

Aus dem Institut für Pathologie im Klinikum Augsburg
Akademisches Lehrkrankenhaus der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Chefarzt Prof. Dr. med. Bruno Märkl

**Immunhistochemische Analyse tumorinfiltrierender
Lymphozyten (TIL) der T-Zellreihe CD3 und CD8 beim nodal-
negativen Kolonkarzinom mittels automatisierter
Bilddatenauswertung und deren prognostische Bedeutung**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Johanna Wieberneit
aus Augsburg

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Bruno Märkl
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Anno Graser, Prof. Dr. Andreas Jung,
Prof. Dr. Ludger Klein
Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2019

Meinen lieben Eltern gewidmet.

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 Epidemiologie	3
1.2 Pathogenese	4
1.3 Hereditäre Formen des Kolonkarzinoms	6
1.4 Risikofaktoren.....	8
1.5 Makroskopie	8
1.6 Histologie.....	9
1.7 Stadieneinteilung	9
1.8 Klinik	11
1.9 Diagnostik und Screening	11
1.10 Therapie	13
1.11 Optimierung der Lymphknotenausbeute und das Stadienmigrationsphänomen .	14
1.12 Das Immunsystem – Störfaktor zwischen Lymphknotenausbeute und verbessertem Überleben.....	16
1.12.1 Widerlegung des Stadienmigrationsphänomens	16
1.12.2 Immunsystem allgemein	17
1.12.3 Immunsystem und Tumoren	18
2. Material und Methoden	22
2.1 Patientenkollektiv	22
2.2 Histopathologische Bearbeitung und Morphometrie	22
2.2.1 Histologisches Vorgehen.....	22
2.2.2 Histopathologische Bearbeitung	23
2.3 Immunhistochemische Färbung	24
2.4 Zählen der Lymphozyten und die digitale Bildanalyse mit ImageJ	25
2.5 Statistik	31
3. Ergebnisse.....	32
3.1 Patienten und Follow-up	32
3.2 Zählen der intratumoralen Lymphozyten und Digitale Bildanalyse.....	33
3.3 Infiltrationsdichte intratumoraler Lyphozyten (ITL)	35
3.4 Intratumorale Lymphozyten vs. Qualitative ITL Einschätzung und Crohn-ähnliche Entzündung	38
3.5 Intratumorale Lymphozyten vs. Lymphknotenausbeute und LN5	39
3.6 MMR-Status vs. ITL und LN5	41
3.7 Überlebensanalyse	43
4. Diskussion	49
4.1 Krebsforschung jenseits der Tumorzelle	49

4.2 Immunosurveillance - körpereigene Immunabwehr gegen Tumoren.....	50
4.3 Immunoediting – Der Wirt formt seinen Tumor	51
4.4 Das Immunsystem als konfundierende Variable zwischen Lymphknotengröße, Lymphknotenausbeute und Prognose	53
4.5 Bestimmung der Lymphozytenzahlen mittels digitaler Bildanalyse	55
4.6 Lymphknotengröße und Immunantwort	57
4.7 Zusammenhänge zwischen Mismatch-Repair System und Immunantwort.....	58
4.8 Mikroumgebung des Tumors und Prognose - Zusammenhänge anhand von Scoring- Systemen	59
4.9 TNM-Immune – ein internationales Klassifikationssystem basierend auf dem Immunscore	64
4.10 Aufgeworfene Fragen und Konsequenzen der Arbeit	66
4.10.1 Anwendbarkeit und Limitierungen der Methode	66
4.10.2 Konsequenzen für Diagnostik und Therapie des Kolonkarzinoms	67
5. Zusammenfassung	71
6. Literaturverzeichnis	73
7. Abbildungsverzeichnis	82
8. Tabellenverzeichnis	85
9. Abkürzungsverzeichnis	86
10. Danksagung	87

1. Einleitung

Täglich entstehen im Körper Krebszellen – aufgrund einer genetischen Veranlagung, als Folge von Fehlern bei der Zellteilung oder auch durch äußere Einflüsse wie Zigarettenrauch oder Strahlung. In der Regel eliminiert unser Immunsystem diese Zellen umgehend. In bestimmten Fällen können sie aber der Immunabwehr entgehen und zu einem bösartigen Tumor heranwachsen. Ist es erst einmal zur Entstehung eines Tumors gekommen, spielt das Immunsystem im Hinblick auf die Prognose jedoch weiter eine entscheidende Rolle, die man sich zunehmend auch in der Therapie von bösartigen Tumoren zunutze macht. (1, 2)

Den Lymphknoten als Ort der Auseinandersetzung und Reifung von spezifischen körpereigenen Abwehrzellen kommt bei vielen Tumoren, so auch bei Karzinomen des Dickdarms, eine große Bedeutung zu; unter anderem stellt ein Befall von Lymphknoten mit Tumorzellen ein entscheidendes prognostisches Kriterium dar. Gleichzeitig zeugen vergrößerte Lymphknoten im Zusammenhang mit entzündlichen oder tumorösen Erkrankungen von einer gesteigerten lokalen Proliferation und Ansammlung von Zellen des Immunsystems; diese setzen sich vorwiegend aus Lymphozyten zusammen.

Dieser Arbeit vorausgehende Studien konnten bereits eine Assoziation zwischen vergrößerten Lymphknoten – im Sinne eines makroskopischen Aspektes einer starken Immunantwort – und einem verbesserten Outcome auch bei Patienten mit nodal-negativem Kolonkarzinom feststellen. (3, 4) Neben der Größe von Lymphknoten als Marker einer gesteigerten Immunantwort sollen in dieser Arbeit weitere Aspekte der tumorassoziierten Immunreaktion und deren Einfluss auf die Prognose untersucht werden. Vielfach lassen sich zelluläre Bestandteile der Immunabwehr in Form von Lymphozyten bei der histopathologischen Aufarbeitung nicht nur in Lymphknoten, sondern auch im Tumorgewebe selbst nachweisen. Dies deutet auf eine spezifische Auseinandersetzung des Immunsystems mit Zellen des Tumors hin. Hohe Zellzahlen von Lymphozyten im Tumorgewebe lassen somit eine starke Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem Tumorgewebe vermuten.

In diese Arbeit soll nun die Hypothese überprüft werden, inwieweit das Ausmaß der Immunantwort mit der Prognose beim Kolonkarzinom korreliert. Als Parameter für die Bestimmung der Immunaktivität sollen unter anderem Lymphknotengröße,

Lymphknotenausbeute sowie die Dichte tumorinfiltrierender Lymphozyten im Tumor dienen.

Es wird die Hypothese aufgestellt, dass eine starke Immunantwort sich positiv auf die Prognose von Patienten mit nodal-negativem Kolonkarzinom auswirkt und die Ausprägung der Parameter einer solchen Immunantwort miteinander assoziiert sind.

1.1 Epidemiologie

Das Kolonkarzinom gehört bei beiden Geschlechtern zu den häufigsten Tumorerkrankungen. Bei Männern stellt es die dritthäufigste, bei Frauen sogar die zweithäufigste Krebserkrankung dar. Lediglich das Prostatakarzinom und das Bronchialkarzinom bei Männern und das Mammakarzinom bei Frauen treten häufiger auf. Das mittlere Erkrankungsalter der Männer liegt bei 70,3 Jahren; das der Frauen bei 72,9 Jahren. Im Jahre 2013 lag die Anzahl der Neuerkrankungen in Deutschland bei 62.400 Menschen, wobei Männer mit 34.050 Neuerkrankungen etwas häufiger betroffen waren als Frauen. Während die Anzahl der Neuerkrankungen in Deutschland seit 1970 zunächst anstieg, lässt sich eine Abnahme der Inzidenz des Kolonkarzinoms feststellen. Im Jahre 2008 lag die Inzidenz noch bei 65.000. In der Zeitspanne zwischen 2003 und 2013 sanken die Neuerkrankungen bei Männern um 1,7% und bei Frauen um 2%. Gleichzeitig stieg die Anzahl der diagnostizierten in-situ Tumoren, was den 2002 eingeführten Vorsorge Koloskopien zugesprochen wird. (5) Die folgende Graphik des Robert-Koch Instituts zeigt die altersstandardisierten Neuerkrankungsraten der Jahre 1999 bis 2013 basierend auf den Daten des Krebsregisters. (Abb.1)

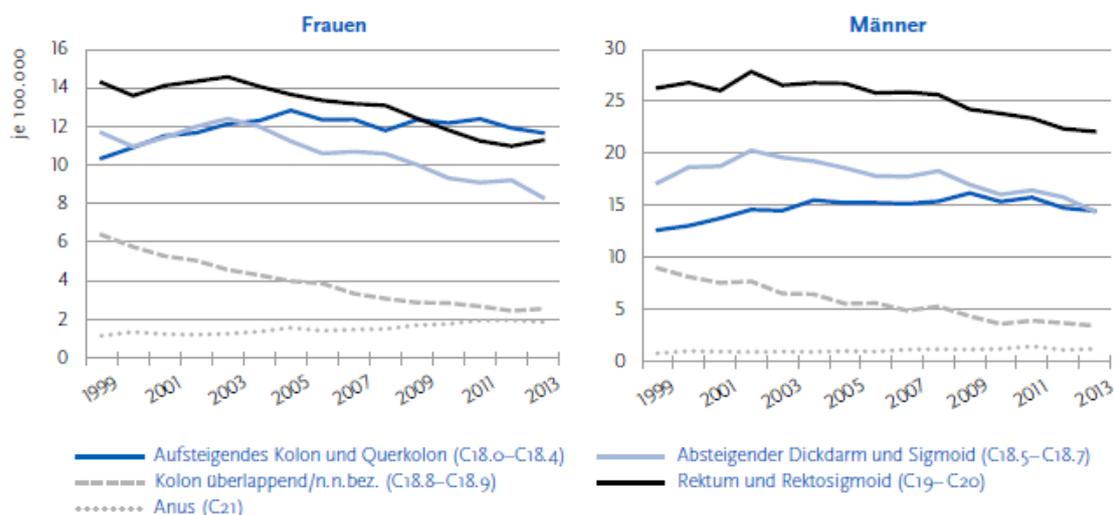


Abbildung 1: Altersstandardisierte Neuerkrankungen des Kolonkarzinoms in Deutschland zwischen 1999 und 2013(5)

Seit den 1990er Jahren gehen auch die Sterberaten deutlich zurück. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate des Kolonkarzinoms liegt bei 63%. (5)

Die folgende Tabelle des Robert-Koch Instituts fasst die epidemiologischen Kennzahlen des Kolonkarzinoms aus dem Jahr 2013 zusammen. (Abb. 2)

Neuerkrankungen	Frauen	Männer	Sterbefälle	Frauen	Männer
Absolute Zahl	28.360	34.050	Absolute Zahl	12.085	13.608
Mittleres Erkrankungsalter	72,9	70,3	Mittleres Sterbealter	78,1	74,0
Rohe Rate	68,9	86,3	Rohe Rate	29,3	34,5
Altersstandardisierte Rate	36,3	56,6	Altersstandardisierte Rate	13,0	21,6
Aktueller Trend ¹	-2,0%	-1,7%	Aktueller Trend ¹	-3,1%	-2,4%
Altersstandardisierte Rate (EU)	36,1	59,0	Altersstandardisierte Rate (EU)	13,8	23,8
Prognose für 2020 (absolute Zahl)	25.700	32.400	Aktueller Trend (EU) ¹	-1,5%	-1,1%

Überleben			Prävalenz		
Relatives 5-Jahres-Überleben	63%	63%	5-Jahres-Prävalenz	95.120	114.190
Relatives 10-Jahres-Überleben	60%	57%	10-Jahres-Prävalenz	162.180	189.340

¹ durchschnittliche jährliche Veränderung der altersstandardisierten Rate zwischen 2003 und 2013

Abbildung 2: Epidemiologische Kennzahlen des Kolonkarzinoms (2013) (5)

1.2 Pathogenese

Klassischerweise entstehen Kolonkarzinome über einen langen Zeitraum von meist 10-15 Jahren aus benignen Vorläuferläsionen, den Adenomen. Adenome können flach sein (flat adenomas) oder sie wachsen in das Darmlumen hinein und werden dann als Polypen bezeichnet. Adenome im Kolon und Rektum sind sehr häufig. Sie treten bei ca. 15% der 50-75 jährigen und bei ca. 40% der über 80 jährigen auf. (6) Histologisch gesehen unterscheidet man beim klassischen Adenom tubuläre (50–72%), tubulovillöse (22–30%) und villöse Adenome (5,5–15%). (7) Das Risiko der malignen Entartung steigt mit der Größe des Adenoms. Zudem gehen ein villöses Wachstum und das Vorkommen mehrerer Adenome mit einer höheren Wahrscheinlichkeit der Entartung einher. So entarten tubuläre Adenome < 1cm nur in 1-2%, während villöse Adenome > 2cm in mehr als der Hälfte der Fälle zum invasiven Karzinom werden. (8) Die Entwicklung vom gutartigen Adenom zum Karzinom wird als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet und wurde erstmalig 1990 von Fearon und Vogelstein beschrieben. (9) Zunächst entsteht eine Dysplasie bzw. intraepitheliale Neoplasie (IEN) - eine Proliferation des Epithels mit atypischen Zellen, die definitionsgemäß nur in der Mukosa besteht und die Submukosa noch nicht erreicht. Der Grad der Zellatypie nimmt im weiteren zeitlichen Verlauf zu. Aus einer low-grade IEN entsteht die high-grade IEN, bei der sich die Zellkerne vergrößert und pleomorph darstellen und die Zellpolarität im gesamten Epithel verloren geht. Hieraus kann sich letztlich ein invasives Karzinom entwickeln, das zur Metastasierung fähig ist und definitionsgemäß auch die Submukosa oder weitere Darmwandschichten befällt. Die Entwicklung vom Adenom zum Karzinom ist auf eine Abfolge verschiedener genetischer Mutationen zurückzuführen, bei denen es sowohl zur

Gegensatz zu den auf sessilen serratierten Adenomen basierenden Karzinomen weisen jene Karzinome, die ihren Ursprung im traditionell serratierten Adenom haben, nur eine geringe Mikrosatelliteninstabilität auf (MSI-low). (10) In Tabelle 1 sind die Eckdaten der genetischen Pathogenese des Kolonkarzinoms zusammengefasst.

Tab. 1 Gruppeneinteilung der kolorektalen Karzinome anhand ihrer molekularbiologischen Pathogenese [3]

	Gruppe 1 Klassischer Pathway	Gruppe 2 HNPCC- Syndrom	Gruppe 3 „serrated pathway“	Gruppe 4 „serrated pathway“	Gruppe 5
MSI-Status	MSS	MSI-H	MSI-H	MSS/MSI-L	MSS/MSI-L
CPG-Island-Methylierung	Keine	Keine	+++	+++	++
Chromosomale Stabilität Aneuploidie (An) Diploidie (Dip)	An >Dip	Dip >An	Dip >An	Dip >An	An >Dip
<i>Mutationen</i>					
APC	+++	++	+/-	+/-	+
K-RAS	++	++	-	+	+++
B-RAF	-	-	+++	++	-
p53	+++	+	-	+	++
Vorläuferläsion	Klassisches Adenom	Klassisches Adenom	SSA	TSA	Verschie- den
+ gering, ++ mäßig, +++ stark, - fehlend, MSS mikrosatellitenstabil, MSI-H hochgradig mikrosatelliteninstabil, MSI-L gering mikrosatelliteninstabil.					

Tabelle 1: Einteilung gemäß der Pathogenese des Kolonkarzinoms (10)

1.3 Hereditäre Formen des Kolonkarzinoms

Etwa 5-10% der Kolonkarzinome liegen genetische Syndrome, wie beispielsweise die obligate Präkanzerose Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) oder das Hereditäre, nichtpolypöse Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC), zugrunde. Bei der FAP kommt es zu einer autosomal-dominant vererbten Mutation im Tumorsupressorgen APC. In einem Viertel der Fälle entsteht die Krankheit auch durch eine Neumutation. Charakteristisch für diese Erkrankung ist das Auftreten von meist über 100 Adenomen im Kolon und Rektum, gelegentlich auch in weiter proximalen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts. Mit fast 100%iger Sicherheit kommt es zur Ausbildung eines Kolonkarzinoms; typischerweise im Alter zwischen 35 und 40 Jahren. Aus diesem Grund wird bei den Patienten nach der Pubertät meist eine Proktokolektomie durchgeführt. Risikopatienten, bei denen der Gendefekt nicht ausgeschlossen werden konnte, wird präventiv ab dem 10. Lebensjahr eine jährliche Rektosigmoidoskopie empfohlen. Beim Nachweis von

Rektumpolypen folgt die komplette Koloskopie. Das hereditäre, nichtpolypöse Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC), welches in 80% der Fälle zum Kolonkarzinom führt hat seinen Ursprung in einer autosomal-dominant vererbten Mutation einiger DNA-Reparaturproteine, wie MLH1, MSH2, MSH6. Auch für weitere Karzinome, wie das Ovarial-, das Magen-, oder das Endometriumkarzinom besteht ein gesteigertes Risiko. Insbesondere für das Endometriumkarzinom liegt das Lebenszeitrisiko bei HNPCC-Patienten bei 50-60%. Das Kolonkarzinom tritt durchschnittlich im Alter von 45 Jahren auf. Um ein HNPCC diagnostizieren zu können, wurden die Amsterdam- und später die Bethesda-Kriterien eingeführt. Für eine Diagnose müssen alle der folgenden Amsterdam II Kriterien erfüllt sein:

<ul style="list-style-type: none"> • Mindestens 3 Familienmitglieder sind an Karzinomen erkrankt, die mit HNPCC in Verbindung gebracht werden
<ul style="list-style-type: none"> • einer der Betroffenen ist mit den beiden anderen erstgradig verwandt
<ul style="list-style-type: none"> • Mindestens 2 aufeinanderfolgende Generationen sind betroffen
<ul style="list-style-type: none"> • Mindestens 1 Patient wurde vor dem 50. Lebensjahr mit dem Tumor diagnostiziert

Bei den veralteten Amsterdam I Kriterien wurden lediglich Kolonkarzinome berücksichtigt, nicht jedoch extrakolische Tumoren. Die neueren Bethesda-Kriterien ermöglichen eine Diagnose auch bei kleineren Familien und ziehen im positiven Fall weitere Untersuchungen nach sich. (10-12)

Auch unabhängig von definierten genetischen Syndromen besteht wie bei vielen anderen Tumoren, auch beim KRK eine erbliche Komponente. Während das Karzinomrisiko der Normalbevölkerung bei 6% liegt, haben Menschen, die zu einem Kolonkarzinompatienten erstgradig verwandt sind, ein doppelt so hohes Risiko im Laufe ihres Lebens ebenfalls an einem KRK zu erkranken. Die Wahrscheinlichkeit hängt hierbei vom Erkrankungsalter des betroffenen Verwandten ab. Tritt bei besagten erstgradigen Verwandten das Karzinom vor dem 60. Lebensjahr auf, kommt es zu einer 3-4 fachen Risikosteigerung. (12)

1.4 Risikofaktoren

Allgemeine Risikofaktoren an einem sporadischen Kolonkarzinom zu erkranken, stellen eine ballaststoffarme, fettreiche und fleischreiche Ernährung dar. Besonders dem Verzehr von rotem Fleisch wird ein starker Zusammenhang mit dem Kolonkarzinom zugesprochen. Wie bei vielen anderen Tumoren erhöhen auch ein vermehrter Nikotin- und Alkoholkonsum sowie Übergewicht das Tumorrisiko. (13) 1-2% der Kolonkarzinome entstehen als Folge einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung. Besonders die Colitis ulcerosa stellt ein erhöhtes Risiko dar, wobei die Karzinomwahrscheinlichkeit mit dem Ausmaß des entzündlichen Befalls und der Dauer der Erkrankung weiter ansteigt. Liegt eine 30 Jahre bestehende Entzündung des gesamten Kolons vor, liegt das Karzinomrisiko bereits bei 18%. Weitere Risikoerkrankungen stellen Adenome im Dick- und Enddarm und andere Krebserkrankungen, wie z.B. das Mamma- oder Ovarialkarzinom dar. (7)

Als protektive Faktoren können hingegen körperliche Aktivität (13) und eine ballaststoffreiche Ernährung angesehen werden. (14) Auch Vitamin D hat einen protektiven Effekt. So konnte eine 72%ige Risikoreduktion des Kolonkarzinoms bei Vitamin D- Spiegeln von über 80 nmol/L festgestellt werden. (15)

1.5 Makroskopie

Obwohl das Kolon- und das Rektumkarzinom bezüglich ihrer Pathogenese zusammengefasst werden können, werden sie bezüglich ihrer makroskopischen Lokalisation dennoch unterschieden. Definitionsgemäß liegen die Rektumkarzinome mit ihrem aboralen Tumorrand 16cm oder weniger von der Anokutanlinie entfernt. Circa 50% der KKK befinden sich im Rektum, 20% im Sigma, 15% im Colon ascendens, 8% im Colon transversum und 7% im Colon descendens. (7) Makroskopisch unterscheidet man zwischen ulzerös-zerfallenden Karzinomen, polypös-exophytischen Karzinomen, die in das Darmlumen hineinwachsen und den nur sehr selten auftretenden diffus-infiltrierenden Karzinomen. Zwei Drittel aller KKK fallen in die Kategorie der ulzerös-zerfallenden Karzinome, die durch schüsselförmige Ulzerationen mit prominentem Randwall charakterisiert sind. (8)

1.6 Histologie

Histologisch betrachtet ist das Adenokarzinom, das in 80-85% der Kolonkarzinome und in 85-90% der Rektumkarzinome auftritt, die mit Abstand häufigste Variante des KRK. 3,6% aller kolorektalen Karzinome gehören zu den medullären Adenokarzinomen. Sie zeichnen sich durch häufig rechtsseitige Lokalisation und eine sehr günstige Prognose aus. In diesem Zusammenhang ist bereits erwähnenswert, dass die tumorinfiltrierenden Lymphozyten bei diesem Karzinom in besonders hoher Zahl auftreten. Charakteristisch für das muzinöse Karzinom ist der extrazelluläre Schleim. Für die Klassifizierung als muzinöses Adenokarzinom müssen definitionsgemäß über 50% des Tumors muzinös differenziert sein. Während diese Karzinome bei hoher Mikrosatelliteninstabilität (MSI-high) noch eine recht gute Prognose aufweisen, werden muzinöse Adenokarzinome mit Mikrosatellitenstabilität (MSS) als High-grade- Karzinome mit sehr schlechtem Outcome eingestuft. Auch beim sehr seltenen Siegelringzellkarzinom differenziert der MSI-Status die Prognose in ähnlicher Weise. Das serratierte Adenokarzinom ist eine weitere Variante, die ca. 7,5% aller kolorektalen Karzinome ausmacht. Man unterscheidet hier zwischen zwei molekularen Subtypen, die sich wesentlich in ihrer Prognose unterscheiden. In 80% der serratierten Adenokarzinome liegt ein Hochrisikosubtyp mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von unter 30% vor, der meist im linken Kolon lokalisiert und mikrosatellitenstabil ist. Als Vorläuferläsion fällt meist das traditionell serratierte Adenom auf. Der wesentlich seltenere Niedrigrisikosubtyp des serratierten KRK befindet sich meist rechtsseitig, weist meist eine Mikrosatelliteninstabilität auf und hat mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von über 70% eine weitaus bessere Prognose. Zu den seltenen Varianten des KRK gehören zudem das adenosquamöse Karzinom, welches Adenokarzinom- und Plattenepithelkarzinomanteile aufweist, das spindelzellige Karzinom und das reine Plattenepithelkarzinom. Erwähnenswert sind zudem das mikropapilläre Karzinom, dessen Tumorzellen immunhistologisch Villin und MUC-1 exprimieren, sowie das undifferenzierte Karzinom, das meist mikrosatellitenstabil ist und leicht mit Lymphomen oder leukämischen Infiltraten verwechselt werden kann. (8)

1.7 Stadieneinteilung

Um die Ausbreitung eines KRK zu beschreiben wird die TNM Klassifikation herangezogen. Das ‚T‘ beschreibt die Eindringtiefe des Tumors in die Darmwand, das ‚N‘ den Befall der Lymphknoten und das ‚M‘ die Metastasierung. (Tabelle 2) Auf der

Basis der TNM-Angaben wurde von der UICC (Union for International Cancer Control) eine Stadieneinteilung entwickelt. (Tabelle 3)

TIS	Carcinoma in situ: Epithel bis zur Lamina propria
T1	Submukosa
T2	Muskularis propria
T3	Subserosa
T4a	Viszerales Peritoneum
T4b	Benachbarte Strukturen
N0	Keine Lymphknotenmetastasen
N1a	1 LK
N1b	2-3 LK
N1c	Tumorknötchen/ Satelliten in der Subserosa oder in nicht peritonealisiertem Fettgewebe ohne regionärem LK-Befall
N2c	4-6 LK
N2b	7 LK oder mehr
M0	Keine Fernmetastasen
M1a	1 Organ von Fernmetastasen Befallen (kein Befall des Peritoneums)
M1b	Fernmetastasen in mehr als 1 Organ
M1c	Metastasen im Peritoneum (mit oder ohne weitere Organbeteiligung)

Tabelle 2: TNM – Klassifikation(UICC, 2016)(16)

Stage 0	Tis	N0	M0
Stage I	T1, T2	N0	M0
Stage II	T3, T4	N0	M0
Stage IIA	T3	N0	M0
Stage IIB	T4a	N0	M0
Stage IIC	T4b	N0	M0
Stage III	Any T	N1, N2	M0
Stage IIIA	T1, T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
Stage IIIB	T1, T2	N2b	M0
	T2, T3	N2a	M0
	T3, T4a	N1	M0
Stage IIIC	T3, T4a	N2b	M0
	T4a	N2a	M0
	T4b	N1, N2	M0
Stage IV	Any T	Any N	M1
Stage IVA	Any T	Any N	M1a
Stage IVB	Any T	Any N	M1b
Stage IVC	Any T	Any N	M1c

Tabelle 3: Einteilung nach UICC (2016) (16)

Kolonkarzinomes werden ebenso wie die meisten malignen Tumoren graduiert („gegradet“). Dies gilt allerdings ausschließlich für Tumoren mit konventioneller Histologie. Hierbei wird der Grad der Tumordifferenzierung bestimmt und in vier Kategorien eingeteilt. G1 = gut differenziert; G2 = mäßig differenziert; G3 = schlecht differenziert und G4 = undifferenziert. Auch eine zweistufige Einteilung ist gebräuchlich, wobei hier G1 und G2 zu „low-grade“- und G3 und G4 zu „high-grade“- Tumoren zusammengefasst werden. Entscheidend ist hier der prozentuale Anteil an drüsig differenzierten Karzinomanteilen. Spezielle Tumortypen (z.B. mikropapilläre Tumoren) sind nicht graduiert. Alle mikrosatelliteninstabilen Tumoren sind als low-grade zu klassifizieren. (8, 17)

1.8 Klinik

Beim KRK gibt es keine eindeutigen und frühzeitigen Symptome. Ein verdächtiger Hinweis ist oft die Blutbeimengung im Stuhl. Während dies beim Rektumkarzinom häufiger vorkommt, findet man bei nur 1/6 der rechtsseitigen Kolonkarzinome Blut im Stuhl, weshalb ein Kolonkarzinom auch bei fehlendem Blutnachweis nicht ausgeschlossen werden kann. Weitere unspezifische Symptome sind jegliche Änderungen der Stuhlgewohnheiten wie beispielsweise der Wechsel zwischen Obstipation und Diarrhoe. Häufig liefert auch die chronische Anämie den ersten Hinweis auf eine intestinale Blutung und damit auf das Kolonkarzinom. Besonders bei einer mikrozytären hypochromen Anämie (Eisenmangelanämie) sollte immer auch an eine gastrointestinale Blutung durch einen Tumor gedacht werden. Tumoren im Colon ascendens bleiben bezüglich der Stuhlgewohnheiten lange asymptomatisch und werden oft erst durch Symptome einer chronischen Anämie wie Fatigue, und mangelnde Belastbarkeit auffällig. Im späten Stadium kann das Kolonkarzinom durch Gewichtsabnahme oder Symptome eines tumorbedingten Darmverschlusses symptomatisch werden. (13) Da die Symptome erst spät und uncharakteristisch auftreten, spielen Vorsorgeuntersuchungen eine wichtige Rolle, um Karzinome in einem möglichst frühen Stadium zu diagnostizieren.

1.9 Diagnostik und Screening

Erste diagnostische Maßnahmen bei den oben genannten klinischen Symptomen sind eine digitale rektale Untersuchung und ein FOBT (fecal occult blood test), der

Blutbeimengung im Stuhl nachweisen kann. Der FOBT weist die Aktivität der Peroxidase des Häms im Stuhl nach. Der diagnostische Goldstandard beim Kolonkarzinom ist jedoch die Endoskopie, die auch diagnostische Biopsien und somit eine sichere histopathologische Diagnose erlaubt. Zudem können auf diese Weise Adenome bzw. Polypen, oder Frühformen von Tumoren mit Dysplasien oder ein Carcinoma in situ bereits therapeutisch entfernt werden. (13) Eine Alternative zur klassischen Koloskopie stellt die virtuelle Koloskopie mittels CT dar. Die Untersuchung ist zwar weniger invasiv, Polypen können jedoch nicht abgetragen werden und erfordern bei Detektion eine zusätzliche Koloskopie. (18) Bei gesichertem Kolonkarzinom gehören ein CT des Thorax und Abdomen zum präoperativem Staging um mögliche Fernmetastasen zu detektieren. Beim Rektumkarzinom werden zudem noch eine starre Rektoskopie, ein Becken-MRT und eine Endosonographie durchgeführt, um die onkologische Resektabilität im Hinblick auf die mesorektale Faszie und eine sphinktererhaltende Therapie festlegen zu können. Weiter wird dadurch die Entscheidung zur eventuellen Durchführung einer neoadjuvanten Therapie determiniert. (13) Gängige Tumormarker kolorektaler Karzinome stellen das CEA und CA19/9 dar. CEA (Carcinoembryonales Antigen) ist ein Oberflächen-Glykoprotein, das als interzelluläres Adhäsionsmolekül zwischen Kolonkarzinomzellen fungiert und zudem als Tumormarker des KKR dient. (19) CEA ist wie viele andere Tumormarker nicht tumorspezifisch und kann auch bei anderen Tumoren wie dem Magen-, Pankreas-, oder Mammakarzinom oder auch bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen erhöht sein. Zudem lassen sich auch bei benignen Lebererkrankungen sowie bei sonst gesunden Rauchern oft erhöhte Werte feststellen. Die Bedeutung dieser Tumormarker liegt vorwiegend in der Tumornachsorge, da ein Anstieg nach erfolgreicher Tumoresektion für ein Tumorrezidiv oder eine Fernmetastasierung sprechen kann. Bezüglich der Beurteilung eines Tumorrezidivs weist das CEA eine Sensitivität von 80% und eine Spezifität von 70% auf. Der CEA-Wert korreliert mit dem Fortschreiten des Karzinoms und hat seine Bedeutung in der Früherkennung von Lebermetastasen. (20)

Besonders beim Kolonkarzinom spielen Vorsorgeuntersuchungen und Screening eine wichtige Rolle, da es zum einen sehr häufig vorkommt und sich zum anderen über die Adenom-Karzinom-Sequenz über einen längeren Zeitraum (meist 10-15 Jahre) entwickelt, während dessen das Karzinom oder dessen Vorläufer entdeckt und idealerweise therapiert werden können. Die Vorsorgekoloskopie, die leitliniengemäß alle 10 Jahre durchgeführt werden soll, wird von der gesetzlichen Krankenkasse in

Deutschland ab einem Alter von 55 Jahren übernommen. Aus Sicht der Leitlinien wird die Koloskopie jedoch bereits ab 50 Jahren empfohlen, da durch sie die Entwicklung zum Karzinom in 2/3 der Fälle verhindert werden kann. Die Mortalität des KKR kann so um 31% gesenkt werden. (21, 22)

1.10 Therapie

Im nicht fernmetastasierten Tumorstadium ist die radikale chirurgische Therapie die einzige Therapieform, die eine vollständige Heilung des Tumorleidens erreichen kann. Diese beinhaltet beim Kolonkarzinom die Einhaltung von ausreichend großen Sicherheitsabständen zum Tumor (minimal 5 cm) entsprechend der Darmvaskularisation und eine komplette mesokolische Exzision zur Gewährleistung der vollständigen Lymphadenektomie. Beim Rektumkarzinom erfolgt neben der Resektion des Primärtumors im Gesunden eine partielle oder totale mesorektale Exzision je nach Lage des Karzinoms, um auf diese Weise das regionäre Lymphabflussgebiet vollständig mit zu erfassen. Die akzeptierten Sicherheitsabstände liegen hierbei je nach Tumorage bei minimal 1-2 cm vom aboralen Tumorrand. Ob die Operation konventionell offen oder laparoskopisch erfolgt, spielt bei nachgewiesener Lymphknotenausbeute und histopathologischer Qualität der mesokolischen oder mesorektalen Exzision keine Rolle. Ist die Umgebung des Darms ebenfalls betroffen ist eine en-bloc Resektion der infiltrierten Strukturen nötig. Entscheidend für Prognose und Stadieneinteilung und somit für die weitere Therapie sowohl beim Kolon- als auch beim Rektumkarzinom sind neben der lokalen Tumorkontrolle immer die systematische Lymphadenektomie des entsprechenden Lymphabstromgebietes. Insbesondere die histopathologische Beurteilung der Lymphknoten spielt eine wichtige Rolle bei der Entscheidung über das weitere therapeutische Vorgehen, da man generell Patienten mit nodal-positiven Tumoren eine adjuvante Therapie zukommen lässt. (23) Im Gegensatz zu dem lediglich operativ behandelten Stadium I, folgt beim Kolonkarzinom im Stadium III leitliniengemäß eine adjuvante Therapie. Im Stadium II wird diese nur bei bestimmten Risikofaktoren durchgeführt. Als solche gelten ein Tumor im T4-Stadium, ein durchgeführter Notfalleingriff, eine Tumorperforation oder ein Tumoreinriss sowie der pathologisch bestätigte Befall von Blut- oder Lymphgefäßen. Auch eine unzureichende Lymphknotenausbeute von unter 12 Lymphknoten gilt als Risikofaktor und somit als Indikation für eine adjuvante Therapie. (24) Als gängige zytostatische Therapie gilt die Kombination aus einem Flouropirimidin mit Oxaliplatin oder Irinotecan. (25) Des

Weiteren wird die klassische zytostatische Therapie beim metastasierten Kolon - und Rektumkarzinom durch den Einsatz monoklonaler Antikörper ergänzt. Bevacizumab bindet den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) während Panitumumab und Cetuximab sich gegen den Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) richten. Die EGFR Antikörper wirken jedoch nur bei Patienten mit RAS-Wild Typ, die ca. 50% des Patientenkollektivs ausmachen. Eine aktivierende Mutation im RAS-Gen macht diese Wirkstoffe ansonsten unwirksam. (23, 25, 26) Auch in metastasierten Stadien kann beim KRK durch Metastasenresektionen gegebenenfalls in Kombination mit Chemotherapeutika und Antikörpertherapie in bestimmten Konstellationen durchaus auch eine Heilung erzielt werden. Lokal fortgeschrittene oder diffus metastasierte Tumoren können palliativ medikamentös oder chirurgisch die Lebensqualität steigernd und symptomorientiert behandelt werden: Hierzu gehört beispielsweise die Anlage von Umgehungsanastomosen bei einem bevorstehenden oder bereits existierenden Ileus durch den Tumor. (23)

1.11 Optimierung der Lymphknotenausbeute und das Stadienmigrationsphänomen

Wie oben bereits erwähnt, kommt der systematischen Lymphadenektomie eine entscheidende Bedeutung zu, da eine unzureichende Resektion und Lymphknotenausbeute einen Risikofaktor darstellt, der bereits im Stadium II die Empfehlung zur sonst nur im Stadium III durchgeführten adjuvanten Chemotherapie mit sich bringt. Die systematische Lymphadenektomie ist von besonderer Bedeutung, da sie im Gegensatz zu allen anderen Risikofaktoren von den behandelnden Medizinern beeinflusst werden kann. Das adequate Staging eines Tumors und konkret die Entscheidung über positiven oder negativen Lymphknotenbefall markiert einen der entscheidendsten Punkte im Krankheitsverlauf des Patienten. Die exakte Diagnostik entscheidet somit über Therapie und Prognose der Patienten und ist deshalb ein zentrales Qualitätsmerkmal ärztlicher Tätigkeit. Sowohl der operierende Chirurg, als auch der auswertende Pathologe sind dabei die wichtigsten Determinanten. Verschiedene Studien geben gemäß ihren Ergebnissen unterschiedliche Empfehlungen bezüglich der Anzahl der zu entnehmenden Lymphknoten ab. Während Goldstein et al. die Entnahme von 30 Lymphknoten empfehlen (27), sehen Maurel et al. die Untersuchung von 9-15 Lymphknoten als ideal an. (28) Die S3- Leitlinie des Kolonkarzinoms und die UICC empfehlen bei der Tumorresektion die Entnahme von mindestens 12 Lymphknoten, um

potentielle Lymphknotenmetastasen sicher zu detektieren bzw. sicher auszuschließen. (23) Ein sorgfältiges Vorgehen sowohl bei der chirurgischen Resektion, als auch bei der Aufarbeitung des Präparats durch den Pathologen ist essentiell, um die geforderte Anzahl an Lymphknoten zu entnehmen und zu detektieren. Es erscheint einleuchtend, dass im Falle einer zu geringen Anzahl an untersuchten Lymphknoten die Wahrscheinlichkeit hoch ist, von Tumorzellen befallene Lymphknoten zu übersehen und dem Patienten beim Staging ein zu niedriges Tumorstadium zuzuordnen, wodurch ihm notwendige Therapien wie die adjuvante Chemotherapie vorenthalten würden. Mehrere Studien haben dementsprechend gezeigt, dass KRK Patienten im Stadium II und III mit steigender Anzahl untersuchter Lymphknoten eine bessere Prognose aufweisen. (29) Feinstein et al. studierten dieses sogenannte Stadienmigrationsphänomen, das auch unter dem Begriff Will-Rogers-Phänomen bekannt ist, bereits am Beispiel des Lungenkarzinoms. Vereinfacht beschreibt der Begriff eine Änderung der Prognose durch eine diagnostisch bedingte Änderung des Tumorstadiums eines Patienten. Durch exakteres Staging würde beispielsweise ein Patient, bei dem ein befallener Lymphknoten übersehen wurde bei korrektem Staging als Stadium III klassifiziert, während er ansonsten fälschlicherweise als Stadium II durchgehen würde. Während seine individuelle Prognose gleich bliebe, verbessern sich im Allgemeinen jedoch die Überlebensraten des Kollektivs ‚Stadium III Patienten‘, da ansonsten lediglich weiter fortgeschrittene Karzinome dieser Gruppe zugeordnet würden. (30, 31) In der Praxis wird die Marke von 12 Lymphknoten bei manchen Patienten zwar weit überschritten, bei vielen wird sie jedoch auch von erfahrenen Medizinern nicht erreicht, obwohl die adäquate Entnahme und Detektion der Lymphknoten als Qualitätsmerkmal von Chirurgie und Pathologie angesehen wird. (32, 33) Während die klassische Aufarbeitung von Lymphknotenpräparaten auf Inspektion und Palpation basiert, wird das Auffinden von Lymphknoten durch die methylenblauassistierte Lymphknotenpräparation stark vereinfacht und die Lymphknotenausbeute erhöht. Hierbei wird Methylenblau intraarteriell im unfixierten Präparat injiziert. Durch die blaue Farbe wird das Auffinden der Lymphknoten stark erleichtert. Das Ziel von 12 untersuchten Lymphknoten konnte durch die methylenblauassistierte Lymphknotenpräparation in der Studie von Märkl et al in über 95% der Fälle erreicht werden, während dies bei konventionellen Verfahren nur in 35-73% der Fälle gelang. Da in Wächterlymphknoten 2-4 mal so häufig Metastasen entdeckt werden, ist auch die Ex-vivo-Sentinellymphknotenmarkierung möglicherweise eine sinnvolle Ergänzung, obwohl bei der Metastasierung des Kolonkarzinoms auch Lymphknotenstationen übersprungen werden können. Hierbei erfolgt eine

Tuscheinjektion vor der Methylenblauinjektion. (34) Eine weitere Möglichkeit, die Lymphknotenausbeute zu steigern stellt neben den schon seit längerem praktizierten Clearing-Methoden mit unterschiedlichen Lösungsmitteln auch die Acetonkompression dar. Hierbei wird das Fettgewebe komprimiert und dessen Gewicht um bis zu 95% verringert. Eine Lamellierung von Hand wird so obsolet. (35)

1.12 Das Immunsystem – „Störfaktor“ zwischen Lymphknotenausbeute und verbessertem Überleben

1.12.1 Widerlegung des Stadienmigrationsphänomens

Eine erhöhte Anzahl an detektierten nodal-positiven Karzinomen und eine verbesserte Prognose durch die neuen Verfahren der Lymphknotenpräparation ließen sich jedoch nicht bestätigen. In einer 2013 von Märkl et al. durchgeführten Studie wurde der Studiengruppe, deren Lymphknotenpräparation mithilfe von Methylenblau erfolgt war, eine Kontrollgruppe mit konventionellen Verfahren gegenübergestellt. Erwartungsgemäß war die Lymphknotenausbeute in der Studiengruppe mit 34 ± 17 bedeutend höher als die der Kontrollgruppe mit 13 ± 5 Lymphknoten. Die Annahme, dass durch exaktere Methoden der Lymphknotenbeurteilung mehr Lymphknotenmetastasen detektiert werden können und die Anzahl falsch lymphknotennegativer Fälle rückläufig ist, konnte jedoch nicht bestätigt werden. Der Anteil lymphknotenpositiver Fälle lag in beiden Gruppen bei 37%. Auch bezüglich der Überlebensdauer war die Studiengruppe der Kontrollgruppe nicht überlegen. Da die Frage nach der notwendigen Anzahl an untersuchten Lymphknoten immer noch nicht geklärt ist, ist auch die Tatsache, dass sich die erste detektierte Lymphknotenmetastase in 89% der Fälle unter den ersten 12 Lymphknoten befand, durchaus erwähnenswert. (4)

In einer von Ricciardi et al. durchgeführte Studie mit über 120.000 Probanden lag genau wie in der oben erwähnten Studie die Rate lymphknotenpositiver Fällen bei 37% obwohl hier bedeutend weniger Lymphknoten untersucht wurden und die Zielmarke von 12 Lymphknoten in 61% der Fälle nicht erreicht wurde. (4) (36) Auch ältere Studien kamen zu dem Schluss, dass eine nachträgliche Fett-Clearance, also eine vertiefte Analyse des Präparats mit der Untersuchung weiterer Lymphknoten nur in seltenen Fällen eine Änderung des Tumorstadiums zur Folge hatte. (37)

Es steht außer Frage, dass eine ausreichende Anzahl an untersuchten Lymphknoten notwendig ist und ebenso ein Qualitätsmerkmal vor allem der Arbeit des Chirurgen aber

auch des Pathologen darstellt. Die o.g. Beispiele sprechen jedoch gegen die Hypothese, dass mit sorgfältigerer Lymphknotenpräparation zwangsläufig weniger Metastasen übersehen werden und das Staging optimiert wird. Das Will Rogers Phänomen scheint sich somit nicht zu bestätigen. Die Frage nach dem Zusammenhang zwischen höherer Lymphknotenausbeute und verbessertem Überleben gilt es jedoch immer noch zu klären und der Verdacht liegt nahe, dass es einen Störfaktor zwischen diesen beiden Variablen gibt oder dass weitere unabhängige Variablen die Prognose beeinflussen. Dieser „Störfaktor“ ist nach der Annahme dieser Studie das Immunsystem bzw. die körpereigene Immunabwehr gegen den Tumor, worauf ich im weiteren Verlauf meiner Arbeit eingehen möchte.

1.12.2 Immunsystem allgemein

Unser Immunsystem besteht aus einer angeborenen, unspezifischen Abwehr, die sich wiederum in ein zelluläres und ein humorales System aufteilen lässt sowie aus einer spezifischen Immunabwehr. Beteiligte Zellen des angeborenen Immunsystems sind Makrophagen sowie neutrophile -, basophile - und eosinophile Granulozyten. Zytokine, Interferone und das Komplementsystem bilden die humorale Komponente der angeborenen Abwehr. Zytokine sind hormonartige Stoffe, die von Immunzellen wie beispielsweise natürliche Killerzellen (NK-Zellen) oder T-Zellen gebildet werden und wiederum die Proliferation anderer Immunzellen triggern. Das Komplementsystem aktiviert Zellen der Immunabwehr und kann durch eine kaskadenartige Aktivierung von Proteinen letztendlich dazu führen, dass Erreger durch Porenbildung in ihrer Membran zerstört werden. Zum spezifischen Immunsystem gehören T- und B-Lymphozyten und NK-Zellen. B-Lymphozyten wandeln sich nach Antigenkontakt zum Teil in Plasmazellen um und produzieren Immunglobuline, die als Antikörper gegen Bakterien, Parasiten oder Viren wirken. In dieser Arbeit liegt der Fokus jedoch auf den T-Lymphozyten, die sich in CD4-positive T-Helferzellen und CD8-positive T-Killerzellen unterscheiden lassen. Die T-Helferzellen erkennen Antigene mittels MHC-II Molekülen und aktivieren mittels Zytokinen andere Immunzellen. Die CD8-positiven T-Killerzellen erkennen Antigene in Verbindung mit MHC-I, welches auf allen Zellen exprimiert wird. Ihre Aufgabe ist es vorwiegend, virushaltige Zellen zu eliminieren. Alle T-Zellen tragen zudem einen T-Zell-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche, der aus zwei Polypeptidketten, einer alpha-Kette und einer beta-Kette und dem CD3-Komplex besteht. Der CD3 Komplex besteht wiederum

aus einer γ -, δ -, ϵ - und ζ -Kette und ist bei allen T-Zellen gleich. Der T-Zell-Rezeptor dient der Erkennung fremder Peptide, die den T-Zellen von antigenpräsentierenden Zellen mittels MHC- Molekülen präsentiert werden. Der CD3-Komplex dient der Weiterleitung der Antigen-spezifischen Signale, die die T-Zellen aktivieren. (38)

Besonders erwähnenswert sind einige spezielle Arten der in dieser Studie genauer betrachteten T-Lymphozyten. T-Gedächtniszellen, die neben den Antigenen CD3 und CD4 oder CD3 und CD8 zusätzlich das Antigen CD45RO besitzen, hatten bereits mit einem bestimmten Antigen Kontakt und können auf dieses schneller und besser reagieren als naive T-Zellen es können. Regulatorische T-Zellen sind CD4-positiv und haben eine hemmende Wirkung auf T- und B-Lymphozyten. Sie unterdrücken die Immunantwort, indem sie Zytokine wie IL-10 und TGF β sezernieren und spielen somit eine wichtige Rolle bei der Abwendung überschießender Immunreaktion und Autoimmunerkrankungen. Die CD4-positiven T-Helferzellen lassen sich nochmals in TH1-, TH2- und TH17-Zellen unterscheiden. TH1-Zellen sezernieren IL-2 und IFN γ . Sie fördern mit ihrer Aktivierung von Makrophagen, NK-Zellen und zytotoxischen Lymphozyten die zelluläre Immunantwort sowie die Abwehr gegen intrazelluläre Erreger. TH2-Zellen sind mit ihrer Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13 an der humoralen Immunantwort vorwiegend gegen extrazelluläre Erreger beteiligt. Sie aktivieren in erster Linie B-Zellen. TH17-Zellen wirken mit ihrem Zytokin IL-17 entzündungsfördernd an Endothel und Epithel. (1, 39)

1.12.3 Immunsystem und Tumoren

Auch im Zusammenhang mit Tumoren spielt das Immunsystem in jeder Hinsicht eine sehr wichtige Rolle. Einige Tumoren entstehen durch eine Immundefizienz und opportunistische virale Infektionen. So treten beispielsweise bei AIDS Patienten vermehrt Tumoren wie das Karposi-Sarkom oder Non-Hodgkin Lymphome auf. (40) Andererseits kann auch ein überschießendes Immunsystem im Sinne einer chronischen Entzündung zur Entstehung von Tumoren beitragen. (41) Zudem hat das Immunsystem nicht nur bei der Tumorentstehung sondern auch bei ihrer Abwehr und der Eindämmung des Tumorwachstums eine große Bedeutung, wie die im Verlauf der Arbeit näher beschriebene Theorie des Immunoediting besagt. (42) (2) Auch in der Tumorthherapie macht man sich eine aktive Immunantwort zunutze. So wird zum Beispiel bei der Therapie des Blasenkarzinoms durch das Einbringen des immunogenen Bacillus

Calmette-Guérin, dem eigentlichen Impfstoff gegen Tuberkulose, eine Immunreaktion hervorgerufen, die sich letztendlich gegen den Tumor richtet. (43)

In der Qualitätsbeurteilung der onkologischen Kolonchirurgie liegt der Fokus wie oben beschrieben neben der lokalen Tumorresektion auf der Anzahl der entfernten und untersuchten Lymphknoten. In diesem Zusammenhang lohnt es sich jedoch, den Lymphknoten selbst mehr Beachtung zu schenken, da sie nicht nur einen Metastasierungsweg darstellen, sondern selbst ein entscheidender Teil des Immunsystems darstellen und somit prognosebestimmend sein können.

Die neuen Verfahren der Lymphknotenpräparation machen das Auffinden von immer kleineren Lymphknoten möglich. In der Onkologie sind es aber meist die vergrößerten Lymphknoten, die den Verdacht auf eine Metastase lenken. Radiologen setzen die Grenze für einen auffälligen Lymphknoten bei $> 1\text{cm}$. (44) Eine alternative Herangehensweise lässt jedoch vermuten, dass vergrößerte Lymphknoten unter anderem Ausdruck einer aktiven immunologischen Auseinandersetzung mit Tumorzellen und einer daraus resultierenden Immunantwort sind. Da große Lymphknoten grundsätzlich besser detektierbar sind, kann man nun schlussfolgern, dass bei Patienten mit vermehrt großen Lymphknoten auch die Lymphknotenausbeute entsprechend größer ausfällt. Gemäß der Hypothese dieser Studie hat die Korrelation zwischen höherer Lymphknotenausbeute und verbessertem Überleben ihren Ursprung in einem aktiveren Immunsystem dieser Patienten. Andere Theorien wie das Stadienmigrationsphänomen werden somit in Frage gestellt. Eine 2012 von Märkl et al. durchgeführte Studie hat den Zusammenhang zwischen Lymphknotengröße und Patientenoutcome untersucht, wobei sich gezeigt hat, dass die Größenverteilung der Lymphknoten bei Patienten mit und ohne Lymphknotenmetastasen fast gleich ausfiel. Während extrem kleine Lymphknoten nur in 2% der Fälle befallen waren und damit außer Acht gelassen werden können, traten 49% der Metastasen in Lymphknoten $< 5\text{mm}$ auf. Die sonst als verdächtig bezeichneten Lymphknoten $> 1\text{cm}$ waren nur in einem Viertel der Fälle befallen. Auch die Prognose schien in dieser Studie in der Gruppe mit vielen größeren Lymphknoten (LN5 high), hier definiert als ≥ 7 Lymphknoten $> 5\text{mm}$ besser auszufallen. Nur 3,3% dieser Gruppe verzeichneten Fernmetastasen, während es in der LN5 low Gruppe 16% waren. (3)

Neben den Lymphknoten selbst wird in den letzten Jahren auch der Tumor-Mikroumgebung mit den unterschiedlichen infiltrierenden Entzündungszellen mehr Beachtung geschenkt. Besonders die T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) spielen eine große Rolle in der antitumoralen Abwehrreaktion. (42) Bei verschiedenen

Tumoren, das KRK eingeschlossen, wurde bereits ein Zusammenhang zwischen der Dichte tumorinfiltrierender Lymphozyten (TIL) und der Prognose festgestellt. Viele Studien haben bereits gezeigt, dass besonders CD3+ und CD8+ T-Lymphozyten, sowie CD45RO+ Lymphozyten bei der intratumoralen Immunantwort eine große Rolle spielen (45-49). Diese Studie soll den Zusammenhang zwischen den intratumoralen CD3- und CD8-positiven Lymphozyten und der Prognose eines Patientenkollektivs mit Lymphknotennegativem Kolonkarzinom ermitteln und ihn auch mit dem bereits von Galon(47) und Pages(46, 50) entwickelten Immunscore (IS) in Verbindung bringen. Der Immunscore basiert auf der Untersuchung der Infiltrationsdichte zweier Arten von Lymphozyten im Tumorzentrum und in der Infiltrationszone (CD3/CD45RO, CD8/CD45RO, oder CD3/CD8). Pages et al. untersuchten 2009 den Zusammenhang zwischen der Infiltration mit CD45RO+ und CD8+ T-Zellen in Tumorzentrum (CT) und Infiltrationszone (IF) und dem Überleben von Kolonkarzinompatienten. Es ergaben sich hier die vier Kategorien CD45RO CT, CD45RO IF, CD8 CT und CD8 IF, in denen die Lymphozytenzahlen beurteilt wurden. Wurde ein bestimmter Grenzwert der Lymphozytenzahl in den vier Bereichen überschritten, wurde die Lymphozytenzahl als hoch (Hi) eingestuft. Für jede Überschreitung dieses Grenzwertes in einer Kategorie wurde ein Punkt vergeben. Pro Fall konnten also 0 bis 4 Punkte erreicht werden. Ein IS (0)-Hi besagt also eine geringe Infiltrationsdichte beider Zelltypen in beiden untersuchten Regionen. Nach diesen Punktzahlen wurden die Patienten in Pages' Studie in die vier Kategorien (0)-Hi, (1-2)-Hi, (3)-Hi und (4)-Hi eingeteilt und diese Kategorien mit dem Patientenüberleben verglichen. Die Kategorien (1)-Hi und (2)-Hi ähnelten sich stark in ihrer Auswirkung auf die Prognose der Patienten und wurden aus diesem Grund zusammengefasst. Nur 4,8% der Patienten mit einem hohen Immunscore von (4)-Hi erlitten in einem Zeitraum von 5 Jahren ein Rezidiv, während dies bei Patienten mit Immunscore (0)-Hi oder (1)-Hi in 72% der Fälle eintrat. Die 5-Jahres-Überlebensrate lag bei einem Immunscore von (4)-Hi bei 86,2%, während sie bei Patienten mit niedrigem Score nur bei 27,5% lag. (50) In dieser Studie wird dieser Immunscore in ähnlicher Weise für die CD3- und CD8- positiven Lymphozyten jeweils im Tumorzentrum und in der Infiltrationszone verwendet. Der Immunscore stellt in der Prognostik des Kolonkarzinoms eine Alternative bzw. Ergänzung zur klassischen TNM-Klassifikation dar. Bisher basieren sowohl die Planung der Therapie als auch die Einschätzung der Prognose noch immer weitgehend auf der traditionellen TNM-Klassifikation. Deren Schwachstelle liegt darin, sich ausschließlich auf den Tumor selbst zu fokussieren und die zelluläre Umgebung des Tumors und insbesondere die infiltrierenden Immunzellen

und damit die dem Krebs entgegengesetzte Abwehrreaktion des Körpers außer Acht zu lassen. 20-25% der Patienten, die nach TNM weder Lymphknoten- noch Fernmetastasen aufweisen, erleiden Rezidive, die bei alleiniger Verwendung der TNM Klassifikation nicht vorhersehbar sind. Durch Berücksichtigung des Immuninfiltrats könnten beispielsweise Patienten mit niedrigem Immunscore bereits als Risikopatienten identifiziert werden und möglicherweise auch in niedrigen TNM-Stadien von einer adjuvanten Therapie profitieren. (51, 52)

Neben den Auswirkungen des Infiltrats von CD3+ und CD8+ Lymphozyten auf die Prognose von Kolonkarzinompatienten soll diese Arbeit auch den Bezug zwischen den ITL und anderen leichter zu evaluierenden Kennzeichen der Immunantwort wie Lymphknotengröße und Lymphknotenausbeute darlegen.

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Die Studie basiert auf einem Patientenkollektiv von 170 Patienten mit lymphknotennegativem Kolonkarzinom, die zwischen Januar 2002 und November 2005 am Klinikum Augsburg operativ behandelt wurden. Zu dieser Zeit wurde in allen Fällen die konventionelle Lymphknotenpräparation durchgeführt. Ausschlusskriterien waren Notfallresektionen, beispielsweise im Falle eines akuten Darmverschlusses, oder einer schwer stillbaren Blutung. Fälle in denen die Resektionsränder nicht tumorfrei waren, wurden ebenfalls ausgeschlossen. Für die Überlebensanalyse stellen eine Überlebensdauer von unter zwei Monaten oder ein unvollständiges Follow-up weitere Ausschlusskriterien dar. Mithilfe des Tumorzentrums Augsburg, welches als Krebsregister des Region Schwaben fungiert, konnte das Follow-up durchgeführt werden. Dem Krebsregister werden seit Mitte der 80er Jahre sowohl von niedergelassenen Ärzten als auch von Klinikern alle Tumorneuerkrankungen gemeldet. Zudem werden alle wichtigen Daten der Tumorpatienten gesammelt und die individuellen Krankheitsverläufe dokumentiert. Zusätzlich waren die Patientenakten für ergänzende Informationen zu den teilnehmenden Patienten verfügbar. Die Studie wurde von der internen Ethikkommission des Klinikums Augsburg begutachtet und befürwortet.

2.2 Histopathologische Bearbeitung und Morphometrie

2.2.1 Histologisches Vorgehen

Die Herstellung eines Standardpräparats für die Ansicht unter dem Lichtmikroskop beginnt mit der Fixierung des Gewebes im möglichst ursprünglichen Zustand. Meist wird eine chemische Fixierung mittels Formalin angewandt. Dieses besteht aus 4-10% Formaldehyd in isoton gepufferter Kochsalzlösung. Zur Entwässerung wird das Präparat mit immer konzentrierterem Ethanol (50-100%), Xylol und anschließend Toluol behandelt. Anschließend erfolgt die Einbettung in flüssigem Paraffin, welches nach einiger Zeit hart wird. Daraus können dann dünne Paraffinschnitte gewonnen werden, die auf Objektträgern fixiert werden. Bevor eine Färbung stattfinden kann, muss das Paraffin aus den Schnitten gelöst und diese mittels Alkohol wieder hydriert werden. Die in dieser Studie eingesetzte Färbung, die zugleich auch die am häufigsten angewandte Färbung darstellt, ist die H&E Färbung. Sie besteht aus dem basischen Hämatoxylin und dem

sauren Eosin. Das Zytoplasma erscheint in dieser Färbung rot, während sich der Zellkern blau darstellt. (39, 53)

2.2.2 Histopathologische Bearbeitung

Die H&E gefärbten Schnitte der 170 Fälle hatten alle eine Dicke von 3-5 µm und wurden von zwei erfahrenen Pathologen (B.M und T.S) unabhängig voneinander beurteilt. Die Begutachtung erfolgte ohne jegliche Informationen über die Patientenfälle. Im Falle einer Uneinigkeit zwischen den beiden Pathologen prüften sie die Schnitte erneut und kamen zu einvernehmlichen Ergebnissen. Die Tumoren wurden bezüglich ihres pT-Stadiums, ihrer Histologie und ihrer lymphatischen -, venösen -, oder Fernmetastasierung kategorisiert. Zudem wurden die Tumorknospung und das Vorhandensein einer Crohn-ähnlichen Entzündungsreaktion evaluiert. Hierbei handelt es sich um peritumorale lymphoide Aggregate, die an das Entzündungsinfiltrat beim Morbus Crohn erinnern. Die Crohn-ähnliche Entzündung steht sowohl mit besseren Prognosen als auch mit einer MMR-Defizienz im Zusammenhang. (54, 55) Bezüglich der Lymphozyteninvasion wurde zwischen nicht vorhanden/schwach, mittel, und ausgeprägt unterschieden. Zudem wurde bezüglich der Art der Tumorinvasion in der Infiltrationszone zwischen einem infiltrierenden – und einem expandierenden Typ differenziert. Dies basiert auf der Klassifikation nach Jass et al, die bereits in den 1980er Jahren entwickelt wurde und neben dem Invasionstyp auch die peritumoralen Lymphozyten berücksichtigt. (56, 57)

Für diese Studie wurde die Anzahl der Lymphknoten bestimmt, deren Durchmesser mehr als 5mm betrug. Hierbei wurden drei Kategorien bezüglich der Lymphknotenzahl gebildet: LN5vl (very low), LN5l (low) und LN5h (high). LN5vl bedeutet, dass entweder keiner oder nur ein Lymphknoten größer als 5mm aufgefunden wurde. Bei der Klassifizierung LN5l liegen zwei bis fünf Lymphknoten vor. Konnten mehr als sechs Lymphknoten über 5mm aufgefunden werden, wird die Bezeichnung LN5h verwendet.

Angewandte Parameter:

LN5: alle LK mit einem Diameter > 5mm

LN5h: > 6 LK > 5mm

LN5l: 2-5 LK > 5mm

LN5vl: 0-1 LK > 5mm

2.3 Immunhistochemische Färbung

Das Ziel der Immunhistochemischen Färbung ist es, bestimmte Antigene im Gewebe nachzuweisen und farblich darzustellen. Dies geschieht durch eine Reaktion zwischen dem Antigen und spezifischen monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern. In einem zweiten Schritt werden die Antigen-Antikörper-Komplexe sichtbar gemacht. Hierbei unterscheidet man zwischen einer direkten und einer indirekten Färbemethode. Bei der direkten Färbung besitzt der primäre Antikörper bereits Markermoleküle wie z.B. fluoreszierende Farbstoffe oder Enzyme, die eine Farbreaktion ermöglichen. Bei der indirekten Farbreaktion werden sekundäre Antikörper verwendet, die gegen den primären Antikörper gerichtet sind. Die sekundären Antikörper können entweder selbst Markermoleküle tragen oder als Brückenmoleküle fungieren, sodass ein reaktionssteigernder Komplex mit einer höheren Anzahl an Markermolekülen und Enzymen entsteht. (39, 53)

In der klinischen Praxis hat die Immunhistochemie insbesondere in der Tumordiagnostik einen hohen Stellenwert. Tumorzellen können beispielsweise anhand von Antigenen identifiziert werden. Oberflächenproteine, die immunhistochemisch darstellbar sind, spielen bei vielen Tumoren eine entscheidende diagnostische und auch prognostische Rolle. Beim Mammakarzinom beispielsweise stellen der Östrogen-Rezeptors (ER) und das HER-2 Onkogen wichtige prognostische Marker dar, die zudem Einfluss auf die Therapie des Karzinoms haben. Der vascular endothelial growth factor (VEGF) und der epidermal growth factor receptor (EGFR) sind zwei der vielen möglichen prognostischen oder prädiktiven Marker, die beim Kolonkarzinom immunhistochemisch untersucht worden sind. Bisher sind jedoch noch keine verlässlichen Aussagen bezüglich der Prognose oder dem Ansprechen auf den VEGF-Antikörper Bevacizumab möglich. (58)

Die immunhistochemischen Färbungen für diese Studie wurden mit dem Ventana BenchMark Ultra system (Ventana–Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) durchgeführt. Vorab wurden die Schnitte mit der Aufbereitungslösung (Cell Conditioning Solution - CC1) (Ventana–Roche Diagnostics) vorbehandelt. Ziel der Immunhistochemischen Färbung war es nun die CD3+ und CD8+ T-Lymphozyten darzustellen, um sie später zählen zu können und die Beteiligung des Immunsystems im jeweiligen Präparat beurteilen zu können. Verwendet wurden monoklonale Antikörper gegen CD3 des Klons MRQ-39, sowie monoklonale Antikörper gegen CD8 des Klons SP16. Beide stammten vom Kaninchen und wurden in der Verdünnung 1:100 verwendet. Die Antikörper wurden von der Firma Cell Marque (Rocklin, CA) hergestellt und vom

Pharmaunternehmen Medac (Wedel) bereitgestellt. Zusätzlich wurden die DNA-Mismatch-Reparaturproteine MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 immunhistochemisch bestimmt, um ihre Funktionalität zu überprüfen und so indirekte Hinweise bezüglich der Stabilität der Mikrosatelliten (MSS oder MSI) zu erhalten. Für den Nachweis von MLH1 wurden monoklonale anti-MLH1 (M1) von der Maus verwendet. Die Antikörper gegen PMS2 stammten vom Klon EP51, die Antikörper gegen MSH2 vom Klon FE11 und die gegen MSH6 vom Klon EP49. Diese Antikörper konnten unverdünnt direkt verwendet werden („ready to use“) und stammten von Ventana-Roche Diagnostics (Mannheim, Germany).

2.4 Zählen der Lymphozyten und die digitale Bildanalyse mit ImageJ

Nach der immunhistochemischen Färbung standen von jedem Tumorpräparat neben den konventionell gefärbten Routinepräparaten, zwei immunhistochemisch gefärbte (CD3 und CD8) Schnitte zur Verfügung. Diese Schnitte wurden nun unter dem Lichtmikroskop BX 51 der Marke Olympus (Hamburg) in der 20-fachen Vergrößerung beurteilt. Um das Gesehene unter dem Mikroskop auch für die spätere Betrachtung und Analyse festzuhalten, wurden von jedem Schnitt digitale Bilder angefertigt. Verwendet wurde hierfür die mit dem Lichtmikroskop verbundene Digitalkamera Progress C3 der Firma Jenoptik (Jena). Bei den Schnitten lag der Fokus zum einen auf dem Tumorzentrum (CT) und zum anderen auf der Infiltrationszone (IF), die die Grenzzone zwischen Tumor und gesundem Gewebe darstellt. Somit ergaben sich vier Kategorien, in denen die Lymphozytenzahlen beurteilt wurden. CD3CT und CD3IF für Tumorzentrum und Infiltrationszone bezüglich der CD3-positiven Lymphozyten. CD8CT und CD8IF dementsprechend für die CD8-positiven Lymphozytenzahlen. Da aus jedem Präparat nur kleine Ausschnitte fotografiert und somit bezüglich der Lymphozytenzahl analysiert werden konnten, lag die höchste Priorität der Arbeit auf der sorgfältigen Betrachtung des gesamten Schnitts, um sowohl vom Tumorzentrum als auch von der Infiltrationszone Bilder zu erhalten, die das Ausmaß der Lymphozyteninfiltration möglichst genau repräsentieren. Um die Repräsentativität noch zu erhöhen, wurden von jedem Schnitt jeweils zwei Bilder aus Tumorzentrum und Infiltrationszone angefertigt und der Mittelwert der Lymphozytenzahl für die Analyse verwendet. Von jedem Präparat wurden also insgesamt acht Bilder gespeichert; d.h. jeweils vier pro Schnitt. (Abb. 4)

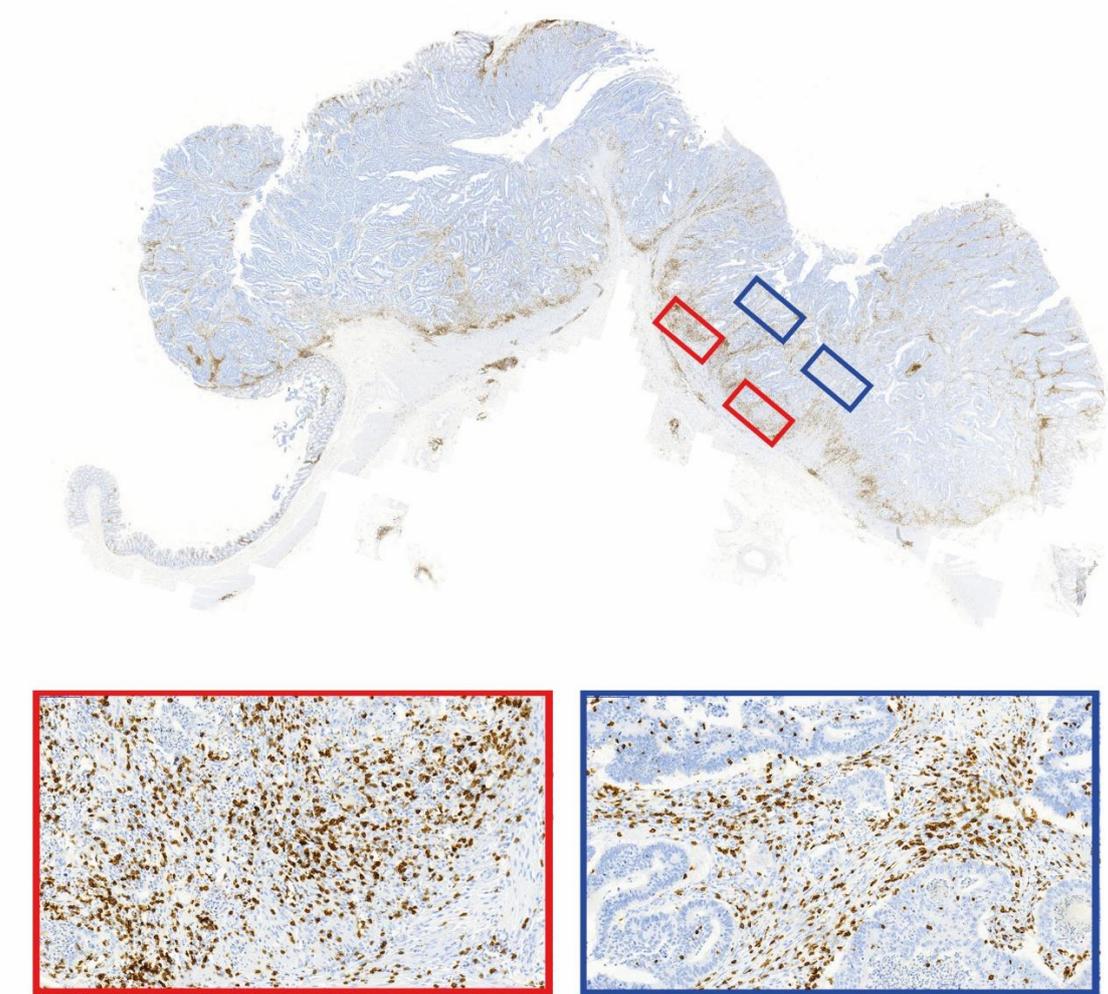


Abbildung 4: CD3 Immunfärbung eines Kolonkarzinompräparats zur Evaluierung der Infiltrationsdichte der T-Lymphozyten im Tumorzentrum und in der Infiltrationszone. Die Rechtecke markieren die für die digitale Lymphozytenzählung ausgewählten Bereiche.

Für das Zählen der Lymphozyten wurde das auf JAVA basierende Bildanalyse Programm ImageJ 1.48 (National Institutes of Health, Bethesda, MD) verwendet, welches als open source Software verfügbar ist. Neben der Bestimmung der Lymphozytendichte und deren Auswirkungen auf die Prognose beim Kolonkarzinom, war es ein weiteres Studienziel die Anwendbarkeit und Zuverlässigkeit dieses Programms zu prüfen und mit dem manuellen Zählen zu vergleichen.

Väyrynen et al. haben ImageJ in ihrer Studie von 2012 bereits beschrieben, analysiert und für die Studienzwecke der Zellzahlanalyse angepasst. Auch sie haben sich mit der T-Zell Infiltration beim Kolonkarzinom auseinandergesetzt und die CD3-positiven Zellen mit dem Programm bestimmt. Die Studie zeigte eine fast perfekte Korrelation zwischen dem Manuellen Zählen und der Bildanalyse (Pearson $r = 0,960-0,987$) (59)

Im Folgenden möchte ich die Anwendung der durch Väyrynen et al. modifizierten Version von ImageJ im Rahmen meiner Arbeit darlegen. Das Prinzip von ImageJ ist die Umwandlung des Fotos in ein maximal kontrastiertes schwarz-weiß Bild, das die digitale Auszählung der Lymphozyten erst ermöglicht. Direkt nach der Installation des Programmes war eine digitale Bildanalyse möglich. Die zuvor abgespeicherten digitalen Bilder aus dem Tumorzentrum oder der Infiltrationszone konnten mit ImageJ gesucht und aufgerufen werden. Vor Beginn der Bildanalyse konnten unter ‚Plugins‘ verschiedene Parameter eingestellt werden. Die Funktion ‚rolling ball background subtraction‘, korrigierte einen ungleichmäßig beleuchteten Hintergrund. Die Farbdekonvolution, also eine Schärfung des Bildes, wird ebenfalls vom Programm vorgegeben. Für den Gauß’schen Weichzeichner, der den Kontrast des Bildes verringern soll, wurde der Radius 3 verwendet. Als *Minimum cell circularity for Analyze Particles* wurde der Wert 0,200 verwendet. Indem man also ein Minimum der Kreisförmigkeit, festlegt, die für die Registrierung als Zelle erfüllt sein muss, kann das ungewollte Zählen von unförmigen Partikeln im Bild minimiert werden. (60) Beide Werte wurden beim Öffnen des Programms in den Einstellungen vorgeschlagen und auch von Väyrynen et al. empfohlen. (59) Eine wichtige Einstellung war die *Minimum cell size (pixels) for Analyze particles*, also die minimale Zellgröße, die noch vom Programm als Zelle erkannt und gezählt wird. Abgesehen von den im Folgenden genannten Ausnahmen, wurde der vom Programm vorgeschlagene Standardwert 800 benutzt. Die folgenden Screenshots zeigen beispielhaft die Einstellungen, die mit dem Programm ImageJ vorgenommen werden konnten. (Abb. 5; Abb. 6)

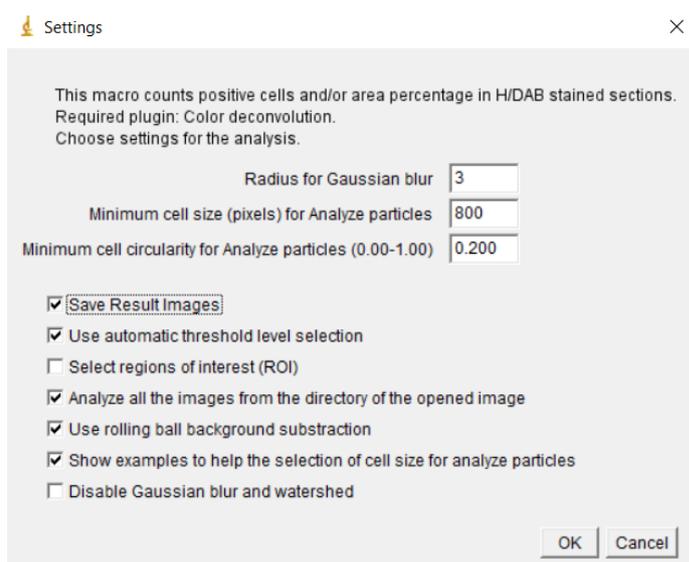


Abbildung 5: Mögliche Einstellungen der digitalen Bildanalyse mit ImageJ

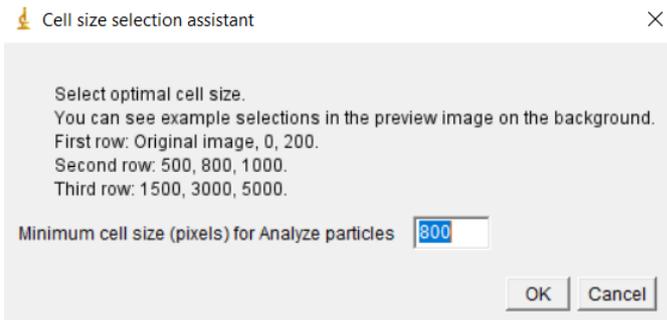


Abbildung 6: Selektion der minimalen Zellgröße, die von Image J erkannt werden soll

Nach der Einstellung der Parameter erstellte ImageJ von dem jeweiligen Bild ein sog. Overlay-Bild, wobei die erfassten Lymphozyten schwarz und der Rest des Bildes, um den Kontrast zu erhöhen, nur schwach angefärbt ist (Abb. 7)

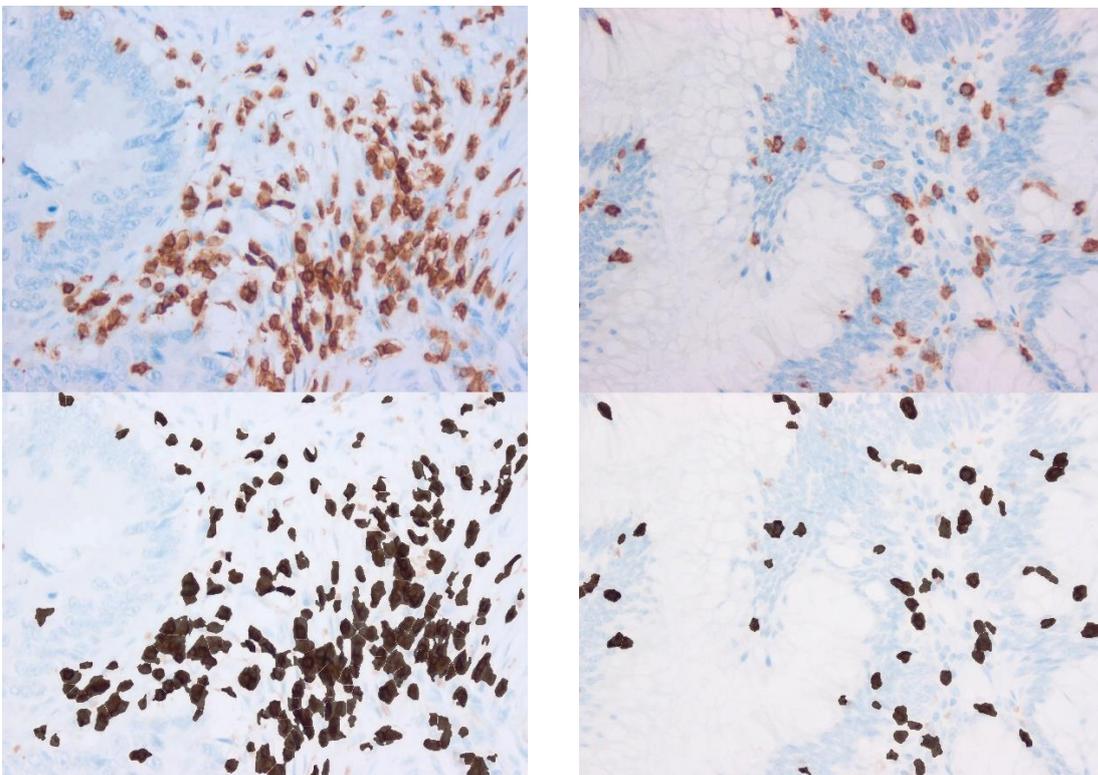


Abbildung 7: Oben: Ausschnitte eines Kolonkarzinoms im Tumorzentrum; Unten: die entsprechenden von ImageJ kreierten Overlays zur Lymphozytenzählung; (CD3 Immunfärbung, x20)

Im nächsten Schritt war es erforderlich, die Overlays bezüglich ihrer Plausibilität zu beurteilen. Lagen beispielsweise viele Zellen übereinander, wurde es für das Programm schwieriger, die Trennung zwischen den Zellen korrekt aufrecht zu erhalten. Wenn beim Betrachten der Overlay-Bilder ersichtlich wurde, dass zu viele oder zu wenig Zellen

erfasst wurden, musste der Wert angepasst und die Analyse wiederholt werden. Wurden offensichtlich zu wenige Zellen erfasst, wurde der Wert der *Minimum cell size* auf 600 verringert. Dies war bei 6% der Bilder der Fall. Wurden zu viele Zellen erfasst, was jedoch nur bei 0,5% der Bilder vorkam, wurde die *Minimum cell size* manuell auf den Wert 1000 erhöht. Ein weiterer wichtiger Wert, den es einzustellen galt, war das *upper threshold limit*. Bei 8 bit Graustufen Bildern, wie sie in den Overlays dieser Studie vorkommen, gibt es 256 Intensitätsgrade die man einem Pixel zuordnen kann. Ein Pixel mit der Intensität 0 ist schwarz, ein Pixel mit der Intensität 255 ist weiß, während den Werten dazwischen Graustufen zugeordnet werden können. Vereinfacht trennt das Thresholding die Pixel also in zwei Gruppen. Solche Pixel, die eine gewünschte Spanne der Farbintensität erfüllen und diejenigen, die das nicht tun. (61) (62) In diesem Fall geht es also darum, eine Schwelle festzulegen, die entscheidet ob ein Pixel zu einem schwarzen Lymphozyten oder zum weißen Hintergrund zählen soll. Das *upper threshold limit* stellte den am schwierigsten einzustellenden Parameter dar. Für jedes Bild schlug ImageJ einen Schwellenwert vor. Um die Bildbearbeitung jedoch so einheitlich wie möglich zu gestalten, wurde der Wert 195 als Standardwert gewählt. Zum einen pendelten die vorgeschlagenen Schwellenwerte bei den verschiedenen Bildern um diesen Wert, zum anderen repräsentierten die Overlays bei diesem Schwellenwert das Lyphozytenmuster am genauesten. (Abb. 8)

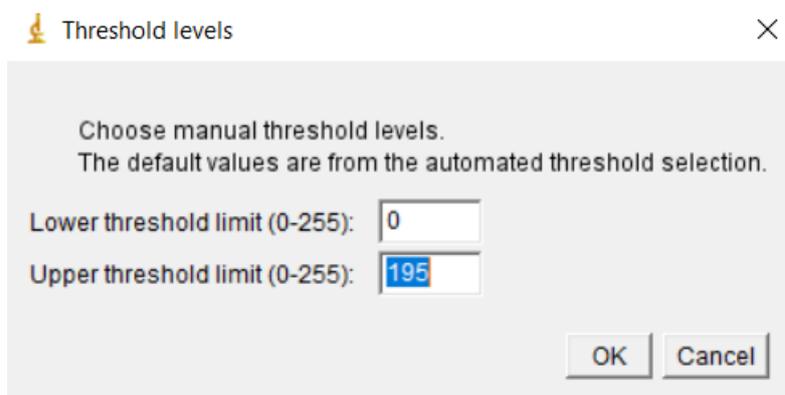


Abbildung 8: Einstellung der Schwellenwerte

Im Vorfeld wurden mehrere Schwellenwerte an einer Auswahl der Bilder getestet und die Ergebnisse verglichen, um den idealen Schwellenwert zu finden. Wie bei der *Minimum cell size* gab es auch hier einige Fälle, bei denen mit dem Standardschwellenwert keine plausiblen Ergebnisse zu erzielen waren. In 2,44% der Bilder musste demnach der Schwellenwert auf den vom Programm vorgeschlagenen Wert angepasst werden. In 71%

dieser geänderten Fälle kam der Schwellenwert 162 zur Anwendung. Bei 9,8% aller Bilder ließen sich auch durch das Ändern der Parameter keine plausiblen Werte erzielen, woraufhin in diesen Fällen auf das manuelle Zählen zurückgegriffen werden musste, um die größtmögliche Genauigkeit bezüglich der Lymphozytenzahlen garantieren zu können. Bei insgesamt 18% aller Bilder wurden Alterationen an den Standardwerten vorgenommen oder Lymphozyten manuell gezählt.

Die Tabelle 4 zeigt einen Ausschnitt der angelegten Excel Tabelle mit den Lymphozytenzahlen der acht Bilder, die pro Fall angefertigt wurden. Aus den beiden Bildern einer Kategorie, z.B. CD3CT wurde dann noch der Mittelwert gebildet. Die Fläche eines Bildes betrug 0,09 mm², woraus die im Verlauf der Arbeit verwendete Lymphozytendichte pro mm² errechnet wurde.

1	Patientennr.	CD3 CT1	CD3 CT2	CD3 IF1	CD3 IF2	CD8 CT1	CD8 CT2	CD8 IF1	CD8 IF2
2	10253_04	197	146	158	262	106	54	61	96
3	1031_05	98	73	236	174	36	38	78	63
4	10552_04	53	17	145	169	31	25	57	68
5	10600_03	48	57	85	165	9	21	45	69
6	10680_05	125	69	219	174	35	20	43	77
7	10728_04	90	93	105	50	19	21	36	18
8	10881_04	205	195	238	212	56	130	134	98
9	11071_04	108	146	265	344	59	46	167	162
10	11091_04	40	42	73	83	32	14	19	31
11	11329_04	6	14	80	94	1	3	16	5
12	11348_05	33	35	70	27	7	3	11	6
13	11398_04	77	71	158	159	56	69	69	43
14	11526_05	36	36	170	184	32	18	95	123
15	11711_03	128	105	193	224	72	79	119	124
16	11724_05	91	87	122	133	15	17	26	16
17	11820_03	110	109	140	108	41	42	67	74

Tabelle 4: Ausschnitt der angelegten Exceltabelle mit den eingetragenen Werten der Lymphozytenzahlen der 8 Kategorien CD3CT1, CD3CT2, CD3IF1, CD3IF2, CD8CT1, CD8CT2, CD8IF1, CD8IF2

Um die Genauigkeit der digitalen Bildanalyse zu überprüfen, wurden die Ergebnisse von ImageJ mit dem manuellen Auszählen der Lymphozyten verglichen. Die Zählung der Lymphozyten wurde von mir sowie zwei erfahrenen Fachärzten für Pathologie unabhängig voneinander, anhand von 12 qualitativ hochwertigen Ausdrucken der digitalen Bilder durchgeführt. Es wurden hierbei Bilder von beiden Immunfärbungen verwendet. Beim manuellen Zählen wurden die bereits erfassten Zellen auf dem Papier abgestrichen, um keine Zellen zu vergessen oder doppelt zu zählen. Sowohl die

Unterschiede zwischen den Untersuchern untereinander als auch die zwischen dem manuellen Zählen und der digitalen Analyse wurden hierbei erfasst.

Zusätzlich wurde der von Galon und Pagès entwickelten Immunscore auf diese Studie angewandt und demnach die Fälle gemäß der Infiltrationsdichte der CD3+ und CD8+ Lymphozyten in Tumorzentrum und Infiltrationszone kategorisiert. Ein Score zwischen 0 und 4 ergab sich dadurch, dass jedes Mal ein Punkt zum Immunscore hinzugefügt wurde, wenn ein Grenzwert bezüglich der mit ImageJ ermittelten Zellzahl in einer der vier Kategorien CD3CT, CD3IF, CD8CT und CD8IF überschritten wurde. Konnte beispielsweise in zwei der vier Kategorien eine hohe Infiltrationsdichte festgestellt werden, ergab sich ein Immunscore von 2 (IM2).

2.5 Statistik

Um die verschiedenen Parametern zu vergleichen, wurde die lineare Regressionsanalyse verwendet. Für den Vergleich von normalverteilten, metrischen Variablen wurde der „Student-t-Test“ verwendet. War keine Normalverteilung gegeben, kam der „Mann-Whitney Rank Sum Test“ zur Anwendung. Der Vergleich von mehr als zwei Stichproben erfolgte mit dem Friedmann-Test oder dem Kruskal-Wallis Test. Dichotome Daten wurden mit dem X^2 Test gegenübergestellt. Die optimalen Schwellenwerte für die Überlebensanalyse ermittelten wir mit einer Receiver Operating Characteristic- (ROC)-Analyse. Die Endpunkte waren hierbei der Krebsbedingte Tod und/ oder das Auftreten von Fernmetastasen. Die Überlebensraten wurden mithilfe von Kaplan-Meier Kurven und dem log-Rank-Test verglichen. Die Mittelwerte werden mit \pm einer Standardabweichung angegeben. Um die mittlere Follow-up Zeit zu ermitteln, wurde die Methode von Schemper und Smith verwendet. (63) Bei der multivariaten Analyse kam die schrittweise Vorwärtsregression zur Anwendung. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Alle Berechnungen wurden mit dem Sigma Plot 13.0 Softwarepaket (Systat, Richmond, VA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Patienten und Follow-up

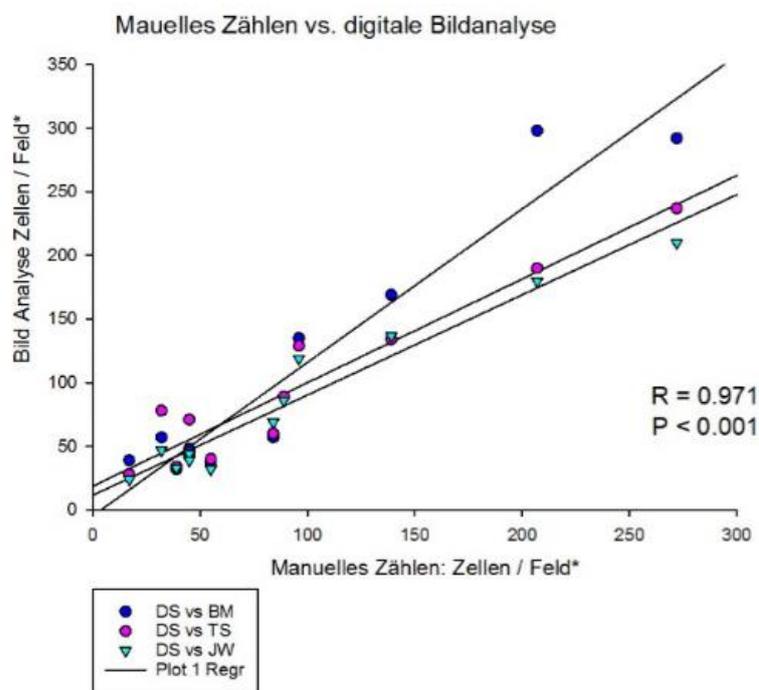
Insgesamt wurden 170 Patienten mit lymphknotennegativem Kolonkarzinom in die Studie eingeschlossen. Alle Patienten waren im Zeitraum zwischen Januar 2002 und November 2005 am Klinikum Augsburg operiert worden. Bei 146 der ursprünglich 170 Fälle wurden in einem Follow-up die Überlebensraten analysiert. 24 Fälle erfüllten die Ausschlusskriterien und wurden dementsprechend vom Follow-up ausgeschlossen. Im Patientenkollektiv lag das Verhältnis zwischen männlichen und weiblichen Patienten bei 1:0,85. Das durchschnittliche Alter lag bei 71 Jahren, wobei 4 Patienten unter 50 Jahre alt waren. 8% der Patienten hatten eine adjuvante Chemotherapie erhalten. . 40% der untersuchten Tumoren befanden sich im pT Stadium T1/T2 und 60% im Stadium T3/T4. Des Weiteren wurden die histologischen Untergruppen des Kolonkarzinoms untersucht, wobei 82% eine klassische Histologie aufwiesen. 13% waren muzinöse - und 3% medulläre Adenokarzinome. Die restlichen 2% hatten andere Differenzierungen. Eine Invasion des lymphatischen und des venösen Systems konnte in jeweils 3% festgestellt werden, während bei 8% der Fälle bereits Fernmetastasen vorlagen. Weitere klinikopathologische Daten bezüglich des Patientenkollektivs und der Klassifizierung der vorkommenden Tumoren sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Die durchschnittliche und mediane Follow-up Zeit lag bei 56 Monaten beziehungsweise 54 Monaten. Das 95%-Konfidenzintervall liegt zwischen 49 und 59 Monaten Follow-up.

Kollektiv für die Überlebensanalyse (n=146)									
	LN5 Analyse					IM Analyse			
	Komplettes Kollektiv (n=170)	LN5vl (n=53)	LN5l (n=58)	LN5h (n=35)	p-Wert	IM 0/1 (n=73)	IM 2 (n=46)	IM 3 (n=27)	p-Wert
Geschlecht, M:F	1:0.85	1:0.71	1:0.66	1:1.19	.353	1:0.66	1:0.92	1:0.93	.559
Alter, Durchschnitt +- SA	71 ± 10	72± 8	71±9	66±12	.018	69±10	71±9	73±10	.553
Alter <50 Jahren	4(2)	0	1(2)	3(9)	NC	3(4)	1(2)	0	NC
Insuffiziente LK-Ausbeute (<12)	46(27)	24(45)	10(17)	2(6)	<.001	22(30)	6(13)	8(30)	.087
LK-Ausbeute, Durchschnitt +- SA	14±5	12±5	14±4	17±4	<.001	13±5	15±5	15±4	.224
Konventionelle Histologie	139(82)	46(87)	51(88)	27(77)		60(82)	40(87)	24(89)	
Muzinöse Differenzierung	22(13)	7(13)	5(9)	5(14)		11(15)	5(11)	1(4)	
Medulläre Differenzierung	5(3)	0	1(2)	2(6)		1(1)	0	2(7)	
Andere Differenzierung	4(2)	0	1(2)	1(3)	.331	1(1)	1(2)	1(4)	.663
Expansiver Typ	152(89)	51(96)	50(86)	33(94)		67(92)	42(91)	25(93)	
Infiltrativer Typ	18(11)	2(4)	8(14)	2(6)	.131	6(8)	4(9)	2(7)	.981
High-grade Tumor Knospung	33(19)	7(13)	13(22)	5(14)	<.001	10(14)	10(22)	5(19)	.579
pT1/2	68(40)	29(55)	23(40)	12(34)		28(38)	23(50)	13(48)	
pT3/4	102(60)	24(45)	35(60)	23(66)	<.001	45(62)	23(50)	14(52)	.406
Low grade	141(83)	46(87)	41(71)	29(83)		60(82)	32(70)	24(89)	
High grade	29(17)	7(13)	17(29)	6(17)	.094	13(18)	14(30)	3(11)	.102
Lymphgefäßinvasion	5(3)	1(2)	2(3)	0	NC	3(4)	0	0	NC
Venöse Invasion	5(3)	2(4)	1(2)	1(3)	NC	3(4)	0	1(4)	NC
Fernmetastasen	13(8)	6(11)	6(10)	0	.125	10(14)	2(4)	0	.037
Rechtsseitiger Tumor	97(57)	16(30)	44(76)	32(91)		39(53)	33(72)	7(26)	
Linksseitiger Tumor	73(43)	37(70)	14(24)	3(3)	<.001	34(47)	13(28)	20(74)	<.001
MMR-P	138(81)	49(92)	45(78)	28(80)		66(90)	35(76)	22(81)	
MMR-D	32(19)	4(8)	13(22)	7(20)	.087	7(10)	11(14)	5(19)	.103
Adjuvante Chemotherapie	14(8)	7(13)	4(7)	2(6)	.380	10(14)	2(4)	1(4)	.126

3.2 Zählen der intratumoralen Lymphozyten und Digitale Bildanalyse

Zur Bestimmung der Anzahl intratumoraler Lymphozyten wurde die open-source Software ImageJ verwendet, deren Anwendbarkeit und Zuverlässigkeit im Rahmen dieser Arbeit zudem evaluiert werden soll. In 81,8% der Bilder war die digitale Bildanalyse mit Standardwerten problemlos möglich. Die beiden wichtigsten Parameter bei der Einstellung waren, wie oben bereits erwähnt, die *Minimum cell size for Analyse* mit dem Standardwert 800 und das *Upper threshold limit* mit dem eingestellten Standardwert von 195. Bei 18,2% der Bilder mussten Änderungen vorgenommen werden. 8,4% der Bilder konnten durch die oben beschriebenen Anpassungen der Einstellungsparameter durch ImageJ dann korrekt analysiert werden. Bei 9,8% der Bilder wurden die Lymphozyten

manuell gezählt. Zudem sollte die Exaktheit der von ImageJ ermittelten Zellzahlen überprüft werden, indem bei 12 Bildern die Lymphozyten auch manuell gezählt und die Werte miteinander verglichen wurden. Das Zählen wurde von drei unabhängigen Untersuchern anhand von 12 Bildern von drei Patienten durchgeführt. Hierbei waren von allen vier Kategorien (CD3CT, CD3IF, CD8CT, und CD8IF) Beispiele vertreten. Die Zahlen der digitalen Bildanalyse wurden sowohl den individuellen Ergebnissen (Abb. 9) als auch den Durchschnittswerten der drei Untersucher (Abb. 10) gegenübergestellt. Die Übereinstimmung zwischen dem manuellen Zählen und der digitalen Bildanalyse war sehr groß. ($R = 0,971$; $p < 0,001$), wodurch die verlässliche Anwendbarkeit von ImageJ dargelegt werden konnte.



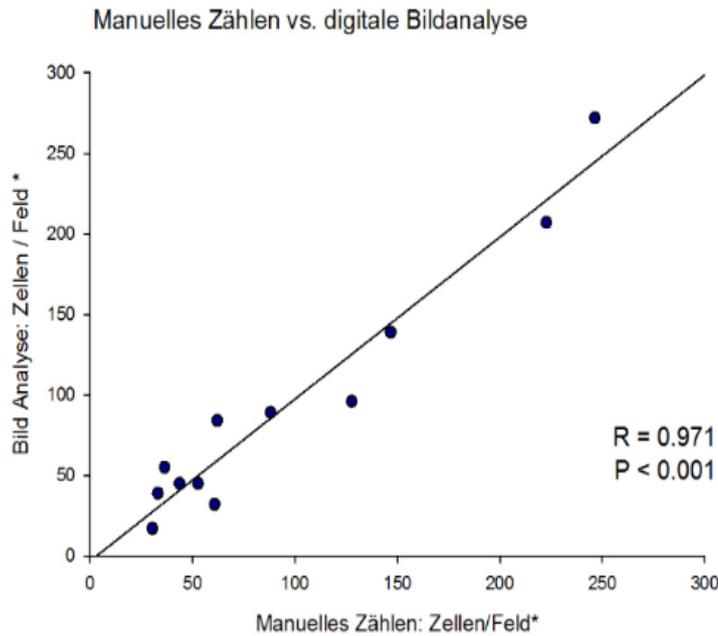


Abbildung 10: Lineare Regression: Manuellen Zählen vs. Digitale Bildanalyse; Beim manuellen Zählen wurde der Durchschnittswert der Ergebnisse der drei Untersucher verwendet

Bei der Auswahl der 12 Bilder wurde darauf geachtet, sowohl Bilder mit relativ wenig Lymphozyten, als auch solche mit sehr vielen zu beurteilen. Somit ergaben sich beim manuellen Zählen durchschnittlich Lymphozytenzahlen zwischen 30 und 246. Beim Betrachten der Unterschiede zwischen den Untersuchern ließen sich Standardabweichungen vom Durchschnittswert zwischen einem und 65 Lymphozyten feststellen.

3.3 Infiltrationsdichte intratumoraler Lymphozyten (ITL)

Nach der digitalen Erfassung der CD3+ und CD8+ Lymphozyten im Tumorzentrum und in der Infiltrationszone galt es, die Lymphozytendichte zu bestimmen und die Werte miteinander zu vergleichen. Für jedes Kompartiment wurden zunächst die Mittelwerte der Lymphozytendichte gebildet sowie ihre Standardabweichung bestimmt. Für CD3CT, CD3IF, CD8CT, und CD8IF lag die Lymphozytendichte jeweils bei 1.110 ± 757 , 1.680 ± 858 , 671 ± 815 , und 672 ± 495 Zellen/mm² (Abb. 11)

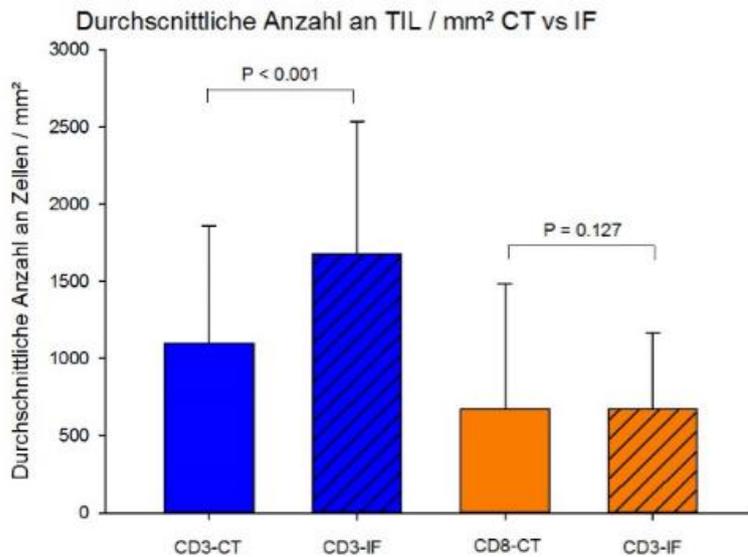


Abbildung 11: Durchschnittliche Anzahl an CD3+ und CD8+ Lymphozyten jeweils in Tumorzentrum (CT) und Infiltrationszone (IF)

Allgemein wird deutlich, dass die Zahl der CD3-positiven Lymphozyten höher ist als die der CD8-positiven. Dies ist natürlich auch zu erwarten, da der CD3 Rezeptor auf allen T-Lymphozyten zu finden ist, während der CD8-Rezeptor nur auf den zytotoxischen T-Zellen vorkommt. Die Dichte CD8-positiver Lymphozyten ist im Tumorzentrum und in der Infiltrationszone nahezu identisch, während sich die CD3-positiven Lymphozyten stärker in der Infiltrationszone konzentrieren.

Beim Vergleich von Tumorzentrum und Infiltrationszone bezogen auf die CD3-positiven Lymphozyten bestand die Korrelation $R = 0,688$ ($p < 0,001$). (Abb. 12) Beim Betrachten der CD8-positiven Lymphozyten ergab sich bezüglich CT vs. IF die Korrelation $R = 0,612$. ($p < 0,001$). (Abb. 13)

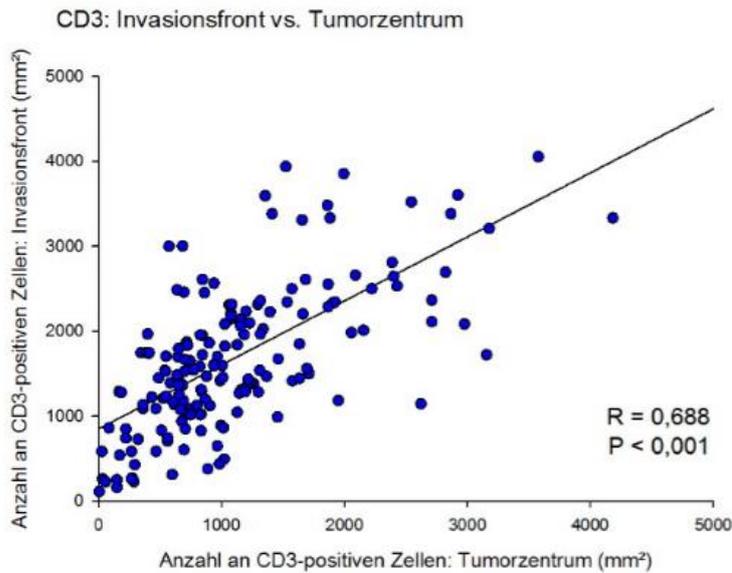


Abbildung 12: Vergleich der Infiltrationsdichte CD3+ Lymphozyten im Tumorzentrum und in der Infiltrationszone

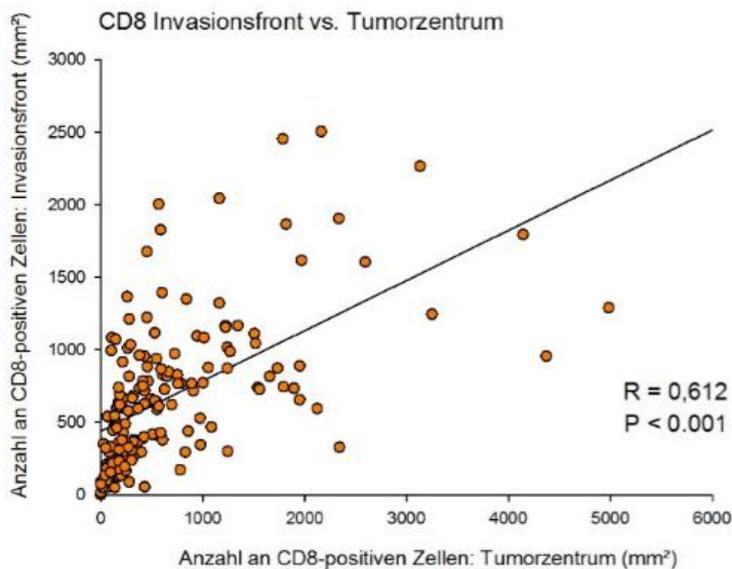


Abbildung 13: Vergleich der Infiltrationsdichte CD8+ Lymphozyten im Tumorzentrum und in der Infiltrationszone

Eine etwas geringere, aber dennoch positive Korrelation $R = 0,536$ ($p < 0,001$) fiel bei der Gegenüberstellung von CD3 vs. CD8 bezogen auf das Tumorzentrum auf. Beim Blick auf die Infiltrationszone ergab sich die Korrelation $R = 0,620$ ($p < 0,001$) beim Vergleich CD3 vs. CD8. Bei allen Kombinationen waren die Korrelationen demnach stark signifikant.

3.4 Intratumorale Lymphozyten vs. qualitative ITL Einschätzung und Crohn-ähnliche Entzündung

Vor der immunhistochemischen Quantifizierung intratumoraler Lymphozyten erfolgte eine semiquantitative Beurteilung der lymphozytären Reaktion anhand von konventionell H&E gefärbten Schnitten. Die so erhobenen Daten wurden mit den Ergebnissen der digitalen, immunhistochemie-basierten Auswertung verglichen (Abb. 14).

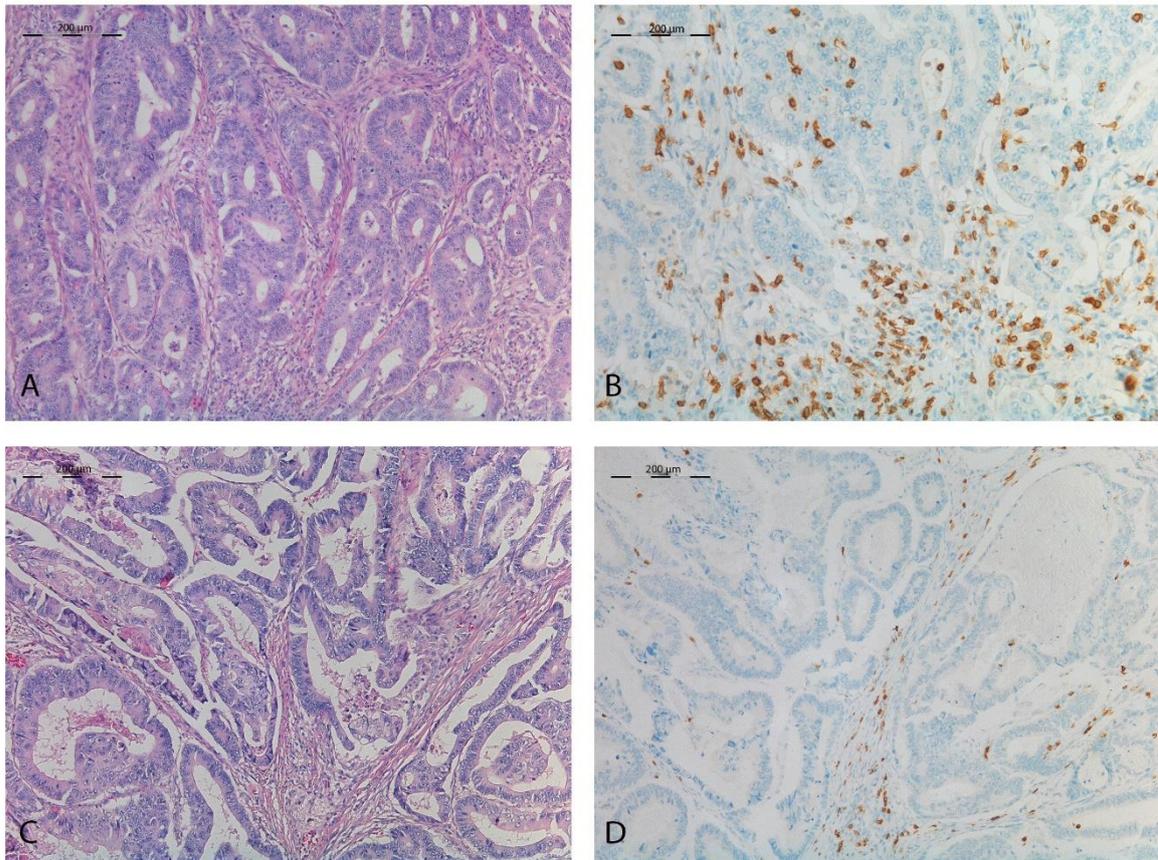


Abbildung 14: Kolonkarzinom mit stark ausgeprägter Lymphozyteninfiltration (A, H&E, x 100); starke Infiltration mit T-Lymphozyten im Stroma und auf dem neoplastischen Epithel (B, CD3 Immunfärbung, x 100); Kolonkarzinom mit schwacher intratumoraler Lymphozyteninfiltration (C, H&E, x 100); vereinzelte T-Lymphozyten im Stroma und keine Zellen auf dem neoplastischen Epithel (D, CD3 Immunfärbung, x 100)

Hierbei konnte eine signifikante aber dennoch schwächere Korrelation in allen vier Kategorien festgestellt werden. (CD3CT: $R = 0,291$; CD3IF: $R = 0,305$; CD8CT: $R = 0,196$; CD8IF: $R = 0,267$) Wurde in der H&E-Färbung eine Crohn-ähnliche Entzündungsreaktion festgestellt, fielen die Lymphozytenzahlen in allen Kategorien höher aus. Besonders in den Kategorien CD3IF und CD8CT konnten hochsignifikante Unterschiede verzeichnet werden. (CD3CT: 1.001 ± 708 vs. 1.229 ± 804 , $p < 0,059$; CD3IF: 1.530 ± 871 vs. 1.870 ± 807 , $p < 0,008$; CD8CT: 580 ± 768 vs. 790 ± 865 , $p < 0,009$; CD8IF: 630 ± 485 vs. 728 ± 506 , $p < 0,135$) (Abb. 15)

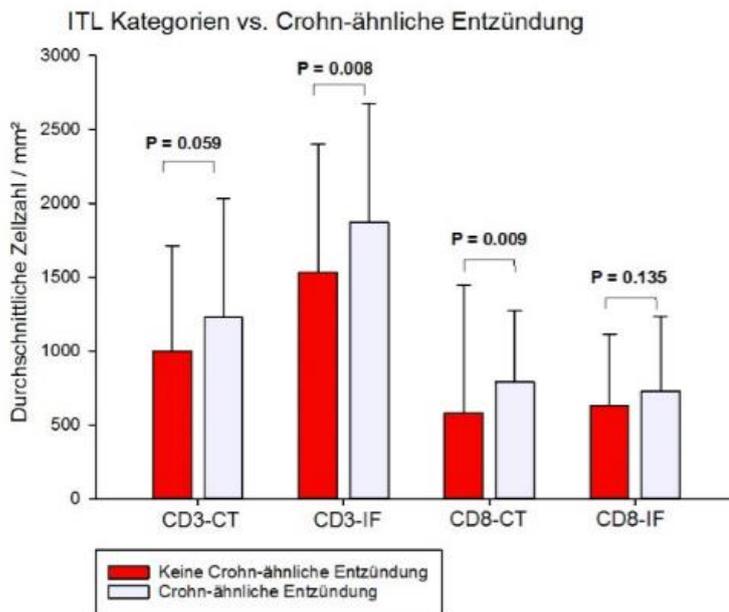


Abbildung 15: Durchschnittliche Anzahl intratumoraler Lymphozyten (ITL) bei Fällen mit und ohne Crohn-ähnlicher Entzündung

3.5 Intratumorale Lymphozyten vs. Lymphknotenausbeute und LN5

Am Beispiel der Dichte intratumoraler T-Lymphozyten soll die Bedeutung des Immunsystems beim Kolonkarzinom in dieser Studie aufgezeigt werden. Ein aktives Immunsystem äußert sich, gemäß der Hypothese dieser Studie, mikroskopisch in hohen Lymphozytenzahlen bzw. generell in einem ausgeprägten Entzündungsinfiltrat und makroskopisch im Auftreten von besonders großen Lymphknoten. Zudem soll gezeigt werden, dass das Immunsystem die konfundierende Variable zwischen einem positivem Outcome und der Untersuchung einer großen Zahl an Lymphknoten darstellt. Ein weiteres Ziel der Arbeit ist es daher auch die Verbindung zwischen Lymphknotengröße, ihrer Ausbeute und der Lymphozyteninfiltration herzustellen.

Es hat sich gezeigt, dass den Erwartungen dieser Studie entsprechend, die Lymphozytendichte in Tumoren, bei denen mehr als 12 Lymphknoten untersucht wurden (suffiziente Lymphknotenausbeute = LN suff), bedeutend höher war als in solchen Tumoren, bei denen diese Marke nicht erreicht wurde (insuffiziente Lymphknotenausbeute = LN insuff). Besonders ausgeprägt war diese Beobachtung im Tumorzentrum. (CD3CT: 922 ± 631 vs. 1.166 ± 791 , $p = 0,037$; CD3IF: 1.477 ± 733 vs. 1.753 ± 891 , $p = 0,090$; CD8CT: 549 ± 772 vs. 717 ± 829 , $p = 0,042$; CD8IF: 533 ± 329 vs. 725 ± 536 , $p = 0,060$) (Abb.16)

Intratumorale T-Lymphozyten vs. gesamte Lymphknotenanzahl

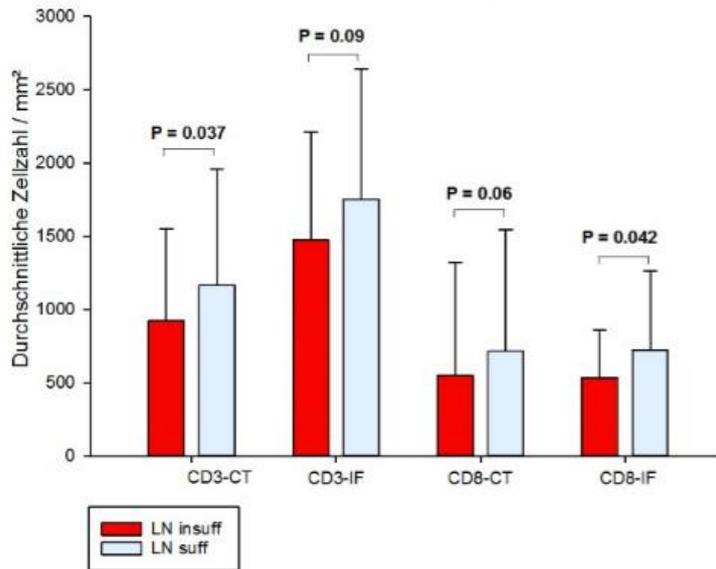


Abbildung 16: Lymphozytendichte bei suffizienter und insuffizienter Lymphknotenausbeute

Anschließend wurde der Zusammenhang zwischen der Lymphozytendichte und den Kategorien LN5vl LN5l und LN5 betrachtet. Es stellte sich heraus, dass in den zu LN5h gehörigen Fällen, also bei einer Ausbeute von 6 oder mehr Lymphknoten über 5mm, auch die Lymphozytenzahlen höher waren, als in der Gruppe LN5l mit 2-5 Lymphknoten > 5mm. Hier war die Lymphozytendichte wiederum höher als in den Fällen mit höchstens einem Lymphknoten > 5mm (LN5vl). Dies ließ sich in allen 4 Kategorien (CD3IF, CD3CT, CD8IF, CD8CT) beobachten. Lediglich bei CD3IF waren in der Kategorie LN5l geringfügig mehr Lymphozyten vorhanden als in der Kategorie LN5h (1.832 ± 780 vs. 1.796 ± 912). Signifikant waren die Unterschiede nur in den CD3-Kategorien (CD3CT: $p = 0,010$; CD3IF: $p = 0,015$). Trotz p-Werten von $p = 0,183$ und $p = 0,237$ in den CD8-Kategorien ging die Tendenz in die identische Richtung. (Abb. 17; Tabelle 6)

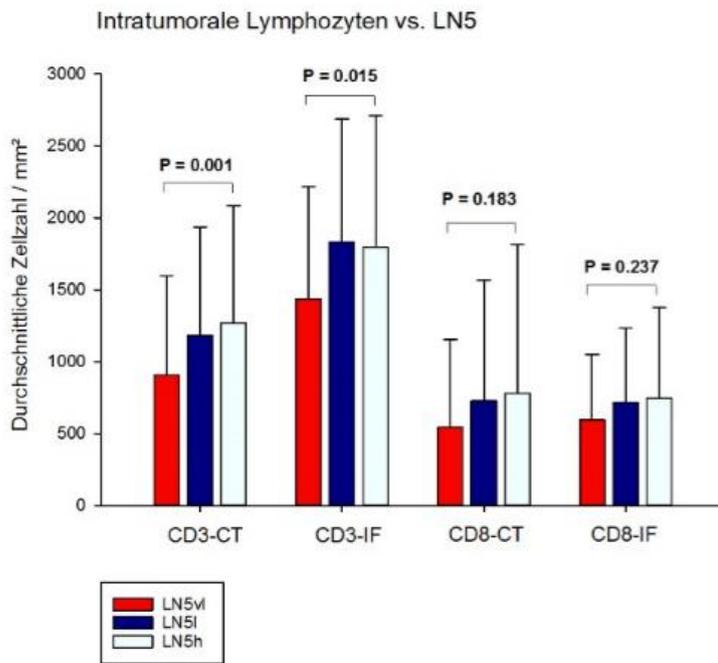


Abbildung 17: Intratumorale Lymphozyten im Vergleich zur Lymphknotenausbeute

Kategorie	LN5 very low (n = 63)	LN5 low (n = 69)	LN5 High (n = 38)	p-Wert
CD3CT	907 ± 692	1.183 ± 857	1.270 ± 814	0,010
CD3IF	1.438 ± 755	1.832 ± 780	1.796 ± 912	0,015
CD8CT	544 ± 609	728 ± 839	781 ± 1.037	0,183
CD8IF	594 ± 455	719 ± 514	743 ± 632	0,237

Tabelle 5: Intratumorale T-Lymphozytendichte in verschiedenen LN5-Kategorien (Durchschnitt ± Standardabweichung, mm²)

Diese Ergebnisse untermauern die Hypothese, dass eine starke Immunantwort, hier durch eine hohe Lymphozytendichte belegt, der Grund für eine höhere Anzahl an vergrößerten Lymphknoten und damit auch für die höhere Lymphknotenausbeute ist.

3.6 MMR-Status vs. ITL und LN5

Tumoren mit Mikrosatelliteninstabilität sind dafür bekannt, eine besonders starke Immunantwort hervorzurufen. (64) Wie oben beschrieben, wurden im Vorfeld die Mismatch-repair Proteine MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 mit Antikörpern immunhistochemisch nachgewiesen und somit ein Defekt im DNA-Reparatursystem

aufgezeigt. In dieser Arbeit sollte auch der Zusammenhang zwischen MMR-Status, LN5-Anzahl und Lymphozyteninfiltration untersucht werden. Die durchschnittliche Zahl an ITL fiel in den Fällen mit defizitärem DNA-Reparatursystem in allen vier Kategorien (CD3CT, CD3IF, CD8CT und CD8IF) signifikant höher aus als in der Vergleichsgruppe. (CD3CT: 1.435 ± 931 vs. 1.020 ± 694 , $p = 0,013$; CD3IF: 2.034 ± 992 vs. 1.597 ± 808 , $p = 0,021$; CD8CT: 1.106 ± 1.106 vs. 564 ± 698 , $p < 0,001$; CD8IF: 908 ± 607 vs. 615 ± 450 , $p = 0,007$) (Abb. 18)

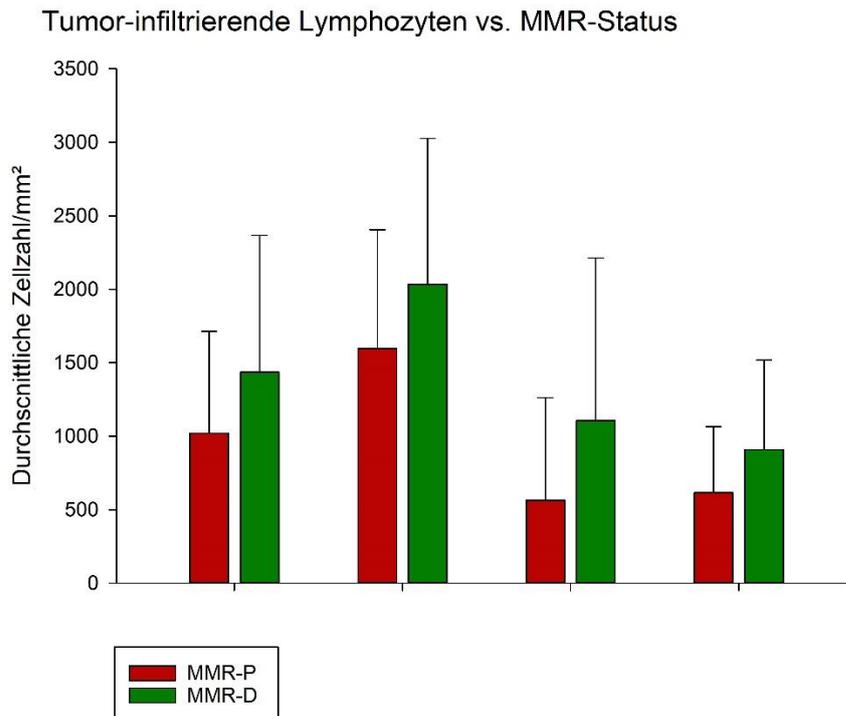


Abbildung 18: Dichte der TIL verglichen mit dem MMR-Status (MMR-P = MMR- Proficient; MMR-D = MMR-Deficient)

Die Anzahl der LN5 lag in der Gruppe mit defektem MMR-System mit 5 ± 3 im Vergleich zu 3 ± 4 ebenfalls höher. Der p-Wert lag hier jedoch bei 0,137. (Abb. 19)

Durchschnittliche Anzahl an LN5: MMR-D vs. MMR-P

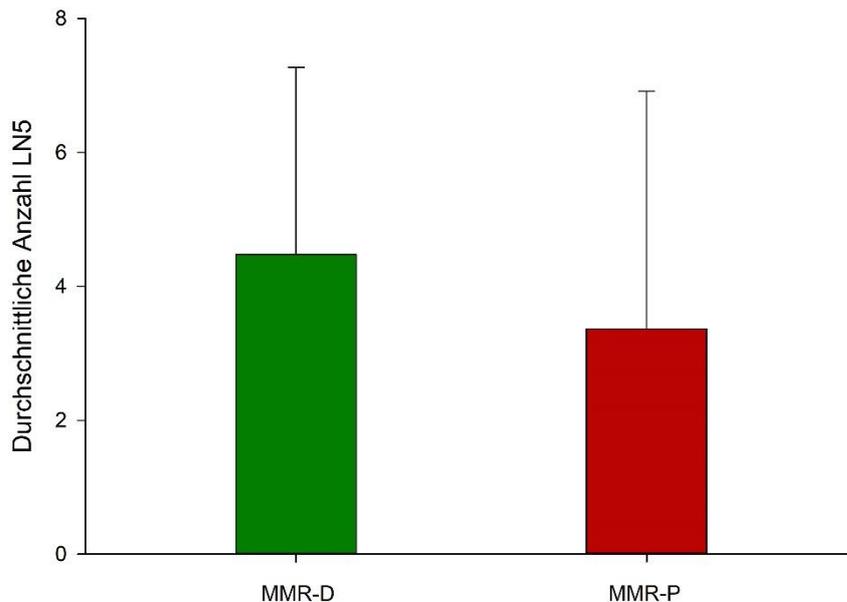


Abbildung 19: Durchschnittliche Anzahl der LN5 verglichen mit dem MMR-Status Status (MMR-P = MMR-Proficient; MMR-D = MMR-Deficient)

32, dh. 19% der hier eingeschlossenen Fälle waren MMR-defizient. Während in der Kategorie der LN5vl nur 8% eine Mikrosatelliteninstabilität aufwiesen, war dies in der LN5l-Kategorie bei 22% und in der LN5h-Kategorie bei 20% der Fall. Der p-Wert lag hier bei 0,087. Diese Zahlen bestätigen, sowohl anhand der Lymphozytendichte als auch anhand der Anzahl vergrößerter Lymphknoten, eine stärkere Beteiligung des Immunsystems beim Kolonkarzinom mit Mikrosatelliteninstabilität.

3.7 Überlebensanalyse

Der für die klinische Praxis und insbesondere für Kolonkarzinompatienten bedeutendste Aspekt der Studie ist der Zusammenhang des Entzündungsinfiltrats mit der Prognose und letztendlich dem Überleben der Patienten. Eine hohe Anzahl an vergrößerten Lymphozyten (LN5), besonders bei einer Ausbeute von 6 oder mehr Lymphknoten (LN5h), wirkte sich im Trend positiv auf das Überleben der Patienten aus. ($p = 0,228$) Die durchschnittliche Überlebenszeit lag in dieser Gruppe bei 109 Monaten (95%-Konfidenzintervall: 97-121). Bei einer Klassifizierung als LN5vl oder LN5l überlebten die Patienten durchschnittlich jeweils 103 Monate (95%-Konfidenzintervall: 90-116) und 102 Monate. (95%-Konfidenzintervall: 91-112) (Abb. 20)

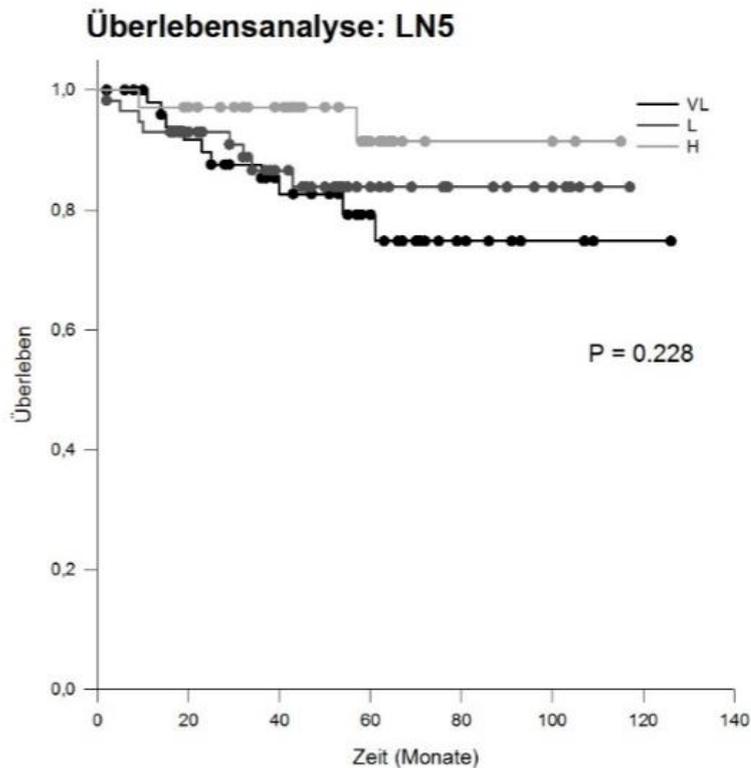


Abbildung 20: Kaplan-Meier Kurve bezüglich des krankheitsspezifischen Überlebens bei Patientengruppen mit unterschiedlicher Anzahl an Lymphknoten > 5mm (LN5)

Gemäß der Hypothese dieser Arbeit haben Patienten mit höheren Zahlen an ITL ein besseres Outcome. Um einen bestmöglichen Grenzwert der Lymphozytendichte zu ermitteln wurde eine ROC-Analyse durchgeführt. Für CD3CT und CD3IF ergab sich ein Bereich unterhalb der Kurve (AUC) von 0,65. Die Grenzwerte der Lymphozytenzahlen lagen für CD3CT bei 1.000/mm² und für CD3IF bei 1.400/mm². (Abb. 21 und Abb. 22).

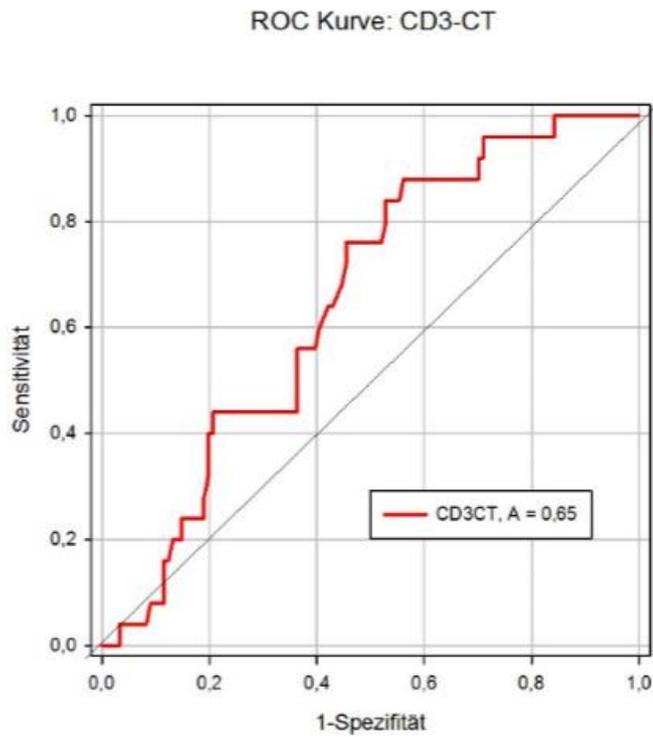


Abbildung 21: ROC-Kurve CD3-CT

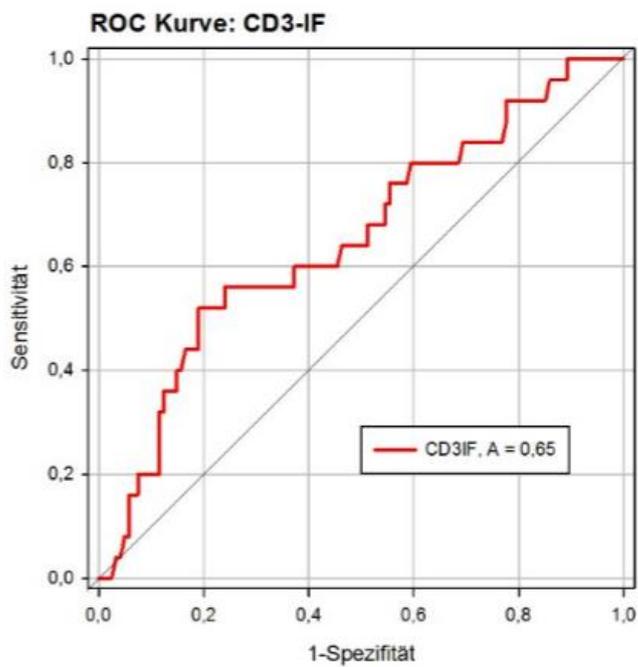


Abbildung 22: ROC-Kurve: CD3-IF

Bei den CD8-positiven Lymphozyten war die Aussagekraft der Infiltration etwas geringer als bei den CD3-positiven. In der Kategorie CD8IF lag die AUC bei 0,58 und der

optimalen Grenzwert bei 500/mm². Beim Betrachten der Kurve für CD8CT fiel auf, dass diese fast der Diagonalen entsprach und die AUC mit 0,51 sehr klein war. Demnach war die Aussagekraft der CD8-positiven Lymphozyten im Tumorzentrum zu gering, um einen optimalen Grenzwert zu bestimmen. Aus diesem Grund wurde CD8CT in der Überlebensanalyse und bei der Bestimmung des Immunscores (IM) nicht berücksichtigt. Ursprünglich sollte der Immunscore (IM) 5 Kategorien enthalten. Durch das Wegfallen von CD8CT reduzierte sich der Score auf lediglich 4 Kategorien (0, 1, 2 und 3). Es ergab sich die folgende Häufigkeitsverteilung für das Vorkommen der jeweiligen Kategorien: IM0: 14%; IM1: 36%; IM2: 32%; IM3: 18%. IM0 und IM1 wurden zu einer Gruppe zusammengefasst und die Fälle mit den anderen beiden Gruppen bezüglich des krankheitsspezifischen Überlebens (cancer-specific survival, CSS) verglichen. Somit gehörten 73 Fälle zur Kategorie IM 0/1, 46 Fälle zur Kategorie IM2 und 27 Patienten fielen in die Kategorie IM3. Hierbei ließ sich ein signifikant besseres Outcome bei Patienten mit einem höheren IM feststellen ($p = 0,024$). In der Gruppe IM 0/1 betrug das krankheitsspezifische Überleben 94 Monate (95%-Konfidenzintervall: 84-105), während es in der Kategorie IM2 bei 113 Monaten lag (95%-Konfidenzintervall: 101-125). In der dritten Kohorte mit dem maximalen Immun Score von 3 wurde im Beobachtungszeitraum kein Endpunkt wie ein krebsbedingter Tod oder das Auftreten von Fernmetastasen erreicht. (Abb. 23)

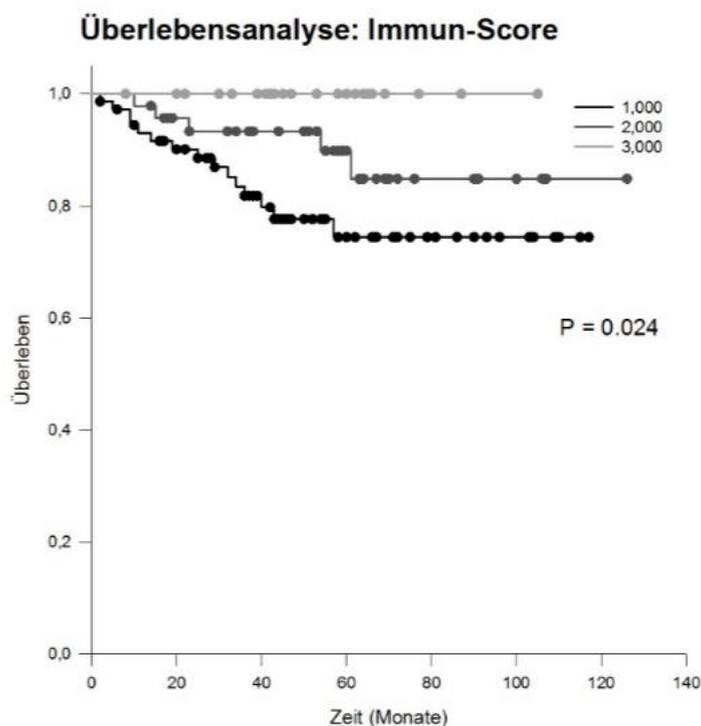


Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurve bezüglich des krankheitsspezifischen Überlebens der Patienten mit unterschiedlichem Immunscore (IM). Die Gruppe 1 beinhaltet IS 0 und IS 1; ($P=0,024$)

Um sicherzustellen, dass Überlebensvorteile auf dem Entzündungsinfiltrat und nicht auf der ebenfalls mit verbessertem Überleben in Verbindung gebrachten Mikrosatelliteninstabilität beruhen, wurde bei der Überlebensanalyse nochmals zwischen Patienten mit einem intakten und solchen mit einem defekten DNA-Reparatursystem differenziert. 123 Fälle in der Überlebensanalyse wiesen ein intaktes MMR-System auf. Kein Patient dieser Gruppe mit einem IM3 erreichte einen Endpunkt, während die mittlere Überlebenszeit bei einem Immunscore von 2, 108 Monate und bei einem IM1, 97 Monate betrug. Obwohl bei einem p-Wert von 0,105 das Signifikanzniveau nicht erreicht wird, sind die Unterschiede im krankheitsspezifischen Überleben doch sehr eindrücklich. (Abb. 24)

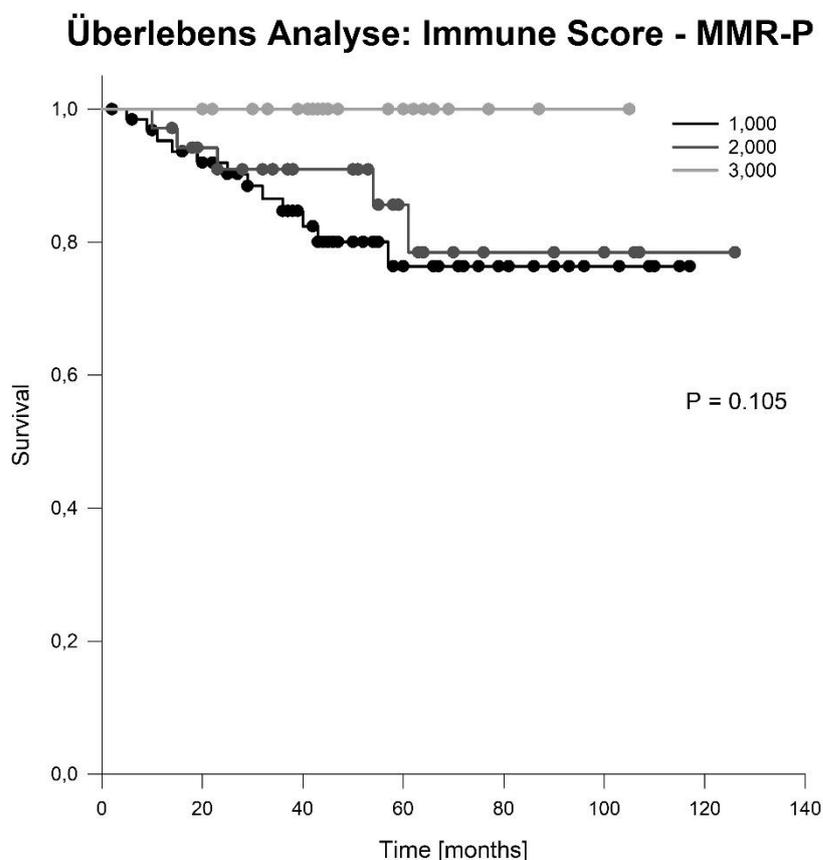


Abbildung 24: Kaplan-Meier Kurve des krankheitsspezifischen Überlebens der Patienten mit intaktem MMR- System (Gruppe 1 fasst die Immunscores 0 und 1 zusammen) ($p=0,105$)

Auch in den 23 Fällen mit Mikrosatelliteninstabilität bestätigte sich dieser Trend. Im Gegensatz zu den Patienten mit Immunscore 1, die ein krankheitsspezifisches Überleben von 63 Monaten (95% Konfidenzintervall: 21-106) aufwiesen, konnte bei einem IM von 2 oder 3 kein Todesfall verzeichnet werden. Der Überlebensunterschied war hier aufgrund des p-Werts von 0,017 als signifikant einzustufen. (Abb. 25)

Überlebens-Analyse: Immune Score - MMR-D

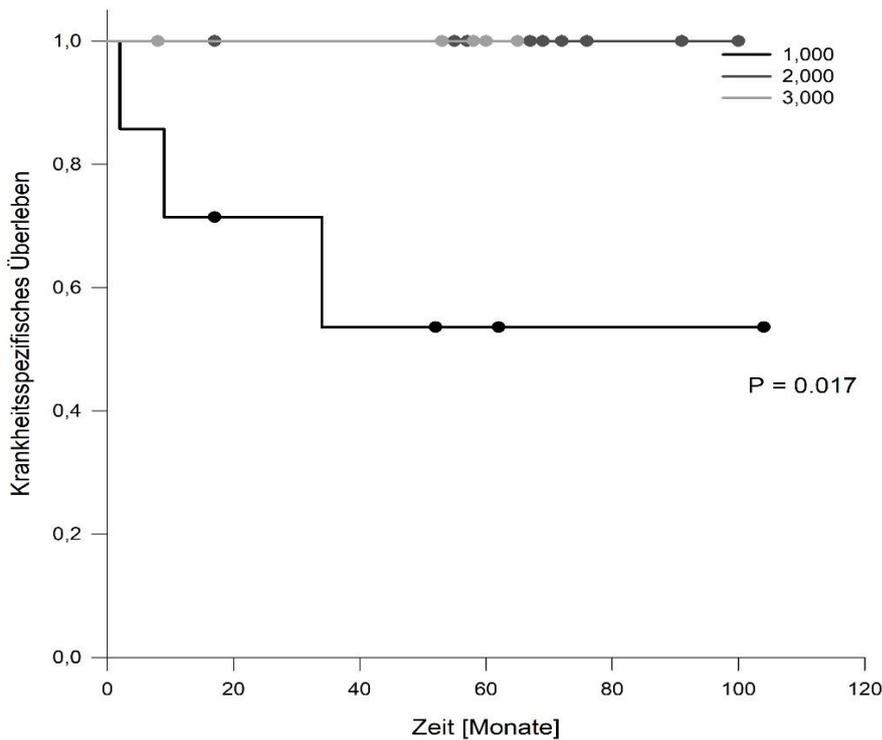


Abbildung 25: Kaplan-Meier Kurve des krankheitsspezifischen Überlebens der Patienten mit nicht intaktem MMR-System (Gruppe 1 fasst die Immunescores 0 und 1 zusammen ($p=0,017$))

Bei der multivariaten Analyse wurden die Variablen Immunscore, LN5, Crohn-ähnliche Entzündung, Tumorknospung, MMR Status und Invasionsstyp (infiltrierend vs. oberflächlich schreitend) nach Jass et al. (56) untersucht. Weitere dichotome Variablen waren pT1/2 vs. pT3/4 und die Unterscheidung in low grade vs. high grade. Die Untersuchungen ergaben sowohl für das pT-Stadium als auch für den Immunscore eine unabhängige Vorhersagekraft bezüglich des Eintretens des Endpunktes eines krebsbedingten Todes. Die p-Werte lagen hierbei bei $p < 0,026$ und $p < 0,024$.

4. Diskussion

4.1 Krebsforschung jenseits der Tumorzelle

Seit der Entdeckung der malignen Entartung von Zellen und dem vielschichtigen und allseits präsenten Krankheitsbild Krebs hat es sich die Wissenschaft zum Ziel gemacht, die Tumorzelle und jeden erdenklichen Aspekt ihres Stoffwechsels zu erforschen, um in ihn einzugreifen und das Tumorwachstum zu stoppen. Wie bei allen Krebsarten gilt die Zytostatikatherapie, die im Allgemeinen die Proliferation der Tumorzellen verhindern soll, als Standard der medikamentösen Therapie. Die Zytostatika greifen in den Zellzyklus ein, um die pathologisch erhöhte Zellteilungsrate zu reduzieren. Die moderne Antikörpertherapie, die immer häufiger in der Therapie von Tumoren eingesetzt wird, hat es sich zum Ziel gesetzt, die Tumorzelle, bzw. die tumorassoziierten Proteine gezielt anzugreifen und folglich körpereigene Zellen zu schonen. Viele dieser Antikörper binden an Oberflächenproteine der Tumorzellen. Einige Beispiele sind das an CD52 bindende Alemtuzumab, das an CD33 bindende Gemtuzumab, und das Rituximab, welches an CD20 bindet und in der Therapie des NHL, sowie der CLL eingesetzt wird. (65)

Die Tumorzelle und ihr Stoffwechsel sind der Kern jedes malignen Geschehens und deshalb der Hauptangriffspunkt im Kampf gegen den Krebs. Für eine Evolution in der Tumorforschung und -therapie ist es jedoch essentiell, über den Tellerrand der Tumorzelle hinauszublicken und auch der Mikroumgebung, den umgebenden Zellen und Strukturen Beachtung zu schenken, um letztendlich auch neue Angriffspunkte für eine optimierte Tumorthherapie zu finden. Ein Beispiel dafür, wie die moderne Tumorthherapie sich nicht direkt gegen die Tumorzelle richtet und das Tumorwachstum dennoch erfolgreich verringert ist der Antikörper Bevacizumab. Er richtet sich gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) und schränkt somit die übermäßige Vaskularisierung des Tumors ein, wodurch dessen Wachstum durch die resultierende Unterversorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff gebremst wird. Bevacizumab wird unter anderem beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCL), Her2/neu-negativem Mammakarzinom und auch beim metastasierten Kolonkarzinom erfolgreich eingesetzt. (65)

In dieser Studie wurden die CD3+ und CD8+ T-Lymphozyten aus der Vielfalt der Mikroumgebung des Kolonkarzinoms ausgewählt und ihre Bedeutung für den Krankheitsverlauf untersucht und dargelegt.

4.2 Immunosurveillance - körpereigene Immunabwehr gegen Tumoren

Bei der Erforschung von Neoplasien und ihren Therapien ist es unumgänglich, sich auch mit dem Immunsystem auseinanderzusetzen. Schon Paul Ehrlich stellte 1909 die Hypothese auf, dass das Immunsystem in der Lage ist, maligne Zellen zu erkennen und zu beseitigen. (66) Der damaligen Forschung fehlte jedoch noch essentielles Wissen über die zelluläre und molekulare Ebene des Immunsystems, um dies experimentell überprüfen zu können. In den späten 1950er Jahren stellten Burnet und Thomas die Hypothese der Immunosurveillance, also der Immunüberwachung auf. (67) (68) Sie wollten mithilfe von transplantierten Tumoren in Mäusen experimentell nachweisen, dass Tumoren von einem intakten Immunsystem unterdrückt werden können. Es gab jedoch auch Studien, die diese Hypothese nicht stützten und die Bedeutung der T-Lymphozyten in der Tumoralabwehr negierten. Stutman et al. führten beispielsweise Tierexperimente durch, die zeigten, dass sich immunkompetente Mäuse in ihrer Anfälligkeit für spontane oder chemisch induzierte Tumoren kaum von ihrer Vergleichsgruppe der athymischen Mäuse ohne funktionsfähigen T-Lymphozyten unterschieden. (69) Das Konzept der Immunüberwachung wurde zu dieser Zeit erst einmal wieder verlassen. Später fand man jedoch heraus, dass diese Studie einige Lücken aufwies, da auch athymische Mäuse noch T-Zellen aufweisen und zudem die natural killer (NK)-Zellen völlig unbeeinträchtigt sind und diese ebenso eine große Rolle in der Tumoralabwehr spielen. (70, 71) In den 1990er Jahren wurde die Hypothese der Immunosurveillance unter anderem von Engel et al. wieder aufgegriffen. Mit dem Kanzerogen 3-Methylcholanthren (MCA) induzierten sie Sarkome sowohl in athymischen als auch in Wild-Typ Mäusen. Bei niedrigen MCA Dosen konnten sie bei den Mäusen mit kompromittiertem Immunsystem eine kürzere Tumorinduktionszeit und eine höhere Tumoralinzidenz feststellen. (72) Durch den Fortschritt der Genforschung war es in den 90er Jahren möglich, bessere Versuchstiermodelle mit auf genetischer Basis defektem Immunsystem bereitzustellen, was das Interesse an der Immunosurveillance Theorie weiter ansteigen ließ. (2) In experimentellen Studien fand man heraus, dass Interferon- γ eine große Rolle in der Abwehr von transplantierten Tumorzellen spielte. Genetisch veränderte Mäuse, deren Interferon- γ Signalweg durch fehlende Interferon- γ -Rezeptoren oder den STAT1 Transkriptionsfaktor gestört wurde, entwickelten Tumoren nach der Behandlung mit MCA schneller und mit höherer Frequenz als die Kontrollgruppe mit Wildtyp Mäusen. (73) (74) Shankaran et al. forschten an RAG2-/- Mäusen, die Defekte im recombination activating gene 2 aufweisen, welches ein für die B- und T-Zell Entwicklung wichtiges Protein kodiert. Diese Mäuse ohne adäquate Abwehr durch B- und T-Zellen zeigten eine

höhere Anfälligkeit gegenüber chemisch induzierten und spontanen Tumoren (42). Dies war der entscheidende erste Nachweis, dass Lymphozyten, mit denen sich die vorliegende Arbeit beschäftigt, einen großen Beitrag zur Tumorabwehr leisten. Die große Bedeutung des Immunsystems in der Entwicklung und Abwehr von Tumoren wurde auch durch weitere Studien immer deutlicher und wurde schließlich allgemein anerkannt. Das Immunsystem übernimmt im Allgemeinen mehrere Rollen in der Tumorabwehr. Es schützt den Körper vor Viren, die potentiell onkogen sein können. Des Weiteren ist es wichtig, dass Pathogene durch das Immunsystem schnell eliminiert werden können, da auch eine ausgedehnte Entzündungsreaktion die Entstehung von Krebs begünstigen kann. Der für diese Studie wichtigste Aspekt des Immunsystems in der Tumorbekämpfung ist die Beseitigung maligner Zellen durch das Immunsystem, besonders durch Lymphozyten. Die Erkenntnis, dass Tumorzellen spezielle Antigene exprimieren, die auf gesunden Zellen nicht zu finden sind, war ein Durchbruch in der onkologischen Immunforschung. Anhand dieser Antigene können Tumorzellen von den Lymphozyten mittels spezifischer Rezeptoren erkannt, von normalen Körperzellen unterschieden und letztlich beseitigt werden. Die Existenz der speziellen Tumorantigene wurde erstmals dadurch gezeigt, dass Mäuse, bei denen Tumoren durch verschiedene Kanzerogene, Viren oder UV-Strahlen induziert wurden, bei erneuter Provokation der gleichen Tumoren vor diesen geschützt waren. Beim Menschen wurden diese Tumorantigene mit Antikörpern oder CD8-positiven T-Lymphozyten, die für den autologen Tumor spezifisch waren und Krebspatienten entnommen wurden, nachgewiesen. Auf diese Weise entdeckte Tumorantigene beinhalten p53 oder Her-2. (2) Auch in der klinischen Praxis gibt es viele Beispiele, die zeigen, dass uns unser Immunsystem vor Tumoren schützt. HIV-Patienten mit kompromittierten CD4-positiven T-Helferzellen sind um ein Vielfaches anfälliger für Lymphome oder beispielsweise das Kaposi-Sarkom. Auch Patienten, die ein Spenderorgan erhalten haben und deshalb mit Immunsuppressiva behandelt werden müssen, haben im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung gleichen Alters und Geschlechts ein dreifach erhöhtes Risiko, an einem Malignom zu erkranken. (75) Unser Immunsystem gewährt natürlich leider keinen völligen Schutz vor Krebs. Auch Menschen mit intaktem Immunsystem sind davon betroffen.

4.3 Immunoediting – Der Wirt formt seinen Tumor

Robert Schreiber führte den Begriff *cancer immunoediting* ein, der eine Erweiterung der immunosurveillance darstellt. Im Gegensatz zur Immunüberwachung, deren Fokus auf

der Tumorabwehr durch den Organismus liegt, besagt die Hypothese des Immunoediting, dass das Immunsystem den Körper nicht nur vor Tumoren schützt, sondern den Tumor in gewisser Weise formt, sein Wachstum sogar verstärken kann und Einfluss auf den immunogenen Phänotyp des Tumors hat. Immunoediting soll also das Zusammenspiel und die gegenseitige Beeinflussung vom Tumor und seinem Wirtskörper beschreiben und umfasst drei zentrale Begriffe: elimination, equilibrium und escape. Gemeint ist damit also die Verdrängung des Tumors, das Gleichgewicht zwischen Wirt und Tumor, sowie die Art und Weise, wie der Tumor versucht, der Immunabwehr zu entgehen. Elimination entspricht der schon bekannten Immunüberwachung, während die anderen beiden Begriffe neu eingeführt wurden. Bei normalen Zellen kann es durch Karzinogene, Strahlen, Virusinfektionen, chronische Entzündungen oder vererbte genetische Mutationen zur malignen Transformation kommen. Wenn intrinsische Abwehrmechanismen, wie zum Beispiel Apoptose diese Transformation nicht stoppen können, laufen die erwähnten Schritte elimination, equilibrium, und escape meistens, aber nicht zwangsläufig in dieser Reihenfolge ab. Phasen können jedoch auch übersprungen werden. In der Eliminierungsphase werden transformierte Zellen vom angeborenen und erworbenen Immunsystem entdeckt, bevor es zu einem klinisch apparenten Tumor kommt. (2) Es kommt sowohl durch die induzierte Entzündungsreaktion, als auch durch die Erkennung spezifischer Antigene auf den Tumorzellen zur Einwanderung von Immunzellen in den Tumor. Wie bereits am oben erwähnten Tiermodell erforscht, spielt das Interferon- γ auch beim Menschen in der Eliminierungsphase des Immunoediting-Modells eine zentrale Rolle. Es wirkt im Tumor antiproliferativ und proapoptotisch und hemmt zudem die Angiogenese und somit die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung des Tumors. Zudem kann Interferon- γ Makrophagen und NK-Zellen aktivieren, die Tumorzellen unter anderem durch Perforin-abhängige Mechanismen eliminieren können. Dendritische Zelle, die durch Zytokine oder durch den Kontakt mit NK-Zellen aktiviert werden, können Trümmer von Tumorzellen ingestieren und ihrerseits CD4+ TH1-Zellen in den nahegelegenen Lymphknoten durch Antigenpräsentation aktivieren. Diese T-Helferzellen tragen wiederum zur Entwicklung tumorspezifischer CD8+ zytotoxischer Lymphozyten bei. Nach ihrer Rückkehr in den Tumor selbst eliminieren sie dort die Antigen-positiven Tumorzellen. Die T-Helferzellen produzieren IL-2, welches zusammen mit IL-15 die Funktion der tumorspezifischen T-Killerzellen unterstützt. Die Gleichgewichtsphase (Equilibrium) ist die längste Phase im Immunoediting- Prozess und kann über Jahre andauern. Die Elimination von Tumorzellen wird fortgesetzt und der Tumor wird in Schach gehalten. Das Immunsystem übt jedoch nach dem darwinistischen

Prinzip einen Selektionsdruck auf die Tumorzellen aus, der durch Mutationen zu neuen Tumorzellvarianten führt. Generell tendieren die Tumorzellen dazu, mit zunehmender Entdifferenzierung dem Immunsystem durch eine immer geringer werdende Immunogenität zu entgehen, da sie so schlechter von den Immunzellen erkannt werden können. In der Escape-Phase wird der Tumor klinisch apparent. Trotz eines intakten Immunsystems können die in der Gleichgewichtsphase selektierten Tumorzellen nicht mehr vom Immunsystem erkannt und beseitigt werden. Möglichkeiten, dem Immunsystem zu entgehen sind unter anderem der Verlust von MHC-Komponenten, wodurch die Tumorzellen von den zytotoxischen T-Zellen nicht mehr erkannt werden, oder auch die Entwicklung einer Interferon-gamma-Insensitivität. (2, 76)

Die Forscher Hanahan und Weinberg publizierten im Jahr 2000 mit „Hallmarks of cancer“ einen der meist zitierten Artikel in der Krebsdebatte. Sie stellten die folgenden sechs Kennzeichen von Krebs auf, die zu seiner Entwicklung nötig sind: Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, Umgehung der Apoptose, Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumssignalen, nachhaltige Angiogenese, Gewebsinvasion und Metastastisierung sowie das unbegrenzte Potential zur Zellteilung. (77) Auch sie erkannten die Bedeutung des Immunsystems in der Tumorforschung und fügten in der Aktualisierung des Konzepts die Notwendigkeit der Umgehung des Immunsystems ihren Kennzeichen der Krebsentstehung hinzu. (78)

4.4 Das Immunsystem als konfundierende Variable zwischen Lymphknotengröße, Lymphknotenausbeute und Prognose

Diesen Untersuchungen vorausgehende Studien haben sich bereits mit der Rolle des Immunsystems beim Kolonkarzinom befasst. Große Lymphknoten galten bisher oft als Alarmsignal für einen tumorösen Befall. Märkl et al. nahmen die Lymphknoten beim Kolonkarzinom näher unter die Lupe und konnten eine alternative Sichtweise auf die Rolle der Lymphknoten aufzeigen. Ein vergrößerter Lymphknoten ist demnach besser als sein ursprünglicher Ruf, da er als Zeichen einer starken körpereigenen Immunantwort gegen den Tumor gewertet werden kann, die mit einer verbesserten Prognose einhergeht. In der Studie von Märkl et al. waren zudem nur 25% der Lymphknoten größer als 1 cm von Metastasen befallen. (3). Die Erkenntnis der vergrößerten Lymphknoten als Ausdruck der Immunantwort stellt auch das Will-Rogers Phänomen in Frage. Oft wird argumentiert, dass Lymphknotenmetastasen leicht übersehen werden können, wenn nicht genug Lymphknoten untersucht wurden und den Patienten deshalb fälschlicherweise ein

zu niedriges Tumorstadium zugeschrieben wird. Eine hohe Lymphknotenausbeute wird als Qualitätsmerkmal der Arbeit von Chirurg und Pathologe angesehen und soll falsch-negative N0 Diagnosen einschränken. Je mehr Lymphknoten untersucht werden, desto höher ist auch die Wahrscheinlichkeit, eine Lymphknotenmetastase aufzuspüren. Diese Annahme ist schwer anzuzweifeln, da sie zum einen so logisch einleuchtend ist, und zum anderen wissenschaftlich gezeigt wurde, dass Patienten mit größerer Lymphknotenausbeute auch ein besseres Outcome haben.(29, 79) Nach dieser Hypothese sollte möglichst jeder Lymphknoten detektiert werden, um ein optimales Patientenoutcome zu erreichen. Wie oben bereits erwähnt, haben die immer besser werdenden Techniken der Lymphknotenpräparation, z.B. mit Methylenblau, jedoch nicht den erhofften Effekt einer verbesserten Detektion von Lymphknotenmetastasen erbracht.(4)

Gemäß der Hypothese dieser Studie und vorausgehenden Untersuchungen (3) führt eine starke Immunantwort zu vielen und großen Lymphknoten im Tumorabflussgebiet, wodurch wiederum das Auffinden der Lymphknoten vereinfacht und somit auch die Lymphknotenausbeute erhöht wird. Auch Sloothaak et al. konnten eine Korrelation zwischen der Lymphknotengröße und ihrer Ausbeute feststellen. Zudem war die durchschnittliche Lymphknotengröße bei suffizienter Lymphknotenausbeute von über 12 Lymphknoten größer als bei Nichterreichen dieser Marke. (80)

Ähnliche Ergebnisse erbrachte auch eine 2016 durchgeführte Studie von Märkl et al. Es handelte sich um eine retrospektive Studie, deren Lymphknoten mit konventionellen Techniken präpariert wurden. Genau wie in dieser Studie wurde das Studienkollektiv in drei Gruppen bezüglich ihrer Anzahl an großen Lymphknoten über 5mm eingeteilt (LN5vl, LN5l, LN5h). Die durchschnittliche Lymphknotenausbeute bei konventioneller Präparation lag hier in den Gruppen LN5vl, LN5l und LN5h bei jeweils 11, 14 und 20 Lymphknoten. In dieser Studie konnte besonders bei Patienten im Tumorstadium pT3/4 in der LN5h - Gruppe ein signifikant längeres Überleben von durchschnittlich 71 Monaten im Vergleich zu 40 Monaten (bei LN5vl) und 57 Monaten (bei LN5l) festgestellt werden. (81)

Die Analysen der verschiedenen LN5 Gruppen in dieser Arbeit ergaben ebenfalls eine bessere Prognose bei Patienten mit einer hohen Anzahl großer Lymphknoten über 5mm. Die Tatsache, dass die Unterschiede nicht signifikant waren, lässt sich mit großer Wahrscheinlichkeit auf das relativ kleine Studienkollektiv zurückführen. (Abb. 20) Ebenfalls konnte bei einer als suffizient gewerteten Lymphknotenausbeute von über 12

LK ein leichter Überlebensvorteil festgestellt werden. Die geringe Größe des Studienkollektivs ist vermutlich wiederum der Grund dafür, dass die Unterschiede nicht als signifikant gewertet werden konnten. Gemäß der Studienhypothese wird der Lymphknotengröße und insbesondere der damit einhergehenden Dichte der ITL im Vergleich mit der LK-Ausbeute eine weitaus wichtigere Bedeutung für das Patientenoutcome zugesprochen. Das Immunsystem fungiert also als konfundierende Variable zwischen einer hohen Lymphknotenausbeute und einem positiven Outcome. Die Lymphknotengröße ist der Hypothese dieser Arbeit nach ein makroskopisches Kennzeichen einer starken Immunantwort. Das Besondere der Lymphknotengröße als prognostischer Marker ist die Tatsache, dass sie mit einfachsten Mitteln bestimmt werden kann und für den Patienten dennoch sehr wichtige prognostische Informationen liefert. Um die immunologischen Vorgänge zu verstehen, ist es ebenfalls wichtig, das Immuninfiltrat und die zelluläre Mikroumgebung des Tumors in Betracht zu ziehen. Auf mikroskopischer Ebene kann eine starke Infiltration des Tumors mit Lymphozyten als ausgeprägte Immunreaktion gewertet werden. Kim et al. fanden in ihrer 2013 veröffentlichten Studie bereits einen Zusammenhang zwischen der Anzahl entnommener Lymphknoten und dem Entzündungsinfiltrat beim Kolonkarzinom. Sie analysierten das Immuninfiltrat immunohistochemisch anhand von CD3, CD8 und CD45RO. In ihrer Studie konnte gezeigt werden, dass ein ausgeprägtes Immuninfiltrat mit einer größeren Lymphknotenausbeute einherging ($p = 0,04$). Zudem brachte ein schwaches Immuninfiltrat bei Patienten im TNM-Stadium III ein kürzeres krankheitsspezifisches Überleben mit sich. ($p = 0,02$) (82)

Diese Studie hat es sich zum Ziel gesetzt, die Verbindung zwischen makroskopischen und mikroskopischen Aspekten der Immunantwort herzustellen und den Zusammenhang zwischen Lymphknotengröße und der Infiltrationsdichte CD3+ und CD8+ tumorinfiltrierender Lymphozyten aufzuzeigen. Betrachtet werden hierbei das Tumorzentrum und die Infiltrationszone des Tumors. Die Einteilung und Abstufung der Immunantwort orientiert sich an dem von Galon(47, 49) und Pages(46, 83) eingeführten Immunscore.

4.5 Bestimmung der Lymphozytenzahlen mittels digitaler Bildanalyse

Sowohl durch manuelles Zählen der Lymphozyten, als auch durch die digitale Bildanalyse ist eine Analyse des gesamten Schnittes extrem zeitaufwendig und im großen Stil mit der gegenwärtig verfügbaren Technik kaum umsetzbar. Besonders vor dem

Hintergrund der Integration dieses Konzepts in den klinischen Alltag fiel die Entscheidung, kleine Ausschnitte aus den Schnitten zu selektieren und diese bezüglich ihrer Lymphozytenzahl zu analysieren. Hier ist es essentiell, Ausschnitte zu wählen, die in ihrer Lymphozytenzahl repräsentativ für das gesamte Präparat sind. Trotz aller Sorgfalt bleibt die Wahl der Ausschnitte eine untersucherabhängige, subjektive Entscheidung. Beim Vergleich der digitalen Bildanalyse mit dem manuellen Zählen durch drei unabhängige Untersucher konnte eine hohe Konkordanz festgestellt werden ($R = 0,971$; $p < 0,001$) und somit die Reliabilität des Programms bestätigt werden. (Abb. 10) Väyrynen et al. kamen in ihrer 2012 veröffentlichten Studie über die Anwendung von ImageJ zu fast identischen Ergebnissen. ($R > 0,96$ im Vergleich mit exaktem manuellen Zählen) Auch die Korrelation beim Vergleich mehrerer Ausschnitte eines Präparats ist sehr hoch ($R = 0,832-0,934$), was die erwähnten Bedenken bezüglich der Auswahl eines repräsentativen Ausschnitts relativieren kann. (59)

Es bestand eine starke Korrelation zwischen den Zellzahlen im Tumorzentrum und in der Infiltrationszone. Zwischen den CD3+ und CD8+ Zellen war die Korrelation ebenfalls hoch. Weitere Studien, die die oben erwähnten TIL und weitere inflammatorische Zellen beim Kolonkarzinom untersuchten, konnten ebenfalls eine hohe Korrelation feststellen. (83, 84) Auch der Vergleich der Lymphozytendichte mit der Crohn-ähnlichen Entzündung und den semiquantitativen Analysen der ITL in der H&E-Färbung erbrachte eine Übereinstimmung. Diese Erkenntnisse sprechen für die hohe Verlässlichkeit der digitalen Bildanalyse.

Bei der Bestimmung der Dichte tumorinfiltrierender Lymphozyten können genomische Verfahren als mögliche Alternativen zu Immunhistochemie und digitaler Bildanalyse diskutiert werden. Genomische Verfahren stützen sich insbesondere auf die Analyse der Genexpression des T-Zell-Rezeptors (TCR) auf der Oberfläche der T-Zellen, welcher der Erkennung von Antigenen dient. Der CDR3 Region (complementarity determining region 3) des TCRs kommt hierbei eine besondere Bedeutung zu. Das TCR-Repertoire gibt somit Aufschluss über die Art und das Ausmaß der TIL, sowie ihre Interaktionsmöglichkeiten mit dem Tumor. Die Erstellung eines TCR-Profiles kann durch TCR-Sequenzierung oder durch RNA-Sequenzierung erfolgen. Bei der TCR-Sequenzierung wird die CDR3-Region des TCR-Transkripts mittels PCR und vorgefertigten Primern selektiv vervielfältigt. Die RNA-Sequenzierung ist unselektiv, wodurch die TCR-Transkripte nur einen Bruchteil aller generierten Transkripte ausmachen. Das Ziel der Erstellung eines TCR-Profiles besteht genau wie bei der digitalen

Bildanalyse darin, die antitumorale Immunantwort darzustellen und prognostische sowie prädiktive Informationen zu erhalten. Es wurden beispielsweise bereits Zusammenhänge zwischen TCR-Profil und dem Ansprechen auf Immuntherapeutika wie CTLA-4 Checkpoint Inhibitoren untersucht, auf die im Verlauf der Arbeit noch näher eingegangen wird. (85-88)

Durch die wachsende Verfügbarkeit und die sinkenden Kosten der Sequenzierung wird die Bestimmung des TCR-Repertoires zukünftig besonders im Hinblick auf die Immuntherapie voraussichtlich immer mehr an Bedeutung gewinnen. Strebt man einen Vergleich mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode der digitalen Bildanalyse an, so bleiben die genomischen Analysen derzeit jedoch aufgrund ihres hohen Aufwands eher speziellen Fragestellungen und Studien vorbehalten, während die digitale Bildanalyse in Kombination mit dem Immunscore bereits in den klinischen Alltag integriert werden kann.

4.6 Lymphknotengröße und Immunantwort

Ein Ziel dieser Studie war es, den Zusammenhang zwischen der makroskopisch zu beurteilenden Lymphknotengröße, ihrer Ausbeute und der Dichte intratumoraler Lymphozyten herzustellen. Bei Patienten mit suffizienter Lymphknotenausbeute von mindestens 12 Lymphknoten konnte im Tumorzentrum eine signifikant höhere Dichte der ITL beobachtet werden als bei Patienten mit niedrigerer Ausbeute. Auch in der Infiltrationszone waren die Dichten marginal signifikant höher. (Abb. 16) Zudem korrelierte die Dichte der Lymphozyten mit der Lymphknotengröße; d.h. mit den LN5 Kategorien LN5v1, LN5l und LN5h. (Abb. 17; Tabelle 6) Wenig große Lymphknoten waren mit schwacher Lymphozyteninfiltration vergesellschaftet. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Hypothese, dass sich eine starke Immunantwort sowohl in der Präsenz großer Lymphknoten als auch in einem ausgeprägten Immuninfiltrat äußert. Größere Lymphknoten bei Patienten mit besonders aktivem Immunsystem sind leichter zu detektieren und erhöhen somit auch die Lymphknotenausbeute. Dies ist eine Erklärung für den prognostischen Vorteil einer hohen Lymphknotenausbeute. Schon vor über 40 Jahren befassten sich Forscher mit dem Zusammenhang zwischen der Lymphknotenmorphologie, der Immunantwort und der Prognose beim Kolonkarzinom. 1980 beschäftigten sich Pihl et al. mit der Relation vergrößerter Lymphknoten und dem krankheitsspezifischen Überleben beim Kolonkarzinom. Sie stellten fest, dass sich hyperplastische Keimzentren bei normalen regionalen Lymphknoten im Dukes Stadium

B und bei tumorös befallenen Lymphknoten im Dukes Stadium C positiv auf das Überleben auswirkten. Auch ein vergrößerter Parakortex der Lymphknoten ging in den Stadien Dukes B und C mit verlängertem krankheitsspezifischem Überleben einher. (89) Die Lymphknotenmorphologie mit seinem Immuninfiltrat wurde schon 1975 als prognostischer Faktor beim Kolonkarzinom in Betracht gezogen. So konnten Patt et al. in ihrer an Sigmakarzinompatienten durchgeführten Studie bei Patienten, deren Lymphknoten die größte Dichte an parakortikalen Immunoblasten aufwiesen, die längsten Überlebensraten feststellen. Die 5-Jahres Überlebensrate lag in dieser Studienpopulation bei 74%, während sie bei Patienten mit geringer oder moderater parakortikaler Immunoblasteninfiltration nur bei 35% lag. (90) Kim et al konnten in ihrer 2013 veröffentlichten Studie einen Zusammenhang zwischen der Lymphknotenausbeute und dem Immuninfiltrat herstellen. Sie beurteilten das Immuninfiltrat immunhistochemisch anhand der T-Zell Marker CD3, CD8 und CD45RO bei Patienten mit Kolonkarzinom im UICC Stadium II und III. Ein starkes Immuninfiltrat war, wie in dieser Studie auch, mit einer größeren Lymphknotenausbeute vergesellschaftet. Zudem ist laut Kim et al. die Lymphknotenausbeute bei Tumoren im rechten Hemikolon erhöht. (82) George et al., die mit ihrer Studie ebenso das Will Rogers Phänomen anzweifelten, fanden ebenfalls eine Korrelation zwischen der Anzahl detektierter Lymphknoten und der Intensität der Lymphozyteninfiltration. Zudem bestand auch in dieser Studie ein signifikanter Überlebensvorteil in der Studiengruppe mit einer hohen Dichte der TIL. (91)

4.7 Zusammenhänge zwischen Mismatch-Repair System und Immunantwort

Das Studienkollektiv wurde unter anderem auch in Fälle mit intaktem und defektem Mismatch-Repair System eingeteilt. Hierbei konnte eine erheblich höhere Dichte CD3-positiver ITL in der Gruppe der MMR-defizienten Fälle detektiert werden. Zudem war in der Gruppe mit vielen großen Lymphknoten (LN5h) der Anteil der MMR-defizienten Fälle bedeutend höher. Beide Erkenntnisse zeigen den Zusammenhang einer starken Involvierung des Immunsystems und einem defekten Mismatch-Repair System. Auch andere Studien fanden bereits einen Zusammenhang zwischen einer höheren Lymphknotenausbeute und Kolonkarzinomen mit Mikrosatelliteninstabilität. In einer Studie von Belt et al. lag der Anteil der MSI-Tumoren bei hoher Lymphknotenausbeute (hier mindestens 10 LK) bei 26,3%, während er sich bei niedriger Lymphknotenausbeute nur bei 15,1% befand.(92) Auch Soreide et al. konnten in ihrer Studie bei den Tumoren mit Mikrosatelliteninstabilität die höchste Lymphknotenausbeute verzeichnen.(93)

Die Relation zwischen einem aktivierten Immunsystem und einer Mikrosatelliteninstabilität erklärt sich durch neue immunogen wirkende Peptide, die durch Rastermutationen entstehen und aufgrund der Defizite in der DNA-Reparatur nicht behoben werden können. Das körpereigene Immunsystem reagiert auf diese Peptide und aktivierte T- Lymphozyten wandern folglich vermehrt in das Tumorgebiet ein. (92, 94)

Mikrosatelliteninstabilität geht mit einem Anstieg der ITL einher, wie diese und weitere Forschungsergebnisse darlegen. Des Weiteren wurde, wie ein 2005 von Popat et al. verfasster Übersichtsartikel besagt, bei Patienten mit MSI-high Tumoren ein längeres Überleben festgestellt. (95) Auch Belt et al. konnten bei Patienten mit MSI-Tumoren eine geringere Rezidivrate beobachten.(92) Kritiker könnten nun argumentieren, dass die MSI oder mit ihr zusammenhängende Faktoren wie CIMP (CpG island methylator phenotype) oder die BRAF Mutation als Confounder zwischen den ITL und dem verbessertem Outcome fungieren. Ogino et al. konnten jedoch zeigen, dass eine hohe Lymphozytendichte auch nach Berücksichtigung dieser Kovariablen mit einem signifikant längeren Überleben assoziiert ist. (96) In dieser Arbeit konnte kein vom MMR-Status abhängiger Unterschied bezüglich des Überlebens nachgewiesen werden, wenngleich die Ergebnisse für diese Fragestellung statistisch keine ausreichende Aussagekraft besitzen. Dennoch ist der prognostische Wert der ITL höher einzustufen als der des MMR-Status, da der prognostische Vorteil einer hohen Lymphozytendichte auch nach einer Stratifizierung gemäß MMR-Status erhalten bleibt. (Abb. 24, Abb. 25)

4.8 Mikroumgebung des Tumors und Prognose - Zusammenhänge anhand von Scoring-Systemen

Eine möglichst genaue Einschätzung der Prognose eines Krebspatienten ist insbesondere für die Planung der bestmöglichen Therapieform essenziell. Seit Jahren versuchen Forscher genetische oder molekulare prognostische Faktoren ausfindig zu machen, die dazu beitragen könnten, Patienten zu selektieren, die trotz geringer Tumordinfiltration einer Risikogruppe für schnellen Tumorprogress angehören. Es ist von großer klinischer Bedeutung, Risikopatienten frühzeitig zu identifizieren um ihnen Chemotherapie oder auch individuelle Therapien frühzeitig zukommen zu lassen, selbst wenn diese gemäß der auf der TNM-Klassifikation basierenden Leitlinie noch nicht indiziert wären. Klassische prognostische Marker, die bei Patienten ein erhöhtes Rezidivrisiko aufzeigen können sind Gefäß- oder Lymphgefäßeinbruch, perineurale Invasion, eine ausgeprägte Tumorknospung und Tumornekrose. Auch Patienten mit als aggressiv eingestuftem

histologischen Varianten, wie das Siegelringkarzinom oder das mikropapilläre Adenokarzinom werden als Risikopatienten angesehen und können von adjuvanten Therapien profitieren. (97) Ein weiteres Beispiel für einen prognostischen Marker ist der VEGF (vascular endothelial growth factor), dessen erhöhte Expression mit einer Verschlechterung der Prognose einhergeht. (98) Zudem wurden die MMPs (Matrix Metalloproteinasen) und ihre Inhibitoren TIMP (Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase) bezüglich ihrer prognostischen Bedeutung beim Kolonkarzinom untersucht, da die Tumordinvasion und Metastasierung mit der Zersetzung der extrazellulären Matrix z.B. durch Proteinasen beginnen kann. (99) Erst kürzlich haben Märkl et al. zudem die Marker uPA (Plasminogen-Aktivator vom Urokinasetyp) und PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor) sowie die Tumorknospung bezüglich ihrer prognostischen Bedeutung beim Kolonkarzinom evaluiert. Während uPA keine Auswirkungen auf die Prognose hatte, ging eine hochgradige PAI-1 Expression mit einem verkürzten krankheitsspezifischen Überleben einher. In der Kombination mit der Tumorknospung war der Unterschied signifikant. Zudem konnte dieser Kombination aus PAI-1 und Tumorknospung ein unabhängiger Vorhersagewert für das Auftreten von Fernmetastasen zugesprochen werden. (100)

Mit der Zeit hat sich der Blick auf Tumoren dahingehend erweitert, dass nicht mehr nur der Tumor selbst, sondern vermehrt auch seine Mikroumgebung und vor allem das Entzündungsinfiltrat, also die körpereigene Immunabwehr, im Hinblick auf die Prognostik berücksichtigt wird. Vor dem Hintergrund der prognostischen Rolle des Immuninfiltrats haben sich verschiedene Scoring Systeme entwickelt, deren gemeinsames Ziel es ist, Tumoren optimal zu klassifizieren und das klassische TNM Staging-System zu komplementieren.

Die Forscher Klintrup und Mäkinen analysierten 2005 mittels H&E Färbung die allgemeine Immunreaktion sowie die Infiltration mit eosinophilen Granulozyten, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten jeweils im Tumorzentrum und in der Infiltrationszone. Gemäß dem Ausmaß der Infiltration wurde für jede Zellart in jeder der beiden Lokalisationen ein Score von 0 bis 3 vergeben. Um die Reproduzierbarkeit zu erhöhen und die Analyse zu vereinfachen, wurden die Scores 0 und 1 als schwache Inflammation und die Scores 2 und 3 als starke Inflammation zusammengefasst. In der Infiltrationszone wies eine high-grade Infiltration mit Neutrophilen, Lymphozyten, Makrophagen und eine starke allgemeine Entzündung eine signifikant positive Korrelation mit dem 5-Jahres-Überleben auf. Im Tumorzentrum war

der Überlebensvorteil nur bei der starken allgemeinen Entzündung und einer hohen Infiltrationsdichte der Lymphozyten signifikant. Die Studie konnte zeigen, dass ein starkes Immuninfiltrat einen hohen stadienunabhängigen Vorhersagewert bezüglich des allgemeinen – und krankheitsfreien Überlebens hat. Beim Lymphknotennegativen Kolonkarzinom wies das Kollektiv mit High-grade Inflammation ein 5- Jahres Überleben von 87,6% auf, während es in der Gruppe mit Low grade Inflammation nur bei 47% lag. (45) Der von Klintrup und Mäkinen entwickelte Score zur Klassifizierung des Kolonkarzinoms ist in der Wissenschaft als K-M Score bekannt. Der Fokus lag hier auf dem allgemeinen Inflamationsgrad, da anhand der mit H&E gefärbten Schnitte keine exakte Differenzierung der Zelltypen erfolgte. Väyrynen et al. nahmen den K-M Score als Ausgangspunkt ihrer Forschung und nahmen das erwähnte Entzündungsinfiltrat näher unter die Lupe. Sie analysierten die Infiltrationsdichte von 8 verschiedenen Entzündungszellen immunhistochemisch. Neben CD3 und CD8 bestimmten sie FoxP3 für regulatorische T-Zellen, CD68 für Monozyten/Makrophagen, CD83 für reife dendritische Zellen, CD1a für unreife dendritische Zellen, sowie Mastzellen-Tryptase für Mastzellen und Neutrophile Elastase für Neutrophile Granulozyten. Sowohl zwischen den einzelnen Zelltypen als auch zu den Ergebnissen des mittels H&E Färbung ermitteltem K-M Score bestand eine hohe Korrelation. (84) Während die Ergebnisse bezüglich der prognostischen Aussagekraft der mittels FoxP3+ nachgewiesenen regulatorischen T-Zellen in verschiedenen, von Fridman et al. zusammengefassten weiteren Studien nicht einheitlich waren (1), war eine hohe Dichte dieser Zellen in der Studie von Väyrynen et al. ganz besonders mit einer niedrigen Rezidivrate assoziiert. Des Weiteren wiesen in dieser Studie die peritumoralen CD3+ T-Zellen und der vier-stufige K-M Score signifikante Assoziationen mit einer niedrigeren Rezidivrate auf. Aufgrund des kurzen Follow-ups war der Zusammenhang trotz ähnlicher Tendenzen bei anderen Zelltypen hier nicht signifikant. Zudem korrelierte das TNM- Stadium umgekehrt mit dem K-M Score und mit der Infiltration der Immunzellen. Besonders auffällig war diese inverse Korrelation im TNM Stadium IV mit FoxP3+, CD3+, und CD8+ Lymphozyten. (84) Dendritische Zellen präsentieren den T-Zellen Antigene und tragen zu deren Ausreifung bei. Besonders in der Infiltrationszone des Kolonkarzinoms lässt sich eine starke Clusterbildung zwischen den CD83+ reifen dendritischen Zellen und den T-Zellen beobachten, was ihre Bedeutung für die T-Zell abhängige Immunantwort verdeutlicht.(84, 101)

Diese Arbeit zeigt die prognostische Bedeutung der CD3+ und CD8+ Lymphozyten beim lymphknotennegativen Kolonkarzinom. Die Klassifizierung erfolgt gemäß dem ursprünglich von Galon und Pages entwickelte Immunscore, der generell auf der Untersuchung der Infiltrationsdichte zweier Arten von Lymphozyten im Tumorzentrum und in der Infiltrationszone basiert. Die Überlebensanalysen ergaben ein signifikant längeres krankheitsspezifisches Überleben der Patienten mit einer hohen Dichte intratumoraler Lymphozyten. Das krankheitsspezifische Überleben betrug 94 Monaten bei einem ermittelten Immunscore von 0/1 und 113 Monate bei einem Immunscore von 2. In der Gruppe mit dem höchsten Immunscore von 3 wurde im Beobachtungszeitraum kein Endpunkt erreicht. Diese Ergebnisse bezüglich der prognostischen Aussagekraft der intratumoralen Lymphozyten sind mit denen weiterer Studien im Einklang. Während sich diese Studie mit den CD3+ und CD8+ T-Lymphozyten befasste, wurden bereits auch andere Zellen des Immuninfiltrats beim Kolonkarzinom untersucht. Wie bereits in Bezug auf den Immunscore beschrieben, untersuchten Pagès et al. neben den CD8+ Lymphozyten die CD45RO+ T-Gedächtniszellen im Tumorzentrum und in der Infiltrationszone des Kolonkarzinoms und kategorisierten die Fälle gemäß dem Immunscore. Patienten mit einem IS4 wiesen in Bezug auf das 5-jährige krankheitsfreie Überleben und das Gesamtüberleben Raten von 95,2% und 86,2% auf, während die Raten der Patienten mit IS0 bei 25% und 27,5% lagen. (50) Pagès et al. führten neben immunhistochemischen - auch genetische Analysen mittels PCR durch und konnten zeigen, dass eine hohe Dichte der CD45RO+ Gedächtniszellen mit einer Hochregulierung von Genclustern einhergeht, die sich der CD8-Zytotoxizität (Perforine, Granzyme) oder der TH1 vermittelten Immunantwort (T-bet, IFN- γ , IL-12Rb 1, IL12Rb 2, IL-18) zuordnen lassen. (50) Diesen genannten Faktoren, gemeinsam mit der Infiltration zytotoxischer T-Lymphozyten und T- Gedächtniszellen im Tumorzentrum und in der Infiltrationszone, wurde auch von Fridman et al. eine positive Assoziation mit dem Überleben zugesprochen. Fridman et al. bezogen sich hierbei nicht ausschließlich auf das Kolonkarzinom, sondern auf Tumoren im Allgemeinen. (1) In den genetischen Analysen von Pages et al. bestand andererseits kein Zusammenhang zwischen der Infiltration mit CD45RO+ Gedächtniszellen und der Expression von Genen, die mit der TH2-Immunantwort assoziiert werden. (50) Auch die Analyse des Immunkontexts verschiedener Tumoren von Fridman et al. bestätigte, dass man bei TH2 Zellen ebenso wie bei TH17 Zellen und regulatorischen T-Zellen im Gegensatz zu den oben erwähnten Zellen keine allgemeine Aussage bezüglich der Auswirkungen auf das Überleben treffen kann. Ihre Bedeutung für die Prognose ist von Tumor zu Tumor unterschiedlich. Während

TH2-Zellen beispielsweise keine bestimmten Auswirkungen auf die Prognose des Kolonkarzinoms haben, wurde beim Ovarialkarzinom, beim Pankreaskarzinom und beim Magenkarzinom eine schlechtere Prognose mit der starken Infiltration dieser Zellen assoziiert. Eine starke TH17 Infiltration geht beim Kolonkarzinom mit einer eher schlechteren Prognose einher, während sie beim Ovarial- und Magenkarzinom positiv behaftet ist. (1)

In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie haben Park et al. den prognostischen Wert des K-M Scores mit dem des Immunscores verglichen. Für die Bestimmung des IS wurde immunhistochemisch genau wie in dieser Arbeit die Infiltrationsdichte der CD3+ und CD8+ Lymphozyten bestimmt. Beide Scoring Systeme korrelierten mit dem krankheitsspezifischen Überleben, wobei die prognostische Aussagekraft des Immunscores höher eingestuft werden konnte. Das krankheitsspezifische 5-Jahres-Überleben lag zwischen 61% bei IS0 und 94% bei IS4. Bei der Unterscheidung zwischen KM-low und KM-high lagen diese Werte bei 66% und 88%. Der IS konnte Patienten mit hohem und niedrigem K-M Score gemäß ihrem Überleben stratifizieren. Umgekehrt war hingegen keine weitere Stratifizierung mehr möglich. (102) Ein weiterer Versuch, das Outcome von Kolonkarzinompatienten zu prognostizieren, ist die Bestimmung der TSP (Tumour Stroma Percentage). Hierbei wird in mit H&E gefärbten Schnitten der prozentuale Anteil des Tumorstromas in der Infiltrationszone bestimmt, wobei Nekrose und Schleimareale ausgeschlossen werden. Ein hoher TSP geht mit verkürztem Überleben einher und wird als unabhängiger prognostischer Faktor gewertet. (102, 103) Park et al. konnten in ihrer Studie verdeutlichen, dass eine Kombination aus dem Immunoscore und der TSP die prognostische Aussagekraft nochmals erhöht. Bezüglich des 5-Jahres-Überleben konnten Werte zwischen 38% (IS = 0/1; hoher TSP) und 92% (IS4; niedriger TSP) ermittelt werden. Je stärker jedoch das Immuninfiltrat war, desto schwächer war sowohl der Anteil des Tumorstromas (TSP) als auch die prognostische Aussagekraft des TSP (102) Park et al. stellten die Vermutung auf, dass ein Verlust des Immuninfiltrats die Ausbreitung des Tumorstromas begünstigt. Dies ist auch im Einklang mit der Annahme dieser Studie bezüglich des positiven prognostischen Effekts der Immunzellen.

4.9 TNM-Immune – ein internationales Klassifikationssystem basierend auf dem Immunscore

Die Bedeutung eines Klassifikationssystems ist für Tumorpatienten enorm hoch, da sich hieraus im klinischen Alltag Prognosen und individuelle Therapien ableiten lassen. Das traditionelle TNM System der UICC hat seit Jahrzehnten Bestand, obwohl die Forschung bereits weit über den Tellerrand dieses Systems hinausblickt und sich gezeigt hat, dass die aus dem TNM-System abgeleiteten Prognosen oft nicht korrekt sind. So können beispielsweise Patienten mit weit fortgeschrittenen Karzinomen über lange Zeit stabil bleiben. Sogar Metastasen können sich spontan zurückbilden. Andererseits lassen sich bei Patienten mit lokalisierten Tumorstadien und kompletter Resektion in ca. 25% der Fälle unerwartete Rezidive oder eine extrem schnelle Progression der Krankheit beobachten.(52)

Eine 2011 von Mlecnik et al. durchgeführte multivariate Analyse konnte eine prognostische Überlegenheit des Immunscores (mit CD8+ und CD45RO+ Lymphozyten) gegenüber dem klassischen TNM System in Bezug auf krankheitsfreies Überleben, krankheitsspezifisches Überleben und Gesamtüberleben feststellen. (Abb. 26)

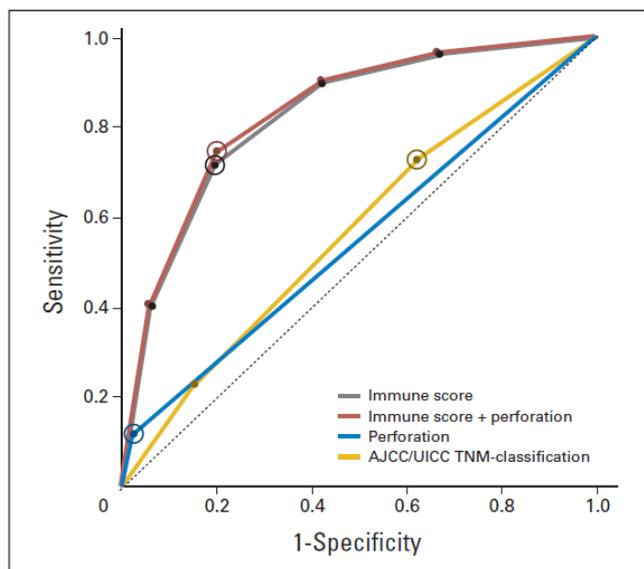


Abbildung 26: ROC Kurve für krankheitsfreies Überleben bei Patienten mit KHK im Stadium I bis III; Verglichen wurden TNM Staging, Darmperforation und Immunscore bezüglich ihres prognostischen Werts(104)

Patienten mit einer rezidivierenden KHK-Erkrankung wiesen in der Studie von Mlecnik et al. ein schwächeres Immuninfiltrat auf als solche Patienten, die kein Rezidiv erlitten. Zudem wurde festgestellt, dass mit dem Fortschreiten der Krankheit gemäß TNM, die Dichte der ITL abnahm. Umgekehrt betrachtet hatten die Patienten, die sowohl im

Tumorzentrum als auch in der Infiltrationszone eine starke Infiltration mit CD8+ Lymphozyten aufwies zu 60% nur ein CIS oder ein T1 Stadium. Nur 18% der Patienten im T4-Stadium wiesen hingegen eine hohe Infiltrationsdichte CD8+ Lymphozyten in beiden Regionen auf. (104)

Mlecnik et al. konnten verdeutlichen, dass auch eine vermeintlich harmlosere Krebserkrankung mit niedrigem TNM Stadium, bei entsprechend niedrigem Immunscore ein erhöhtes Rezidivrisiko aufweisen kann.

Galon et al. schlagen deshalb vor, den Immunscore der TNM-Klassifikation als festen Bestandteil hinzuzufügen und diese künftig als TNM-I (TNM-Immune) zu bezeichnen. Ein international angewandtes Klassifikationssystem zu implementieren, stellt eine große Herausforderung dar. Die Klassifizierung muss einfach, kostengünstig und standardisiert durchführbar sein und die Ergebnisse reproduzierbar und prognostisch signifikant sein. Der Immunscore wird durch ein weltweites Konsortium anhand von mehreren Tausend Patienten an 23 Zentren getestet und seine Umsetzbarkeit im klinischen Alltag geprüft. (49) Die hier vorliegende Arbeit war jedoch kein Teil dieser großen Studie. Dennoch soll der TNM-I genau wie diese Arbeit auf der Analyse der CD3+ und CD8+ Lymphozyten in Tumorzentrum und Infiltrationszone basieren. Bereits 2006, als Galon et al. die Marker CD3, CD8, GZMB, und CD45RO beim Kolonkarzinom unter die Lupe nahmen, stellten sie fest, dass die Analyse von zwei Tumorregionen (CT und IF) eine höhere prognostische Aussagekraft bezüglich des Überlebens aufweist, als die alleinige Betrachtung einer Tumorregion. (47)

Die Basis des Immunscores ist die numerische Bestimmung der Lymphozyten, was bei einem international angewandten Klassifikationssystem eine große Herausforderung darstellt. Generell ist die fehlende Reproduzierbarkeit bei der Überprüfung prognostischer Marker ein Problem, da bei der Beurteilung der immunhistochemisch gefärbten Präparate unterschiedliche Methoden verwendet werden. (105) Weichen die Lymphozytenzahlen schon beim selben Tumorpräparat bei der Analyse durch unterschiedliche Untersucher zu sehr voneinander ab, könnte der Immunscore auch nicht als Teil eines internationalen Klassifizierungssystems bestehen. Je breiter die Anwendung, desto objektiver und standardisierter muss letztlich vorgegangen werden. Die Fragen und Probleme, die sich bei der Implementierung des TNM-I ergeben treten auch bei der Beurteilung der Anwendbarkeit und Limitierung der in dieser Arbeit durchgeführten digitalen Bildanalyse auf.

4.10 Aufgeworfene Fragen und Konsequenzen der Arbeit

4.10.1 Anwendbarkeit und Limitierungen der Methode

Abschließend soll die Anwendbarkeit der vorgestellten Methode in der Praxis, sowie ihre Chancen und Limitierungen dargelegt werden. Des Weiteren gilt es zu klären, welche Fragen die Ergebnisse dieser Studie aufgeworfen haben und insbesondere welche Konsequenzen sich für die Diagnostik und Therapie des Kolonkarzinoms aus dieser Arbeit ergeben.

Zusammenfassend konnte diese Studie die gute Anwendbarkeit der von Väyrynen et al. (59) vorgestellten Methode der digitalen Bildanalyse aufzeigen. Die infiltrierenden Lymphozyten werden von ImageJ zuverlässig erfasst, was durch die hohe Konkordanz zwischen manuellem Zählen und den Ergebnissen der digitalen Bildanalyse bestätigt werden konnte. Wie oben bereits erwähnt, konnten Zweifel bezüglich der Subjektivität des selektierten Ausschnitts durch die hervorragende Übereinstimmung der Ergebnisse unterschiedlicher Untersucher, bzw. unterschiedlicher Ausschnitte eines Präparats aus dem Weg geräumt werden. Durch die einfache Handhabung des Programms ImageJ lässt sich seine Anwendung unproblematisch in den klinischen Alltag integrieren. Folglich kann und sollte die Analyse der CD3+ und CD8+ Lymphozyten ein fester Bestandteil der zukünftigen pathologischen Diagnostik des Kolonkarzinoms darstellen. Da der Zeitfaktor im klinischen Alltag eine große Rolle spielt, kann die Zeitersparnis gegenüber dem manuellen Zählen der Lymphozyten besonders hervorgehoben werden. Auch für weitere Studien, die die Dichte bestimmter Zellen mit Hilfe spezifischer Marker beurteilen, sind akkurate Bildanalysen mit hoher Reproduzierbarkeit und Zeitersparnis von großer Bedeutung. Insbesondere könnten sich verschiedene Studien durch die digitale Bildanalyse besser und objektiver vergleichen lassen, da das manuelle Zählen möglicherweise subjektive untersucherabhängige Ergebnisse erbringt.

Eine nennenswerte Limitierung der digitalen Bildanalyse stellt das Rektumkarzinom dar. Sowohl die Ergebnisse dieser Studie als auch der Immunscore beziehen sich auf das Kolonkarzinom. Nach einer neoadjuvante Radiochemotherapie, die häufig beim Rektumkarzinom eingesetzt wird, lässt sich der Immunscore nicht mehr anwenden, da Tumorzentrum und Infiltrationszone oft nicht mehr voneinander abgrenzbar sind. Das Problem der Abgrenzbarkeit dieser untersuchten Regionen stellt sich auch bei Tumorbiopsien. Aus diesem Grund ist der Immunscore in der aktuellen Form auch bei Biopsien nicht geeignet. (49)

4.10.2 Konsequenzen für Diagnostik und Therapie des Kolonkarzinoms

Letztlich stellt sich die wichtige Frage, welche Auswirkungen die Erkenntnisse dieser Studie für die Diagnostik und Therapie von Kolonkarzinompatienten haben können. Diese Arbeit bestätigt die Dichte intratumoraler Lymphozyten als unabhängigen und verlässlichen prognostischen Marker des Kolonkarzinoms, der genaueren Aufschluss über die Überlebensdauer der Patienten geben kann. Somit können bei der Tumordiagnostik Patienten mit geringen intratumoralen Dichten der CD3+ und CD8+ Lymphozyten umgehend als Risikopatienten mit erhöhtem Potential für einen schnelleren, aggressiveren Krankheitsverlauf identifiziert werden. Eine einfachere und jederzeit schnell durchführbare diagnostische Möglichkeit zur Identifikation von Risikopatienten, die zusätzlich genutzt werden kann, ist die Bestimmung der Lymphknotengröße im Präparat. Der in dieser Studie bestätigte Zusammenhang zwischen Immunantwort und Lymphknotengröße, erlaubt beim Auffinden von sehr wenigen und kleinen Lymphknoten im Tumorabflussgebiet die Schlussfolgerung auf eine mangelhafte Immunabwehr und somit die Einstufung als Risikopatient. Generell erlaubt die immer bessere Kenntnis des Tumors und der Abwehrlage des Patienten eine zunehmend personalisierte Therapie mit genau auf den einzelnen Patienten zugeschnittenen Behandlungsformen im Sinne einer „targeted therapy“. Dies ist ein Ansporn, die Mikroumgebung von Tumoren und besonders das Immuninfiltrat in Zukunft noch weiter zu untersuchen. Nach der diagnostischen Einstufung des Risikoprofils der Kolonkarzinompatienten ergibt sich die Frage des weiteren Procedere bei Patienten mit schwacher Immunantwort. Eine Möglichkeit ist die Ausweitung des Einsatzes einer Chemotherapie auf niedrigere Tumorstadien. Auf diese Weise kann möglicherweise verhindert werden, dass Patienten mit lokalem Tumorbefund aber mit geringem Immuninfiltrat untertherapiert bleiben und Rezidive erleiden. Bei anderen festgestellten Risikofaktoren, wie beispielsweise der insuffizienten Lymphknotenausbeute von weniger als 12 Lymphknoten, wird dies bereits gemäß der Leitlinie durchgeführt und die Chemotherapie bereits im Stadium II eingesetzt. (24)

Ein interessantes Feld, das weitere Studien bedarf, ist das Immuninfiltrat als Indikator für die Wirksamkeit der Chemotherapie. In einer Studie von Halama et al. korrelierte beispielsweise eine hohe Infiltrationsdichte CD8+ Lymphozyten in der Infiltrationszone hepatischer Metastasen des Kolonkarzinoms mit verbessertem Ansprechen auf die Chemotherapie. (106) Dennoch muss man sich hier die Frage stellen, ob das verlängerte Überleben aus dem besseren Ansprechen auf die Chemotherapie oder allgemein aus der

verstärkten körpereigenen Immunreaktion gegen den Tumor resultiert. Da die Chemotherapie im Allgemeinen eine Immunsuppression hervorruft, könnte man argumentieren, dass dieses Vorgehen nicht im Einklang mit den Erkenntnissen des prognostischen Vorteils eines aktiven Immunsystems steht. Eine alternative Herangehensweise an die Behandlung von Risikopatienten mit schwach ausgeprägter Immunantwort wäre demnach eine Aktivierung des Immunsystems. Bekannt ist dieses Vorgehen seit langem aus der Therapie des Harnblasenkarzinoms. Hierbei wird Bacillus Calmette-Guérin (BCG), der sonst als Tuberkulose Lebendimpfstoff verwendet wird, in den Tumor injiziert und löst eine lokale Entzündungsreaktion aus. (43) Die Krebsimmuntherapie ist weiterhin Gegenstand intensiver Forschung, wobei besonders die körpereigenen Abwehrmöglichkeiten unterstützt und verstärkt werden sollen. Insbesondere stützt sich die Therapie des malignen Melanoms bereits auf mehrere Verfahren der Immunaktivierung. (107) Beispielsweise führt die intravenöse Applikation von IL-21 sowohl in CD8+ T-Zellen als auch in CD56+ NK Zellen zu einer Hochregulation von Perforin und Granzym B, was die Immunantwort gegen den Tumor verstärken kann. (108) Eine weitere Variante, die körpereigene Immunantwort zu steigern, ist der Einsatz von Toll-like receptor 9 (TLR9) Agonisten, die im Gegensatz zu beispielsweise BCG auch systemisch eingesetzt werden können. TLR9 werden von unmethylierten Cytosin-phosphat-Guanin (CpG) Dinukleotiden aktiviert und initiieren die Reifung dendritischer Zellen sowie die Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen. Die sekundär freigesetzten Zytokine und Chemokine, wie Typ I Interferon, führen wiederum zu einer Vermehrung der TH1 T-Helferzellen und der zytotoxischen T-Zellen. (107, 109) Auch beim Kolonkarzinom hat man bereits versucht, sich ihre bedeutende Rolle in der Immunantwort gegen den Tumor therapeutisch zu Nutze zu machen. Die Applikation von IL-2 als Ergänzung zur konventionellen Chemotherapie konnte in Studien durch Steigerung sowohl der Immunantwort der T-, B, und NK-Zellen als auch der Apoptose der Tumorzellen das Überleben der Patienten verlängern. (110) Eine weitere vielversprechender Art der Krebsimmuntherapie für solide und hämatologische Tumoren ist die Immun-Checkpoint-Blockade. Dieses Verfahren stützt sich nicht wie einige andere bereits etablierte Verfahren auf die Erkennung bestimmter tumoraler Antigene, sondern fördert die körpereigene Immunreaktion gegen den Tumor. Der als erster zugelassene unter mittlerweile mehreren in Europa verfügbaren Checkpoint-Inhibitoren ist Ipilimumab; ein Antikörper, der CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte associated Protein 4) blockiert. CTLA4 befindet sich auf den T-Zellen und wirkt als entzündungshemmender Immun-Checkpoint, der die Immunantwort bremst und somit

eine überschießende Reaktion verhindert. Durch das Einwirken von Checkpoint-Inhibitoren wird dementsprechend das Gegenteil erreicht und die Immunantwort gegen den Tumor gesteigert. Ähnlich wirkt Pembrolizumab, ein PD-1 (programmed death-1) Checkpoint-Inhibitor. (111) Über den PD-1 Rezeptor auf den T-Zellen wird durch Ligandenbindung mit PD-L1 normalerweise ihre Apoptose verursacht, was durch den Checkpoint-Inhibitor verhindert wird. (110) Ipilimumab und Pembrolizumab sind beide für die Behandlung des metastasierten Melanoms zugelassen. Das Besondere an diesen Therapien ist die Tatsache, dass Tumoren durch Aktivierung genau dieser Signalwege in der Lage sind, die Immunantwort der T-Zellen abzuschwächen. Die Checkpoint-Inhibitoren schlagen die Tumoren folglich mit ihren eigenen Waffen. (111, 112) Anhand dieser Immuntherapien wird zudem die Bedeutung der Tumormikroumgebung für ihre Wirksamkeit ersichtlich. Tumoren mit starker T-Zell Infiltration sprechen besser auf Immuntherapien an, als solche mit geringem Immuninfiltrat. (113) Diese Erkenntnisse unterstreichen auch die Bedeutung dieser Studie. Eine genaue Kenntnis der Mikroumgebung des Kolonkarzinoms, besonders der CD3+ und CD8+ T-Lymphozyten ist ein wichtiger Schritt zu einer verbesserten und auf den individuellen Patienten abgestimmten Therapie. Des Weiteren hat sich gezeigt, dass Tumoren wie das Melanom oder auch das Bronchialkarzinom mit hohen Mutationsraten im Vergleich zum Normalgewebe besser auf diese Immuntherapien ansprechen. Den besonders heterogenen und wandelbaren Tumoren, die traditionellen Therapien oft entgehen, kann so erfolgreich entgegengetreten werden. (111, 112) Beim Kolonkarzinom wird die Rolle der Immun-Checkpoints und der Nutzen der Therapeutika kontrovers diskutiert. Bei Kolonkarzinomen mit wenig TIL und wie gemäß den Ergebnissen dieser Studie zu erwartender schlechter Prognosen wurden vermehrt PD-L1 Liganden im Tumorgewebe gefunden. (114) Dennoch wurde mit PD-1 Checkpoint Inhibitoren bei Kolonkarzinomen nicht der gewünschte Behandlungserfolg erzielt. Eine Ausnahme stellen Kolonkarzinome mit Mikrosatelliteninstabilität dar, die von einer Therapie mit Pembrolizumab profitieren konnten. (115) Aufgrund der bereits gewonnenen Erkenntnis der besseren Wirksamkeit der Checkpoint-Inhibitoren bei Tumoren mit hohen Mutationsraten sind diese Ergebnisse wenig überraschend. Kolonkarzinome mit Mikrosatelliteninstabilität sind für ihre hohe Immunogenität bekannt. (64) Auch diese Studie bestätigte sowohl eine höhere Dichte der ITL, als auch eine größere Anzahl an LN5 in der Gruppe der Kolonkarzinome mit Mikrosatelliteninstabilität.

Eine weitere vielversprechende Variante der Immuntherapie sind Krebsimpfstoffe, die eine gezielte Immunreaktion gegen den Tumor provozieren sollen. Auf Tumorzellen basierende Impfstoffe weisen oft das Problem auf, dass sie nicht immunogen genug sind, da die Tumorzellen mit den gesunden Körperzellen viele Antigene teilen und nur einige typisch für malignes Wachstum sind. Die Verwendung von bestimmten, mit dem Tumor assoziierten Peptiden kann die Immunreaktion bereits steigern. Mit dem Kolonkarzinom assoziierte Antigene sind unter anderem CEA, MUC1 (mucin 1) oder β -HCG (β -human chorionic gonadotrophin) (110) So konnte beispielsweise ein auf β -HCG basierender Impfstoff die Bildung von spezifischen Antikörpern induzieren und das Überleben von Patienten mit metastasiertem Kolonkarzinom verlängert werden. (116) Steigern lässt sich die Immunantwort zudem durch die Kombination des Impfstoffes mit einem Adjuvans, wie zB. einem sich nicht replizierenden Virus. (110)

Bei der adoptiven Immuntherapie werden den Tumorpatienten körpereigene Lymphozyten entnommen, und mittels Zytokinen wie IL-2 zusätzlich stimuliert, bevor sie dem Patient zurückinjiziert werden. Im Hinblick auf diese Studie ist die adoptive Immuntherapie besonders interessant, da die TIL aufgrund ihrer Prägung auf die Tumorantigene zwar besonders bevorzugt verwendet werden, sie aber bei weniger immunogenen Tumoren oft in nicht ausreichender Zahl vorhanden sind. (110) Beim vorbehandelten metastasierten Melanom konnten bereits Erfolge mit den aktivierten TIL erzielt werden. (117) Auch bei Kolonkarzinompatienten konnte durch die Anwendung von CIK (Zytokin - induzierte Killerzellen) als Ergänzung zur konventionellen Therapie das Überleben der Patienten verlängert werden. (118) Obwohl es zur Klärung dieser Frage weiterer Studien bedarf, ist es durchaus denkbar, dass Patienten, bei denen mittels digitaler Bildanalyse eine hohe Dichte der TIL festgestellt wurde, besonders für eine Therapie mit Zytokin- induzierten TIL in Frage kommen. Sollten sich derartige Therapien in Zukunft in der klinischen Praxis etablieren, wäre dies ein weiterer Schritt in Richtung einer personalisierten Medizin im Sinne einer „targeted therapy“ , die in Zukunft auch weiterhin immer mehr an Bedeutung im Kampf gegen bösartige Tumoren gewinnen wird.

5. Zusammenfassung

Hintergrund: Es ist bekannt, dass eine hohe Anzahl operativ entfernter und untersuchter Lymphknoten positiv mit der Prognose von Kolonkarzinompatienten korreliert. Gemäß der Hypothese dieser Studie ist dieser prognostische Vorteil primär nicht in einem exakteren Staging, sondern in einer aktiveren Immunantwort gegen Tumorzellen begründet. Diese äußert sich zum einen in einem stärkeren Immuninfiltrat und zum anderen in einer Vergrößerung der Lymphknoten, was ihr Auffinden erleichtert und die Lymphknotenausbeute dementsprechend erhöht. Ziel dieser Studie war es deshalb, den Zusammenhang zwischen Lymphknotengröße, Lymphknotenausbeute, der Dichte tumorinfiltrierender Lymphozyten und deren Auswirkungen auf die Prognose herzustellen.

Methoden: In die retrospektive Studie wurden 170 Fälle mit lymphknotennegativem Kolonkarzinom eingeschlossen. Mittels immunhistochemischer Färbung wurden die CD3+ und CD8+ Lymphozyten dargestellt und ihre Dichte mittels digitaler Bildanalyse sowohl im Tumorzentrum als auch in der Infiltrationszone des Tumors ermittelt. Um die Verlässlichkeit der digitalen Bildanalyse zu prüfen, wurden die Lymphozyten in einer Auswahl von Schnitten zusätzlich manuell gezählt und die entsprechenden Werte verglichen. Zudem erfolgte eine Kategorisierung der Fälle anhand eines von Galon und Pages entwickelten Immunscores.

Ergebnisse: In 81,8% der Schnittbilder konnte eine problemlose Bildanalyse mit den Standardeinstellungen der Software vorgenommen werden. Bei 8,4% der Bilder wurden die Einstellungsparameter angepasst, während bei 9,8% der Bilder eine manuelle Zählung notwendig war. Eine ausreichende Lymphknotenausbeute von mindestens 12 Lymphknoten, sowie eine höhere Anzahl großer Lymphknoten mit über 5 mm Durchmesser waren mit einer erhöhten Dichte der intratumoralen CD3+ und CD8+ Lymphozyten assoziiert. Die Überlebensanalysen wiesen einen Zusammenhang zwischen einer hohen Dichte der ITL bzw. einem hohen Immunscore und einem verlängerten krankheitsspezifischen Überleben auf. ($p = 0,024$) Bei Vorliegen eines IM 0 oder 1 betrug das durchschnittliche krankheitsspezifische Überleben 94 Monate, während es bei einem IM 2 bei 113 Monaten lag. In der Kohorte mit maximalem Immunscore von 3 wurde im Beobachtungszeitraum kein Endpunkt wie ein krebsbedingter Tod oder das Auftreten von Fernmetastasen erreicht.

Schlussfolgerung: Die Dichte der ITL und der daraus ermittelte Immunscore können als unabhängige prognostische Faktoren des Kolonkarzinoms gewertet werden. Zudem konnte eine deutliche Assoziation zwischen Lymphknotengröße, Lymphknotenausbeute und der Dichte tumorinfiltrierender Lymphozyten dargelegt werden. Ein aktiviertes Immunsystem, das sich in einem starken Entzündungsinfiltrat und vergrößerten Lymphknoten äußert, wirkt somit als konfundierende Variable zwischen einer hohen Lymphknotenausbeute und einer verbesserten Prognose. Die vorliegende Arbeit stützt die These, dass die Lymphknotengröße als der eigentlich prognostisch relevante Parameter aufgefasst werden kann, während die bislang als entscheidend interpretierte Zahl untersuchter Lymphknoten davon beeinflusst wird. Darüber hinaus ist diese Studie ein Anstoß, den Immunscore bei der Klassifizierung von Kolonkarzinomen als Ergänzung zum TNM-System routinemäßig miteinzubeziehen. Ein optimiertes Staging hat neben der Einschätzung der Prognose auch einen immensen Einfluss auf die weitere Therapieplanung und den zu erwartenden Krankheitsverlauf von Kolonkarzinompatienten. Mit der digitalen Bildanalyse, die im Rahmen dieser Studie ebenfalls erprobt wurde, konnte die praktische Durchführbarkeit im klinischen Alltag nachgewiesen werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):298-306.
2. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331:1565-70.
3. Märkl B, Rossle J, Arnholdt HM, Schaller T, Krammer I, Cacchi C, Jahnig H, Schenkirsch G, Spatz H, Anthuber M. The clinical significance of lymph node size in colon cancer. *Mod Pathol*. 2012;25(10):1413-22.
4. Märkl B, Schaller T, Krammer I, Cacchi C, Arnholdt HM, Schenkirsch G, Kretsinger H, Anthuber M, Spatz H. Methylene blue-assisted lymph node dissection technique is not associated with an increased detection of lymph node metastases in colorectal cancer. *Mod Pathol*. 2013;26(9):1246-54.
5. Barnes B, Kraywinkel K, Nowossadeck E, Schönfeld I, Starker A, Wienecke A, Wolf U. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. published on edoc: 2016-11-29T13:38:00Z
access: 2017-01-17T11:40:13Z: Robert Koch-Institut; 2016.
6. Schmoll HJ, Arnold D. Kolorektales Karzinom. In: Schmoll H-J, Höffken K, Possinger K, editors. *Kompendium Internistische Onkologie: Standards in Diagnostik und Therapie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2006. p. 3787-937.
7. Weitz J, Schalhorn A, Kadmon M, Büchler M, Krempien R. Kolon- und Rektumkarzinom. In: Hiddemann W, Bartram CR, editors. *Die Onkologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010. p. 848-97.
8. Remmele W, Klöppel G, Stolte M, Kreipe HH, Rüschoff J. *Pathologie: Verdauungstrakt und Peritoneum*: Springer Berlin Heidelberg; 2013.
9. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
10. Munding J, Tannapfel A. Pathogenese des sporadischen und hereditären Kolonkarzinoms. *Der Onkologe*. 2009;15(12):1182-92.
11. Schmoll H-J, Arnold D. Kolorektales Karzinom. In: Schmoll H-J, Höffken K, Possinger K, editors. *Kompendium Internistische Onkologie: Standards in Diagnostik und Therapie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2006. p. 5968-6000.
12. Layer P, Schmiegel W, Adler G, Fölsch U, Pox C, Sauerbruch T. Kolorektales Karzinom: Prävention und Früherkennung in der asymptomatischen Bevölkerung – Vorsorge bei Risikogruppen. *Dtsch Arztebl International*. 2000;97(34-35):2234-.
13. Füreder T, Agis H, Kornek G, Scheithauer W. Kolorektalkarzinom. *Wiener klinische Wochenschrift Education*. 2012;7(2):77-91.
14. Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, Clavel-Chapelon F, Kesse E, Nieters A, Boeing H, Tjønneland A, Overvad K, Martinez C, Dorransoro M, Gonzalez CA, Key TJ, Trichopoulou A, Naska A, Vineis P, Tumino R, Krogh V, Bueno-

de-Mesquita HB, Peeters PHM, Berglund G, Hallmans G, Lund E, Skeie G, Kaaks R, Riboli E. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *The Lancet*. 2003;361(9368):1496-501.

15. Freedman DM, Looker AC, Chang S-C, Graubard BI. Prospective Study of Serum Vitamin D and Cancer Mortality in the United States. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2007;99(21):1594-602.

16. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C, Brierley JD. *TNM Classification of Malignant Tumours*. Chichester, UNITED KINGDOM: John Wiley & Sons, Incorporated; 2016.

17. Wittekind C, Meyer H-J. *Tnm : Klassifikation Maligner Tumoren*. Somerset, GERMANY: John Wiley & Sons, Incorporated; 2013.

18. Stoop EM, de Haan MC, de Wijkerslooth TR, Bossuyt PM, van Ballegooijen M, Nio CY, van de Vijver MJ, Biermann K, Thomeer M, van Leerdam ME, Fockens P, Stoker J, Kuipers EJ, Dekker E. Participation and yield of colonoscopy versus non-cathartic CT colonography in population-based screening for colorectal cancer: a randomised controlled trial. *The Lancet Oncology*. 2012;13(1):55-64.

19. Benchimol S, Fuks A, Jothy S, Beauchemin N, Shirota K, Stanners CP. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell*. 1989;57(2):327-34.

20. Duffy MJ. Carcinoembryonic Antigen as a Marker for Colorectal Cancer: Is It Clinically Useful? *Clinical Chemistry*. 2001;47(4):624-30.

21. Kahi CJ, Imperiale TF, Juliar BE, Rex DK. Effect of Screening Colonoscopy on Colorectal Cancer Incidence and Mortality. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2009;7(7):770-5.

22. Baxter NN, Goldwasser MA, Paszat LF, Saskin R, Urbach DR, Rabeneck L. Association of Colonoscopy and Death From Colorectal Cancer. *Annals of Internal Medicine*. 2009;150(1):1-W.

23. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF). S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.0, 2017, AWMF-Registrierungsnummer: 021/007OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/> [cited 2018 03.04].

24. Benson AB, Schrag D, Somerfield MR, Cohen AM, Figueredo AT, Flynn PJ, Krzyzanowska MK, Maroun J, McAllister P, Van Cutsem E, Brouwers M, Charette M, Haller DG. American society of clinical oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2004;22(16):3408-19.

25. Thermann P, Seufferlein T. Aktuelle Therapie des Kolonkarzinoms. *Der Gastroenterologe*. 2010;5(1):57-71.

26. Lordick F, Mössner J. Aktuelle Standards in der Diagnostik und Therapie des Kolonkarzinoms. *Dtsch med Wochenschr*. 2017;142(07):487-90.

27. Goldstein NS. Lymph Node Recoveries From 2427 pT3 Colorectal Resection Specimens Spanning 45 Years: Recommendations for a Minimum Number of Recovered Lymph Nodes Based on Predictive Probabilities. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2002;26(2):179-89.
28. Maurel J, Launoy G, Grosclaude P, Gignoux M, Arveux P, Mathieu-Daudé H, Raverdy N, Faivre J. Lymph node harvest reporting in patients with carcinoma of the large bowel. *Cancer*. 1998;82(8):1482-6.
29. Chang GJ, Rodriguez-Bigas MA, Skibber JM, Moyer VA. Lymph Node Evaluation and Survival After Curative Resection of Colon Cancer: Systematic Review. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2007;99(6):433-41.
30. Feinstein AR, Sosin DM, Wells CK. The Will Rogers phenomenon. Stage migration and new diagnostic techniques as a source of misleading statistics for survival in cancer. *New England Journal of Medicine*. 1985;312(25):1604-8.
31. Märkl B. Stage migration vs immunology: The lymph node count story in colon cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 2015;21(43):12218-33.
32. Abes R, Gelize E, Fridman WH, Teillaud JL. Long-lasting antitumor protection by anti-CD20 antibody through cellular immune response. *Blood*. 2010;116:926-34.
33. Johnson PM, Malatjalian D, Porter GA. Adequacy of nodal harvest in colorectal cancer: A consecutive cohort study. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2002;6(6):883-8.
34. Märkl B, Arnholdt H. [Lymph node staging in gastrointestinal cancer. Combination of methylene blue-assisted lymph node dissection and ex vivo sentinel lymph node mapping]. *Pathologe*. 2012;33 Suppl 2:325-30.
35. Basten O, Bandorski D, Bismarck C, Neumann K, Fisseler-Eckhoff A. Acetonkompression. *Der Pathologe*. 2010;31(3):218-24.
36. Ricciardi R, Madoff RD, Rothenberger DA, Baxter NN. Population-Based Analyses of Lymph Node Metastases in Colorectal Cancer. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2006;4(12):1522-7.
37. Scott KWM, Grace RH. Detection of lymph node metastases in colorectal carcinoma before and after fat clearance. *British Journal of Surgery*. 1989;76(11):1165-7.
38. Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. *Physiologie des Menschen : mit Pathophysiologie*. Springer-Lehrbuch. 31., überarbeitete und aktualisierte Auflage ed. Berlin, Heidelberg 2011.
39. Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie : 10 Tabellen*. 3., vollst. überarb. Aufl. ed. Stuttgart u.a. 2009.
40. Rogena EA, Simbiri KO, De Falco G, Leoncini L, Ayers L, Nyagol J. A review of the pattern of AIDS defining, HIV associated neoplasms and premalignant lesions diagnosed from 2000–2011 at Kenyatta National Hospital, Kenya. *Infectious Agents and Cancer*. 2015;10(1):28.

41. Trinchieri G. Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:677-706.
42. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN[gamma] and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 2001;410(6832):1107-11.
43. Koyama A. Re: History of Bacillus Calmette-Guerin and Bladder Cancer: An Immunotherapy Success Story: H. W. Herr and A. Morales *J Urol* 2008; 179: 53–56. *The Journal of Urology.* 2008;180(5):2255.
44. Elmas N, Killi RM, Sever A. Colorectal carcinoma: radiological diagnosis and staging. *European Journal of Radiology.* 2002;42(3):206-23.
45. Klintrup K, Makinen JM, Kauppila S, Vare PO, Melkko J, Tuominen H, Tuppurainen K, Makela J, Karttunen TJ, Makinen MJ. Inflammation and prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2005;41(17):2645-54.
46. Pages F. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2005;353:2654-66.
47. Galon J. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 2006;313:1960-4.
48. Koelzer VH, Lugli A, Dawson H, Hadrich M, Berger MD, Borner M, Mallaev M, Galvan JA, Amsler J, Schnuriger B, Zlobec I, Inderbitzin D. CD8/CD45RO T-cell infiltration in endoscopic biopsies of colorectal cancer predicts nodal metastasis and survival. *J Transl Med.* 2014;12:81.
49. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, Lugli A, Zlobec I, Hartmann A, Bifulco C, Nagtegaal ID, Palmqvist R, Masucci GV, Botti G, Tatangelo F, Delrio P, Maio M, Laghi L, Grizzi F, Asslaber M, D'Arrigo C, Vidal-Vanaclocha F, Zavadova E, Chouchane L, Ohashi PS, Hafezi-Bakhtiari S, Wouters BG, Roehrl M, Nguyen L, Kawakami Y, Hazama S, Okuno K, Ogino S, Gibbs P, Waring P, Sato N, Torigoe T, Itoh K, Patel PS, Shukla SN, Wang Y, Kopetz S, Sinicrope FA, Scripcariu V, Ascierto PA, Marincola FM, Fox BA, Pages F. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol.* 2014;232(2):199-209.
50. Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, Lagorce C, Wind P, Marliot F, Bruneval P, Zatloukal K, Trajanoski Z, Berger A, Fridman WH, Galon J. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(35):5944-51.
51. Galon J, Pagès F, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, Zlobec I, Berger A, Bifulco C, Botti G, Tatangelo F, Britten CM, Kreiter S, Chouchane L, Delrio P, Arndt H, Asslaber M, Maio M, Masucci GV, Mihm M, Vidal-Vanaclocha F, Allison JP, Gnjatic S, Hakansson L, Huber C, Singh-Jasuja H, Ottensmeier C, Zwierzina H, Laghi L, Grizzi F, Ohashi PS, Shaw PA, Clarke BA, Wouters BG, Kawakami Y, Hazama S, Okuno K, Wang E, O'Donnell-Tormey J, Lagorce C, Pawelec G, Nishimura MI, Hawkins R, Lapointe R, Lundqvist A, Khleif SN, Ogino S, Gibbs P, Waring P, Sato N, Torigoe T, Itoh K, Patel PS, Shukla SN, Palmqvist R, Nagtegaal ID, Wang Y, D'Arrigo C, Kopetz S, Sinicrope FA, Trinchieri G, Gajewski TF, Ascierto PA, Fox BA. Cancer classification

using the Immunoscore: a worldwide task force. *Journal of Translational Medicine*. 2012;10:205-.

52. Mlecnik B, Bindea G, Pages F, Galon J. Tumor immunosurveillance in human cancers. *Cancer Metastasis Rev*. 2011;30:5-12.

53. Böcker W, Denk H, Heitz PU, editors. *Pathologie : mit 164 Tabellen; [Online-Zugang + interaktive Extras]*. 3., völlig überarb. Aufl. ed. München ; Jena: Elsevier, Urban und Fischer; 2006.

54. Ueno H, Hashiguchi Y, Shimazaki H, Shinto E, Kajiwara Y, Nakanishi K, Kato K, Maekawa K, Miyai K, Nakamura T, Yamamoto J, Hase K. Objective Criteria for Crohn-like Lymphoid Reaction in Colorectal Cancer. *American Journal of Clinical Pathology*. 2013;139(4):434-41.

55. Graham DM, Appelman HD. Crohn's-like lymphoid reaction and colorectal carcinoma: a potential histologic prognosticator. *Mod Pathol*. 1990;3(3):332-5.

56. Jass JR, Ajioka Y, Allen JP, Chan YF, Cohen RJ, Nixon JM, Radojkovic M, Restall AP, Stables SR, Zwi LJ. Assessment of invasive growth pattern and lymphocytic infiltration in colorectal cancer. *Histopathology*. 1996;28(6):543-8.

57. Jass JR, Love SB, Northover JMA. A NEW PROGNOSTIC CLASSIFICATION OF RECTAL CANCER. *The Lancet*. 1987;329(8545):1303-6.

58. Luo H-Y, Xu R-H. Predictive and prognostic biomarkers with therapeutic targets in advanced colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2014;20(14):3858-74.

59. Vayrynen JP, Vornanen JO, Sajanti S, Bohm JP, Tuomisto A, Makinen MJ. An improved image analysis method for cell counting lends credibility to the prognostic significance of T cells in colorectal cancer. *Virchows Arch*. 2012;460(5):455-65.

60. Imagej. Particle Analysis 2017 [updated 22.03.17. Available from: http://imagej.net/Particle_Analysis.

61. Imagej. Thresholding 2016 [Available from: <http://imagej.net/Thresholding>.

62. Otago Center for Confocal Microscopy. ImageJ - Thresholding 2010 [Available from: <http://occm.otago.ac.nz/resources/ImageJ-Thresholding.pdf>.

63. Schemper M, Smith TL. A note on quantifying follow-up in studies of failure time. *Controlled Clinical Trials*. 1996;17(4):343-6.

64. Richman S. Deficient mismatch repair: Read all about it (Review). *Int J Oncol*. 2015;47(4):1189-202.

65. Dougan M, Dranoff G. Immune Therapy for Cancer. *Annual Review of Immunology*. 2009;27(1):83-117.

66. Ehrlich P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk*. 1909(5):273-90.

67. Burnet M. Cancer—A Biological Approach: III. Viruses Associated with Neoplastic Conditions. IV. Practical Applications. *British Medical Journal*. 1957;1(5023):841-7.
68. Thomas L. Delayed hypersensitivity in health and disease. HS Lawrence (Ed) *Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States* Hoeber-Harper. 1959:529-32.
69. Stutman O. Tumor Development after 3-Methylcholanthrene in Immunologically Deficient Athymic-Nude Mice. *Science*. 1974;183(4124):534-6.
70. Ikehara S, Pahwa RN, Fernandes G, Hansen CT, Good RA. Functional T cells in athymic nude mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(3):886-8.
71. Herberman RB, Holden HT. Natural cell-mediated immunity. *Adv Cancer Res*. 1978;27:305-77.
72. Engel A-M, Svane IM, Mouritsen S, Rygaard J, Clausen J, Werdelin O. Methylcholanthrene-induced sarcomas in nude mice have short induction times and relatively low levels of surface MHC class I expression. *APMIS*. 1996;104(7-8):629-39.
73. Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN γ receptors. *Immunity*. 1994;1(6):447-56.
74. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD. Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(13):7556-61.
75. Vajdic CM, van Leeuwen MT. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *International Journal of Cancer*. 2009;125(8):1747-54.
76. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:329-60.
77. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
78. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646-74.
79. Swanson RS, Compton CC, Stewart AK, Bland KI. The Prognosis of T3N0 Colon Cancer Is Dependent on the Number of Lymph Nodes Examined. *Annals of Surgical Oncology*. 2003;10(1):65-71.
80. Sloothaak DAM, Grewal S, Doornewaard H, van Duijvendijk P, Tanis PJ, Bemelman WA, van der Zaag ES, Buskens CJ. Lymph node size as a predictor of lymphatic staging in colonic cancer. *British Journal of Surgery*. 2014;101(6):701-6.
81. Märkl B, Schaller T, Kokot Y, Endhardt K, Kretsinger H, Hirschbühl K, Aumann G, Schenkirsch G. Lymph node size as a simple prognostic factor in node negative colon cancer and an alternative thesis to stage migration. *The American Journal of Surgery*. 2016;212(4):775-80.

82. KIM YW, JAN KM, JUNG DH, CHO MY, KIM NK. Histological Inflammatory Cell Infiltration Is Associated with the Number of Lymph Nodes Retrieved in Colorectal Cancer. *Anticancer Research*. 2013;33(11):5143-50.
83. Pages F. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27:5944-51.
84. Väyrynen JP, Tuomisto A, Klintrup K, Makela J, Karttunen TJ, Makinen MJ. Detailed analysis of inflammatory cell infiltration in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2013;109(7):1839-47.
85. Li B, Li T, Pignon JC, Wang B, Wang J, Shukla SA, Dou R, Chen Q, Hodi FS, Choueiri TK, Wu C, Hacohen N, Signoretti S, Liu JS, Liu XS. Landscape of tumor-infiltrating T cell repertoire of human cancers. *Nature genetics*. 2016;48(7):725-32.
86. Brown SD, Raeburn LA, Holt RA. Profiling tissue-resident T cell repertoires by RNA sequencing. *Genome Medicine*. 2015;7:125.
87. Schrama D, Ritter C, Becker JC. T cell receptor repertoire usage in cancer as a surrogate marker for immune responses. *Seminars in Immunopathology*. 2017;39(3):255-68.
88. Linnemann C, Mezzadra R, Schumacher TN. TCR repertoires of intratumoral T-cell subsets. *Immunological reviews*. 2014;257(1):72-82.
89. Pihl E, Nairn RC, Milne BJ, Cuthbertson AM, Hughes ES, Rollo A. Lymphoid hyperplasia: a major prognostic feature in 519 cases of colorectal carcinoma. *The American Journal of Pathology*. 1980;100(2):469-80.
90. Patt DJ, Brynes RK, Vardiman JW, Coppleson LW. Mesocolic lymph node histology is an important prognostic indicator for patients with carcinoma of the sigmoid colon: An immunomorphologic study. *Cancer*. 1975;35(5):1388-97.
91. George S, Primrose J, Talbot R, Smith J, Mullee M, Bailey D, du Boulay C, Jordan H. Will Rogers revisited: prospective observational study of survival of 3592 patients with colorectal cancer according to number of nodes examined by pathologists. *Br J Cancer*. 2006;95(7):841-7.
92. Belt EJT, te Velde EA, Krijgsman O, Brosens RPM, Tijssen M, van Essen HF, Stockmann HBAC, Bril H, Carvalho B, Ylstra B, Bonjer HJ, Meijer GA. High Lymph Node Yield is Related to Microsatellite Instability in Colon Cancer. *Annals of Surgical Oncology*. 2012;19(4):1222-30.
93. Søreide K, Nedrebø BS, Søreide JA, Slewa A, Kørner H. Lymph Node Harvest in Colon Cancer: Influence of Microsatellite Instability and Proximal Tumor Location. *World Journal of Surgery*. 2009;33(12):2695-703.
94. Schwitalle Y, Kloor M, Eiermann S, Linnebacher M, Kienle P, Knaebel HP, Tariverdian M, Benner A, von Knebel Doeberitz M. Immune Response Against Frameshift-Induced Neopeptides in HNPCC Patients and Healthy HNPCC Mutation Carriers. *Gastroenterology*. 134(4):988-97.
95. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol*. 2005;23(3):609-18.

96. Ogino S, Nosho K, Irahara N, Meyerhardt JA, Baba Y, Shima K, Glickman JN, Ferrone CR, Mino-Kenudson M, Tanaka N, Dranoff G, Giovannucci EL, Fuchs CS. Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. *Clin Cancer Res.* 2009;15(20):6412-20.
97. Schneider NI, Langner C. Prognostic stratification of colorectal cancer patients: current perspectives. *Cancer Manag Res.* 2014;6:291-300.
98. Zafirellis K, Agrogiannis G, Zachaki A, Gravani K, Karameris A, Kombouras C. Prognostic Significance of VEGF Expression Evaluated by Quantitative Immunohistochemical Analysis in Colorectal Cancer. *Journal of Surgical Research.* 2008;147(1):99-107.
99. Curran S, Dundas SR, Buxton J, Leeman MF, Ramsay R, Murray GI. Matrix Metalloproteinase/Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinase Phenotype Identifies Poor Prognosis Colorectal Cancers. *Clinical Cancer Research.* 2004;10(24):8229-34.
100. Markl B, Hardt J, Franz S, Schaller T, Schenkirsch G, Kriening B, Hoffmann R, Ruth S. Tumor Budding, uPA, and PAI-1 in Colorectal Cancer: Update of a Prospective Study. *Gastroenterology research and practice.* 2017;2017:6504960.
101. Suzuki A, Masuda A, Nagata H, Kameoka S, Kikawada Y, Yamakawa M, Kasajima T. Mature dendritic cells make clusters with T cells in the invasive margin of colorectal carcinoma. *The Journal of Pathology.* 2002;196(1):37-43.
102. Park JH, McMillan DC, Edwards J, Horgan PG, Roxburgh CS. Comparison of the prognostic value of measures of the tumor inflammatory cell infiltrate and tumor-associated stroma in patients with primary operable colorectal cancer. *Oncoimmunology.* 2016;5(3):e1098801.
103. Park JH, Richards CH, McMillan DC, Horgan PG, Roxburgh CSD. The relationship between tumour stroma percentage, the tumour microenvironment and survival in patients with primary operable colorectal cancer. *Annals of Oncology.* 2014;25(3):644-51.
104. Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, Bruneval P, Trajanoski Z, Fridman WH, Pages F, Galon J. Histopathologic-Based Prognostic Factors of Colorectal Cancers Are Associated With the State of the Local Immune Reaction. *J Clin Oncol.* 2011.
105. Walker RA. Quantification of immunohistochemistry—issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. *Histopathology.* 2006;49(4):406-10.
106. Halama N, Michel S, Kloor M, Zoernig I, Benner A, Spille A, Pommerencke T, von Knebel DM, Folprecht G, Lubber B, Feyen N, Martens UM, Beckhove P, Gnjatic S, Schirmacher P, Herpel E, Weitz J, Grabe N, Jaeger D. Localization and density of immune cells in the invasive margin of human colorectal cancer liver metastases are prognostic for response to chemotherapy. *Cancer Res.* 2011;71(17):5670-7.
107. Dougan M, Dranoff G. Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:83-117.

108. Frederiksen KS, Lundsgaard D, Freeman JA, Hughes SD, Holm TL, Skrumsager BK, Petri A, Hansen LT, McArthur GA, Davis ID, Skak K. IL-21 induces in vivo immune activation of NK cells and CD8+ T cells in patients with metastatic melanoma and renal cell carcinoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2008;57(10):1439-49.
109. Krieg AM. Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer. *Oncogene*. 2008;27:161.
110. Kit O.I. KEY, Novikova I.A., Maksimov A.Y., Filippova S.Y., Grankina A.O., Zlatnik E.Y. Colorectal Cancer Immunotherapy: Current State and Prospects (Review). *Sovremennye tehnologii v medicine*. 2017;9(3):138-50
111. Pennock GK, Chow LQ. The Evolving Role of Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Treatment. *Oncologist*. 2015;20(7):812-22.
112. Wölfel T. Grundlagen der Krebsimmuntherapie. *Der Onkologe*. 2017;23(10):807-14.
113. Gajewski TF, Woo S-R, Zha Y, Spaapen R, Zheng Y, Corrales L, Spranger S. Cancer immunotherapy strategies based on overcoming barriers within the tumor microenvironment. *Current Opinion in Immunology*. 2013;25(2):268-76.
114. Hua D, Sun J, Mao Y, Chen LJ, Wu YY, Zhang XG. B7-H1 expression is associated with expansion of regulatory T cells in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2012;18(9):971-8.
115. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, Skora AD, Lubner BS, Azad NS, Laheru D, Biedrzycki B, Donehower RC, Zaheer A, Fisher GA, Crocenzi TS, Lee JJ, Duffy SM, Goldberg RM, de la Chapelle A, Koshiji M, Bhajee F, Huebner T, Hruban RH, Wood LD, Cuka N, Pardoll DM, Papadopoulos N, Kinzler KW, Zhou S, Cornish TC, Taube JM, Anders RA, Eshleman JR, Vogelstein B, Diaz LAJ. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *New England Journal of Medicine*. 2015;372(26):2509-20.
116. Moulton HM, Yoshihara PH, Mason DH, Iversen PL, Triozzi PL. Active Specific Immunotherapy with a β -Human Chorionic Gonadotropin Peptide Vaccine in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. Antibody Response Is Associated with Improved Survival. 2002;8(7):2044-51.
117. Rosenberg SA. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2011;17:4550-7.
118. Zhang J, Zhu L, Zhang Q, He X, Yin Y, Gu Y, Guo R, Lu K, Liu L, Liu P, Shu Y. Effects of cytokine-induced killer cell treatment in colorectal cancer patients: A retrospective study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2014;68(6):715-20.

7. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Altersstandardisierte Neuerkrankungen des Kolonkarzinoms in Deutschland zwischen 1999 und 2013(5)
- Abbildung 2: Epidemiologische Kennzahlen des Kolonkarzinoms (2013) (5)
- Abbildung 3: Entwicklungsschritte vom normalen Darmepithel zum Kolonkarzinom (6)
- Abbildung 4: CD3 Immunfärbung eines Kolonkarzinompräparats zur Evaluierung der Infiltrationsdichte der T-Lymphozyten im Tumorzentrum und in der Infiltrationszone. Die Rechtecke markieren die für die digitale Lymphozytenzählung ausgewählten Bereiche.
- Abbildung 5: Mögliche Einstellungen der digitalen Bildanalyse mit ImageJ
- Abbildung 6: Selektion der minimalen Zellgröße, die von ImageJ erkannt werden soll
- Abbildung 7: Oben: Ausschnitte eines Kolonkarzinoms im Tumorzentrum; Unten: die entsprechenden von ImageJ kreierte Overlays zur Lymphozytenzählung; (CD3 Immunfärbung, x20)
- Abbildung 8: Einstellung der Schwellenwerte
- Abbildung 9: Lineare Regression: Manuelles Zählen der drei Untersucher BM, TS, und JW vs. Digitale Bildanalyse
- Abbildung 10: Lineare Regression: Manuellen Zählen vs. Digitale Bildanalyse; Beim manuellen Zählen wurde der Durchschnittswert der Ergebnisse der drei Untersucher verwendet
- Abbildung 11: Durchschnittliche Anzahl an CD3+ und CD8+ Lymphozyten jeweils in Tumorzentrum (CT) und Infiltrationszone (IF)
- Abbildung 12: Vergleich der Infiltrationsdichte CD3+ Lymphozyten im Tumorzentrum und in der Infiltrationszone
- Abbildung 13: Vergleich der Infiltrationsdichte CD8+ Lymphozyten im Tumorzentrum und in der Infiltrationszone

Abbildung 14: Kolonkarzinom mit stark ausgeprägter Lymphozyteninfiltration (A, H&E, x 100); starke Infiltration mit T-Lymphozyten im Stroma und auf dem neoplastischen Epithel (B, CD3 Immunfärbung, x 100); Kolonkarzinom mit schwacher intratumoraler Lymphozyteninfiltration (C, H&E, x 100); vereinzelte T-Lymphozyten im Stroma und keine Zellen auf dem neoplastischen Epithel (D, CD3 Immunfärbung, x 100)

Abbildung 15: Durchschnittliche Anzahl intratumoraler Lymphozyten (ITL) bei Fällen mit und ohne Crohn-ähnlicher Entzündung

Abbildung 16: Lymphozytendichte bei suffizienter und insuffizienter Lymphknotenausbeute

Abbildung 17: Intratumorale Lymphozyten im Vergleich zur Lymphknotenausbeute

Abbildung 18: Dichte der TIL verglichen mit dem MMR-Status (MMR-P = MMR-Proficient; MMR-D = MMR-Deficient)

Abbildung 19: Durchschnittliche Anzahl der LN5 verglichen mit dem MMR-Status (MMR-P = MMR-Proficient; MMR-D = MMR-Deficient)

Abbildung 20: Kaplan-Meier Kurve bezüglich des krankheitsspezifischen Überlebens bei Patientengruppen mit unterschiedlicher Anzahl an Lymphknoten > 5mm (LN5)

Abbildung 21: ROC-Kurve CD3-CT

Abbildung 22: ROC-Kurve: CD3-IF

Abbildung 23: Kaplan-Meier-Kurve bezüglich des krankheitsspezifischen Überlebens der Patienten mit unterschiedlichem Immunscore (IM). Die Gruppe 1 beinhaltet IS 0 und IS 1; (p=0,024)

Abbildung 24: Kaplan-Meier Kurve des krankheitsspezifischen Überlebens der Patienten mit intaktem MMR- System (Gruppe 1 fasst die Immunscores 0 und 1 zusammen) (p=0,105)

Abbildung 25: Kaplan-Meier Kurve des krankheitsspezifischen Überlebens der Patienten mit nicht intaktem MMR- System (Gruppe 1 fasst die Immunscores 0 und 1 zusammen ($p=0,017$))

Abbildung 26: ROC Kurve für krankheitsfreies Überleben bei Patienten mit KRK im Stadium I bis III; Verglichen wurden TNM Staging, Darmperforation und Immunscore bezüglich ihres prognostischen Werts (100)

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung gemäß der Pathogenese des Kolonkarzinoms (10)

Tabelle 2: TNM – Klassifikation(UICC, 2016)(16)

Tabelle 3: Einteilung nach UICC (2016) (16)

Tabelle 4: Ausschnitt der angelegten Exceltabelle mit den eingetragenen Werten der

Lymphozytenzahlen der 8 Kategorien CD3CT1, CD3CT2, CD3IF1,

CD3IF2, CD8CT1, CD8CT2, CD8IF1, CD8IF2

Tabelle 5: Klinikopathologische Daten; (IM = Immunscore; LK = Lymphknoten;

MMR-P = Mismatch repair proficient; MMR-D = mismatch repair deficient;

NC = wegen zu geringer Stichprobenzahl nicht berechnet)

Tabelle 6: Intratumorale T-Lymphozytendichte in verschiedenen LN5-Kategorien

(Durchschnitt \pm Standardabweichung, mm²)

9. Abkürzungsverzeichnis

IEN	Intraepitheliale Neoplasie
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
MMR	Mismatch Repair
MMR-D	Mismatch Repair Deficient
MMR-P	Mismatch Repair Proficient
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
KRK	Kolorektales Karzinom
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
ITL	Intratumorale Lymphozyten
CT	Tumorzentrum
IF	Infiltrationszone
LK	Lymphknoten
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
IM/IS	Immunscore (IS wurde in einigen der zitierten Studien verwendet)
CSS	Cancer Specific Survival (krankheitsspezifisches Überleben)
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
HNPCC	Hereditäres nichtpolypöses Kolonkarzinom Syndrom
CEA	Carcinoembryonales Antigen
FOBT	Fecal Occult Blood Test
UICC	Union for International Cancer Control

10. Danksagung

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Bruno Märkl für die sowohl fachlich als auch menschlich herausragende Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Ich danke Ihnen von ganzem Herzen für die Ermöglichung dieser Arbeit und für das unübertroffene Maß an Zuspruch und Unterstützung, dass Sie mir entgegen gebracht haben.

Mein Dank gilt auch dem gesamten Team des Instituts für Pathologie für ihre große Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung meiner Arbeit. Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Elfriede Schwarz, die mich mit viel Geduld und Kompetenz in die Laborarbeiten eingeführt hat.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Freund für ihre uneingeschränkte Unterstützung, Bestärkung und Motivierung bedanken, die für mich und für die Fertigstellung dieser Arbeit einen unschätzbaren Wert hatten.

Eidesstattliche Versicherung

Wieberneit, Johanna

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Immunhistochemische Analyse tumorinfiltrierender Lymphozyten (TIL) der T-Zellreihen CD3 und CD8 beim nodal-negativen Kolonkarzinom mittels automatisierter Bilddatenauswertung und deren prognostische Bedeutung

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Frankfurt, den 21.06.2018

Ort, Datum

Johanna Wieberneit

Unterschrift Doktorandin/Doktorand