleukin 4. Cancer Res 52: 6059–6065 (1992)

47. Mosmann TR, Yokota T, Kastelein R, Zurawski SM, Arai N, Takebe Y: Species-specificity of T cell stimulating activities of IL 2 and BSF-1 (IL 4): comparison of normal and recombinant, mouse and human IL 2 and BSF-1 (IL 4). J Immunol 138: 1813–1816 (1987)

48. Mueller TD, Zhang JL, Sebald W, Duschl A: Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system. Biochim Biophys Acta 1592: 237–250 (2002)

49. Müller-Ladner U, Judex M, Ballhorn W, Kullmann F, Distler O, Schlottmann K, Gay R E, Schölmerich J, Gay S: Activation of the IL-4 STAT pathway in rheumatoid synovium. J Immunol 164: 3894–3901 (2000)

50. Murata T, Noguchi PD, Puri RK: IL-13 induces phosphorylation and activation of JAK2 Janus kinase in human colon carcinoma cell lines: similarities between IL-4 and IL-13 signaling. J Immunol 156: 2972–2978 (1996)

51. Myers JN, Yasumura S, Suminami Y, Hirabayashi H, Lin Wc, Johnson JT, Lotze MT, Whiteside TL: Growth stimulation of human head and neck squamous cell carcinoma cell lines by interleukin 4. Clin Cancer Res 2: 127–135 (1996)

52. Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE: The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. Annu Rev Immunol 17: 701–738 (1999)

53. Newcom SR, Ansari AA, Gu L: Interleukin-4 is an autocrine growth factor secreted by the L-428 Reed-Sternberg cell. Blood 79: 191–197 (1992)

54. Nishimura Y, Nitto T, Inoue T, Node K: IL-13 attenuates vascular tube formation via JAK2-STAT6 pathway. Circ J 72: 469–475 (2008)

55. Noffz G, Qin Z, Kopf M, Blankenstein T: Neutrophils but not eosinophils are involved in growth suppression of IL-4-secreting tumors. J Immunol 160: 345–350 (1998)

56. Obiri NI, Puri RK: Characterization of interleukin-4 receptors expressed on human renal cell carcinoma cells. Oncol Res 6: 419–427 (1994a)

57. Obiri NI, Siegel JP, Varricchio F, Puri RK: Expression of high-affinity IL-4 receptors on human melanoma, ovarian and breast carcinoma cells. Clin Exp Immunol 95: 148–155 (1994b)

58. Obiri NI, Husain SR, Debinski W, Puri RK: Interleukin 13 inhibits growth of human renal cell carcinoma cells independently of the p140 interleukin 4 receptor chain. Clin Cancer Res 2: 1743–1749 (1996)

59. Oettgen HC, Geha RS: IgE regulation and roles in asthma pathogenesis. J Allergy Clin Immunol 107: 429–440 (2001)

60. Onishi T, Ohishi Y, Imagawa K, Ohmoto Y, Murata K: An assessment of the immunological environment based on intratumoral cytokine production in renal cell carcinoma. BJU Int 83: 488–492 (1999)

61. Park JM, Terabe M, van den Broeke LT, Donaldson DD, Berzofsky JA: Unmasking immunosurveillance against a syngeneic colon cancer by elimination of CD4+ NKT regulatory cells and IL-13. Int J Cancer 114: 80–87 (2005)

62. Paul WE: Interleukin-4: A prototypic immunoregulatory lymphokine. Blood 77: 1859–1870 (1991)

63. Pericle F, Giovarelli M, Colombo MP, Ferrari G, Musiani P, Modesti A, Cavallo F, Di Pierro F, Novelli F, Forni G: An efficient Th2-type memory follows CD8+ lymphocyte-driven and eosinophil-mediated rejection of a spontaneous mouse mammary adenocarcinoma engineered to release IL-4. J Immunol 153: 5659–5673 (1994)

64. Prokopchuk O, Liu Y, Henne-Bruns D, Kornmann M: Interleukin-4 enhances proliferation of human pancreatic cancer cells: evidence for autocrine and paracrine actions. Br J Cancer 92: 921–928 (2005)

65. Puri RK, Siegel, JP: Interleukin-4 and cancer therapy. Cancer Invest 11: 473–486 (1993)

66. Redfield C, Smith LJ, Boyd J, Lawrence GM, Edwards RG, Smith RA, Dobson CM: Secondary structure and topology of human interleukin 4 in solution. Biochemistry 30: 11029–11035 (1991)

67. Renard N, Duvert V, Banchereau J, Saeland S: Interleukin-13 inhibits the proliferation of normal and leukemic human B-cell precursors. Blood 84, 2253-2260 (1994)

68. Rodolfo M, Zilocchi C, Accornero P, Cappetti B, Arioli I, Colombo MP: IL-4-transduced tumor cell vaccine induces immunoregulatory type 2 CD8 T lymphocytes that cure lung metastases upon adoptive transfer. J Immunol 163: 1923–1928 (1999)

69. Rosenberg HF, Phipps S, Foster PS: Eosinophil trafficking in allergy and asthma. J Allergy Clin Immunol 119: 1303–1310 (2007)

70. Ruf G, Hopt U, Otto F, Deschler B, Werner M, Barke A, Langer M, Schäfer O, Moser E, Brink I, Hens H: Kolorektales Karzinom. Empfehlungen zur standardisierten Diagnostik, Therapie und Nachsorge. In: Tumorzentrum Freiburg (Hrsg), 4. Aufl, S. 1-35 (2005)

71. Ryan JJ, Kashyap M, Bailey D, Kennedy S, Speiran K, Brenzovich J, Barnstein B, Oskeritzian C, Gomez G: Mast cell homeostasis: a fundamental aspect of allergic disease. Crit Rev Immunol 27: 15–32 (2007)

72. Seki YI, Hayashi K, Matsumoto A, Seki N, Tsukada J, Ransom J, Naka T, Kishimoto T, Yoshimura A, Kubo M: Expression of the suppressor of cytokine signaling-5 (SOCS5) negatively regulates IL-4-dependent STAT6 activation and Th2 differentiation. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 99: 13003–13008 (2002)

73. Shimamura T, Fujisawa T, Husain SR, Joshi B, Puri RK: Interleukin 13 mediates signal transduction through interleukin 13 receptor alpha2 in pancreatic ductal adenocarcinoma: role of IL-13 Pseudomonas exotoxin in pancreatic cancer therapy. Clin Cancer Res 16: 577–586 (2010)

74. Shurin MR, Lu L, Kalinski P, Stewart-Akers AM, Lotze MT: Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy. Springer Semin Immunopathol 21: 339–359 (1999)

75. Skinnider BF, Elia AJ, Gascoyne RD, Trümper LH, Bonin F von, Kapp U, Patterson B, Snow BE, Mak TW: Interleukin 13 and interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. Blood 97: 250–255 (2001)

76. Stein NC, Kreutzmann C, Zimmermann SP, Niebergall U, Hellmeyer L, Goettsch C, Schoppet M, Hofbauer LC: Interleukin-4 and interleukin-13 stimulate the osteoclast inhibitor osteoprotegerin by human endothelial cells through the STAT6 pathway. J Bone Miner Res 23: 750–758 (2008)

77. Tamburini J, Grimaldi D, Chiche JD, Bricaire F, Bossi P: Cytokine pattern in Kaposi's sarcoma associated with immune restoration disease in HIV and tuberculosis co-infected patients. AIDS 21: 1980–1983 (2007)

78. Tangye SG, Raison RL: Human cytokines suppress apoptosis of leukaemic CD5+ B cells and preserve expression of bcl-2. Immunol Cell Biol 75: 127–135 (1997)

79. Terabe M, Matsui S, Noben-Trauth N, Chen H, Watson C, Donaldson DD, Carbone DP, Paul WE, Berzofsky JA: NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. Nat Immunol 1: 515–520 (2000)

80. Terabe M, Matsui S, Park JM, Mamura M, Noben-Trauth N, Donaldson DD, Chen W, Wahl SM, Ledbetter S, Pratt B, Letterio JJ, Paul WE, Berzofsky JA: TGFb production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block CTL-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. J Exp Med 198: 1741–1752 (2003)

81. Terabe M, Park JM, Berzofsky JA: Role of IL-13 in regulation of anti-tumor immunity and tumor growth. Cancer Immunol Immunother 53: 79–85 (2004)

82. Tsarbopoulos A, Varnerin J, Cannon-Carlson S, Wylie D, Pramanik B, Tang J, Nagabhushan TL: Mass spectrometric mapping of disulfide bonds in recombinant human interleukin-13. J Mass Spectrom 35: 446–453 (2000)

83. Vadiveloo PK, Stanton HR, Cochran FW, Hamilton JA: Interleukin-4 inhibits human smooth muscle cell proliferation. Artery 21: 161–181 (1994)

84. Wittekind Ch, Meyer HJ, Bootz F: TNM. Klassifikation maligner Tumoren. 7. Auflage, Springer, Berlin Heidelberg New York, S. 61–104 (2010)

85. Wynn TA: IL-13 effector functions. Annu Rev Immunol 21: 425–456 (2003)

86. Yokota T, Otsuka T, Mosmann T, Banchereau J, DeFrance T, Blanchard D, de Vries JE, Lee F, Arai K: Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1, that expresses B-cell- and T-cell-stimulating activities. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 83: 5894–5898 (1986)

87. Zurawski G, de Vries JE: Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. Immunol Today 15: 19–26 (1994)

Anhang

Anhang 1: TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms nach UICC 2010 [Wittekind et al. 2010]

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1 **N1a** **N1b** **N1c**	Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten Metastasen in 1 regionären Lymphknoten Metastasen in 2-3 regionären Lymphknoten Tumorabsiedelung, z.B. in Satelliten*, in der Subserosa, oder im nicht-pritonealisierten parakolischen oder pararektalem Weichteilgewebe *ohne* regionäre Lymphknotenmetastasen
N2 **N2a** **N2b**	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten Metastasen in 4-6 regionären Lymphknoten Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknaoten
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1 **M1a** **M1b**	Fernmetastasen Metastasen auf ein Organ beschränkt (Leber, Lunge, Ovar, nicht-regionäre Lymphknoten) Metastasen in mehr als einem Organ oder Peritoneum

Anhang 2: UICC-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms 2010 [Wittekind et al. 2010]

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1,T2	N0	M0
Stadium II	T3,T4	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T4a	N0	M0
Stadium IIC	T4b	N0	M0
Stadium II	T3,T4	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T4a	N0	M0
Stadium IIC	T4b	N0	M0
Stadium III	Jedes T	N1,N2	M0
Stadium IIIA	T1,T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
Stadium IIIB	T3,T4a	N1	M0
	T2,T3	N2a	M0
	T1,T2	N2b	M0
Stadium IIIC	T4a	N2a	M0
	T3,T4a	N2b	M0
	T4b	N1,N2	M0
Stadium IVA	Jedes T	Jedes N	M1a
Stadium IVB	Jedes T	Jedes N	M1b

Anhang 3: TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms nach UICC 2010 [Wittekind et al. 2010]

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ, intraepithelialer Tumor ohne Infiltration der Lamina propria
T1	Tumor infiltriert Lamina propria der Mukosa (T1a) oder Submukosa (T1b)
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert Subserosa
T4	penetriert Serosa (viszerales Peritoneum)
T4a	ohne Infiltration angrenzender Strukturen
T4b	Tumor infiltriert angrenzende Strukturen
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1-2 regionalen Lymphknoten
N2	Metastasen in 3-6 regionalen Lymphknoten
N3a	Metastasen in 7-15 regionalen Lymphknoten
N3b	Metastasen in >15 regionalen Lymphknoten
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Anhang 4: UICC-Klassifikation des Magenkarzinoms 2010 [Wittekind et al. 2010]

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stadium IIA	T1	N2	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIB	T1	N3	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4a	N0	M0
Stadium IIIA	T2	N3	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N1	M0
Stadium IIIB	T3	N3	M0
	T4a	N2	M0
	T4b	N0, N1	M0
Stadium IIIC	T4a	N3	M0
	T4b	N2, N3	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Anhang 5: Karzinomdifferenzierungsschema [Wittekind et al. 2010]

G_X	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G_1	Gut differenziert
G_2	Mäßig differenziert
G_3	Schlecht differenziert
G_4	Undifferenziert

Zwischenstufen sind möglich

Danksagung

Bei Frau Prof. Dr. D. Henne-Bruns möchte ich mich bedanken, dass ich in der Abteilung für Viszeral- und Transplantationschirurgie der Universität Ulm meine Dissertation erstellen durfte.
Herrn Prof. Dr. M. Kornmann danke ich für die Überlassung des Themas und ganz besonders für die stets ausgezeichnete Betreuung während aller Phasen dieser Arbeit. Wertvolle Unterstützung erhielt ich außerdem von Herrn Dr. A. Formentini. Herrn Dr. B. Schmidt danke ich für die freundliche Hilfe bei der Erstellung der Fotographien. Frau I. Schneider vermittelte mir die methodischen Kenntnisse für sämtliche Untersuchungen und unterstützte mich in außerordentlicher Weise.
Weiterhin danke ich allen, und ganz besonders meiner Partnerin Kerstin Müller, meinen Eltern und meiner Schwester Daria, die mich während meiner Dissertation unterstützt haben. Nur so konnte diese Arbeit gedeihen.

Lebenslauf

Name	Philipp Paul Braun
Geburtsdatum/-ort	10.07.1982/ Tübingen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Schulbildung	09/1994-07/1999 Kepler-Gymnasium Tübingen 08/1999-06/2000 Highschool - St. Louis/USA 09/2000-07/2002 Kepler-Gymnasium Tübingen 07/2002 Abitur
Zivildienst	08/2002-05/2003 Kreiskrankenhaus Perlach - München
Studium	10/2003-06/2010 Humanmedizin - Universität Ulm
Praktisches Jahr	02/2009-06/2009 Chirurgie - Montego Bay/Jamaika 06/2009-10/2009 Innere - Nîmes/Frankreich 10/2009-01/2010 HNO - Ulm
Staatsexamen	06/2010
Approbation	07/2010
Weiterbildung	01/2011 Krankenhaus Bad - Cannstatt, Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Common trunk