

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein- und Abdominalchirurgie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

*Die prognostische Bedeutung von regulatorischen T-Zellen in der
Festlegung von Therapiekonzepten beim Rektumkarzinom*

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

David Michael Wohland
aus Spaichingen

Mainz, 2011

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 27. 03. 2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	6
1. Einleitung	8
1.1 Epidemiologie	8
1.2 Definition des Rektumkarzinoms als eigenständige Entität	8
1.3 Einteilung.....	9
1.4 Diagnostik und Staging	11
1.5 Therapie.....	13
1.5.1 Radikale Operation.....	13
1.5.2 Postoperative / adjuvante Therapie	14
1.5.3 Präoperative / neoadjuvante Therapie.....	14
1.5.4 Lokale transanale Exzision	15
1.5.4.1 TEM bei T1-low-risk-Karzinomen	15
1.5.4.2 TEM bei fortgeschritteneren Karzinomen	17
1.6 Prognostische Faktoren.....	17
1.6.1 Prognostische Faktoren für das Gesamtüberleben	17
1.6.2 Wahrscheinlichkeit für vorhandene Lymphknotenmetastasen	19
1.7 Tumorerfiltrierende Lymphozyten (TILs).....	19
1.8 Die regulatorischen T-Lymphozyten	21
1.8.1 Entdeckung und Geschichte.....	21
1.8.2 Definition.....	22
1.8.3 Entstehung und Typen	23
1.8.4 Funktion	23
1.8.4.1 Der Einsatz von membrangebundenen Liganden und Zell-Zell-Kontakten	24
1.8.4.2 Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen	24
1.8.4.3 Apoptoseinduktion.....	25
1.8.5 Plastizität, Th17-Transformation	26

1.8.6	Tregs und Tumortoleranz.....	27
1.8.7	Bedeutung als therapeutischer Ansatzpunkt	28
1.8.8	Bedeutung als prognostischer Faktor	30
1.9	Fragestellung	30
2.	Material und Methoden.....	32
2.1	Patientenkollektiv.....	32
2.2	Material	33
2.3	Herstellung der Pufferlösungen	35
2.3.1	EDTA-Puffer für die hitzeinduzierte Antigendemaskierung	35
2.3.2	Citrat-Puffer für die hitzeinduzierte Antigendemaskierung.....	35
2.3.3	TRIS-gepufferte 0,9 % Kochsalzlösung (TBS) als Reaktionsmedium .	35
2.4	Auswahl und Anfertigung der Schnitte	36
2.5	Immunhistochemische Färbung.....	36
2.5.1	Prinzip.....	36
2.5.2	Durchführung	37
2.5.3	Schematisches Färbeprotokoll.....	39
2.6	Datenerhebung.....	39
2.7	Statistische Auswertung.....	42
3.	Ergebnisse	44
3.1	Charakterisierung des Patientenkollektivs.....	44
3.2	Beschreibung der verschiedenen Färbungen	45
3.2.1	Färbecharakteristik	45
3.2.2	Verteilung der positiv gefärbten Zellen	46
3.3	Korrelation mit klinischen / pathologischen Parametern.....	47
3.3.1	Tumorstadium.....	47
3.3.2	Lymphknotenstatus.....	48
3.3.3	Histologisches Grading.....	49

3.3.4	Fernmetastasen	50
3.3.5	Lokalrezidive.....	52
3.4	Überlebenszeitanalyse	55
3.4.1	Univariate Analyse des lokalrezidivfreien Überlebens	55
3.4.2	Univariate Analyse des Gesamtüberlebens	57
3.4.3	Multivariate Cox-Regression	57
3.4.4	Anpassung des lokalen Signifikanzniveaus	60
4.	Diskussion	62
4.1	Bisher bekannte Ergebnisse beim kolorektalen Karzinom	63
4.2	Vergleichbarkeit der einzelnen Studien	65
4.3	Interpretation und Gegenüberstellung der eigenen Ergebnisse	66
4.4	Synopsis	72
4.5	Kritische Betrachtung der Ergebnisse	74
4.6	Mögliche Anwendungsbereiche.....	74
4.6.1	Verbesserung der Patientenselektion zur TEM	75
4.6.2	Ausweitung der TEM nach nRCT auf fortgeschrittenere Karzinome	75
4.6.3	Optimierung der Indikationsstellung zur neoadjuvanten Therapie und anderen individuellen Therapieformen.....	75
4.6.4	Tregs als therapeutisches Ziel beim Rektumkarzinom	78
4.7	Abschließende Bemerkungen, Fazit	78
5.	Literaturverzeichnis	80
6.	Anhang	97
6.1	UICC-Stadien beim Rektumkarzinom	97
6.2	Hypothesen und Signifikanzbestimmung.....	97
6.3	Datenbank	106
7.	Danksagung	110
8.	Tabellarischer Lebenslauf.....	110

Abkürzungen

5-FU	5-Floururacil
AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	professionelle antigenpräsentierende Zelle
ASS	Acetylsalicylsäure
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCL2	Chemokine (C-C motif) Ligand 2
CCR4	Chemokine (C-C motif) Receptor 4
CD	Cluster of Differentiation
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankung
CRC	kolorektales Karzinom
CT	Computertomographie
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DC	dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISPOT	Enzyme Linked Immuno Spot Technique
ERUS	endorektaler Ultraschall
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
GF	Gesichtsfeld
GSÜ	Gesamtüberleben
HRP	horseradish peroxidase
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
iTreg	induzierte regulatorische T-Zelle
KI	Konfidenzintervall
LR	Lokalrezidiv

MHC	Major Histocompatibility Complex
MMR	mismatch repair
MRT	Magnetresonanztomographie
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
NK	natürliche Killerzelle
nRCT	neoadjuvante Radiochemotherapie
nTreg	natürliche regulatorische T-Zelle
OR	Odds Ratio
RCT	Radiochemotherapie
RORyt	retinoic acid receptor related orphan receptor gamma T
TBS	TRIS buffered saline
Teff	T-Effektorzelle
TEM	transanale endoskopische Mikrochirurgie
Th	Thymus-Helferzelle
Th3	Thymus-Helferzelle Typ 3
TIL	tumorinfiltrierender Lymphozyt
TME	totale mesorektale Exzision
TNM	Tumour / Nodes / Metastasis (Stagingsystem der UICC)
Tr1	regulatorische T-Zelle Typ1
Treg	regulatorische T-Zelle
TRIS	Trishydroxymethyl-Aminomethan
UICC	Union Internationale Contre le Cancer

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom (CRC) ist weltweit das dritthäufigste Malignom [1] und das zweithäufigste in Deutschland. Im Jahr 2006 wurden deutschlandweit insgesamt 68 000 Neuerkrankungen diagnostiziert, 27 225 Menschen starben tumorbedingt [2]. Die altersstandardisierte Inzidenz hat zwischen 1980 und 2006 bei Männern in Deutschland um 34 % und bei Frauen um 26 % zugenommen, während die altersstandardisierten tumorbedingten Sterberaten aufgrund optimierter Therapiemethoden bei Frauen um 38 % und bei Männern um 24 % abgenommen haben. Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate ist von ungefähr 45 % in den 80er Jahren auf aktuell rund 60 % angestiegen. Die Kombination aus Zunahme der Inzidenz und Abnahme der Mortalität resultiert in einem deutlichen Anstieg der 5-Jahresprävalenz von 145 000 Patienten im Jahr 1990 auf 235 000 im Jahr 2006 [2, 3], das entspricht einem Anstieg um 62 %.

1.2 Definition des Rektumkarzinoms als eigenständige Entität

Nach dem internationalen Dokumentationssystem gelten kolorektale Karzinome als Rektumkarzinome, wenn sie 16 cm oder weniger von der Anokutanlinie entfernt sind, gemessen mit dem starren Rektoskop [4]. Diese werden wiederum anatomisch in Tumoren des oberen (12 - 16 cm), mittleren (6 - < 12 cm) und des unteren Drittels (< 6 cm) eingeteilt [5].

Das kolorektale Karzinom wird – nicht nur im Bereich der Epidemiologie – oft als eine gemeinsame Entität angesehen, es bestehen jedoch einige klinisch relevante Unterschiede zwischen Kolon- und Rektumkarzinomen, die vor allem durch die anatomischen Gegebenheiten begründet sind. Das Kolon besitzt in seiner Wandung Taenien, wohingegen das Rektum in seiner Zirkumferenz nicht unterbrochen ist. Das Kolon ist intraperitoneal gelegen, demgegenüber ist der überwiegende Teil des Rektums im Beckenboden und somit infraperitoneal lokalisiert. Hierdurch ist das Rektum von einem Fettkörper, dem Mesorektum umgeben, das die ersten

Lymphabflusswege und die dazugehörigen Lymphknoten beinhaltet. Das Mesorektum selbst ist von einer peritonealen Plikatur, der sogenannten Mesorektalfaszie umgeben. Diese Hüllschicht, auch als "holy plane" bezeichnet, stellt für die lymphogenen Ausbreitung des Karzinoms somit eine Barriere dar.

Rektum und Kolonkarzinome unterscheiden sich daher auch in ihrem onkologischen Verhalten. Dazu zählt ein höherer Anteil an lymphknotenpositiven Karzinomen [13] sowie eine höhere Lokalrezidivrate bei Rektumkarzinomen [14, 15]. Hieraus resultiert eine schlechtere Prognose als bei Kolonkarzinomen [16]. Auch die Therapien von Rektum- und Kolonkarzinomen unterscheiden sich, besonders in der chirurgischen Vorgehensweise. So können frühe Rektumkarzinome, die noch keine Lymphknotenmetastasen aufweisen, aufgrund ihrer infraperitonealen Lokalisation auch in Vollwandtechnik lokal exzidiert werden [17]. Weiterhin sind auch die Empfehlungen zur adjuvanten und neoadjuvanten Therapie bei beiden Tumorentitäten unterschiedlich [18].

Der Anteil der Rektumkarzinome an allen CRCs wird mit 30 - 50 % angegeben [6-9], wobei schon seit Jahrzehnten ein sogenannter Rechts-Shift, eine Abnahme der Lokalisationshäufigkeit im distalen Kolon, Sigma und Rektum und eine Zunahme der Karzinome im proximalen Kolon beobachtet wird [7, 9-12].

1.3 Einteilung

Die allgemein übliche Einteilung der Rektumkarzinome nach pathologischen Gesichtspunkten erfolgt nach der TNM-Klassifikation [5]:

Tabelle 1

Tumorausdehnung	
Tis	Infiltration bis maximal Lamina muscularis mucosae
T1	Infiltration der Tela submucosa
T2	Infiltration der Tunica muscularis
T3	Infiltration der Subserosa oder des perirektalen Fettgewebes
T4	Infiltration von Nachbarorganen oder des Peritoneums
T4a	Perforation des viszeralen Peritoneums
T4b	Infiltration eines Nachbarorgans oder einer Nachbarstruktur

Lymphknotenbefall	
N0	kein Lymphknotenbefall
N1	Befall von ein bis drei perirektalen Lymphknoten
N1a	1 Lymphknoten
N1b	2 - 3 Lymphknoten
N1c	Tumorsatelliten in der Subserosa oder dem perirektalen Fettgewebe ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
N2	Befall von mehr als drei perirektalen Lymphknoten
N2a	4 - 6 Lymphknoten
N2b	7 oder mehr Lymphknoten
Fernmetastasen	
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	in einem Organ
M1b	in mehr als einem Organ oder im Peritoneum

Aus der Tumoreindringtiefe, dem Lymphknotenbefall und dem Fernmetastasenstatus ergibt sich die prognosebestimmende Stadieneinteilung nach UICC bzw. äquivalent nach AJCC in den USA [5] (siehe Tabelle 16, Anhang S. 97), welche die ältere Dukes-Klassifikation [19] weitgehend abgelöst hat.

Die histologische Unterscheidung nach Tumordifferenzierungsgrad zwischen low-grade- und high-grade-Karzinomen ergibt einen weiteren Parameter für das onkologische Outcome. Gut und mäßig differenzierte Karzinome (G1 und G2) werden zur low-grade-Gruppe gerechnet, welche im Vergleich zu schlecht und undifferenzierten Karzinomen (G3 und G4) der high-grade-Gruppe einen signifikant günstigeren Verlauf aufweisen [18, 20-23].

Hermanek ging in seiner Einteilung bei Rektumkarzinomen noch weiter und berücksichtigte bei T1-Karzinomen neben dem Differenzierungsgrad auch tumorbedingte Einbrüche in das Lymphgefäßsystem zur Risikoabschätzung für das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen [24]. Dabei wird als low-risk-Kriterium die Kombination aus guter oder mäßiger Differenzierung und der Abwesenheit von Lymphgefäßinvasion bezeichnet (G1-2 L0). Sind Lymphgefäßinvasionen und / oder ein niedrigerer Differenzierungsgrad vorhanden, liegt aufgrund von lokalen Lymphknoten ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Lokalrezidiven und somit ein high-risk-Karzinom vor. Die Bedeutung von Veneneinbrüchen (V1) für die Unterscheidung von

high-risk / low-risk Karzinomen wird kontrovers diskutiert und in den Leitlinien ohne Evidenzgrad erwähnt [18].

Auf die überaus wichtige klinische Bedeutung der high-risk / low-risk-Unterscheidung und damit der Wahrscheinlichkeit für Lymphknotenmetastasen wird später im Rahmen der Therapie näher eingegangen.

1.4 Diagnostik und Staging

Die einfachste diagnostische Maßnahme ist die digitale rektale Untersuchung, die es ermöglicht, ungefähr ein Drittel aller Rektumkarzinome zu entdecken [17]. Außerdem kann der erfahrene Untersucher mithilfe des klinischen Stagings (CS) nach Mason über die Beurteilung der Beweglichkeit des Tumors zum Untergrund eine Abschätzung der Infiltrationstiefe und damit der T-Kategorie mit einer Sensitivität von etwa 70 % vornehmen [25].

Tabelle 2

Klinisches Staging nach Mason

[17, 25]

„Clinical Staging“	T-Kategorie
CS I (gut beweglich)	T1
CS II (beweglich)	T2
CS III (wenig beweglich)	T3
CS IV (fixiert)	T4

Goldstandard in der weiterführenden Diagnostik, auch im Hinblick auf die Operationsplanung, ist die starre Rektoskopie. Sie ist das genaueste Verfahren, um die Tumorphöhe zu bestimmen, und ermöglicht es auch, Biopsien zur histologischen Diagnosesicherung zu entnehmen [17, 18].

Weiterhin ist beim Rektumkarzinom für eine differenzierte Therapieplanung die möglichst genaue Kenntnis der Infiltrationstiefe (lokales Staging) nötig. Hier haben sich vorrangig die Endosonographie (ERUS = endorektaler Ultraschall) und die Magnetresonanztomographie durchgesetzt [26]. Die ERUS-Sensitivität ist bei Adenomen

und frühen Karzinomen (pT1) mit 74 - 95 % am höchsten, während sie bereits bei T2-Karzinomen auf 50 - 80 % absinkt [17, 27]. Die 3D-ERUS erreicht durch räumliche Rekonstruktion eine Gesamtsensitivität von etwa 80 % für alle Infiltrationstiefen [28, 29]. Bei der 3D-Sonographie handelt es sich in der Regel um eine statische Untersuchung, bei der in einer definierten Zeiteinheit der Schallkopf entlang des Tumors bzw. des Rektums entlangfährt, wohingegen die Sonografie und hier auch die Endosonografie im Besonderen von Möglichkeit der dynamischen Untersuchung profitiert. Aus diesem Grunde und da die 3D-Rekonstruktionen keine Verbesserung der Sensitivität im Staging der T-Kategorie erbrachten hat sich diese Technik hier nur wenig durchgesetzt. Beide ERUS-Verfahren, die 2D- als auch die 3D-ERUS sind jedoch bei fortgeschrittenen und stenosierenden Tumoren aufgrund ihrer begrenzten Eindringtiefe nur limitiert einsetzbar [26]. In diesen Fällen weist die Magnetresonanztomographie, obwohl sie nicht zwischen Tumorwachstum in der Mukosa und Submukosa unterscheiden kann, ab wandüberschreitender Eindringtiefe des Tumors (pT3) mit 80 - 90 % die höchste Sensitivität auf [30, 31].

Die Beurteilung von Lymphknotenmetastasen ist durch MRT mit einer Sensitivität von 60 - 90 % möglich [17, 28], hier leistet ERUS 50 - 80 % und CT 40 - 60 % [26, 31]. Bei allen diesen Methoden gilt die Einschränkung, dass Lymphknoten nur als befallen oder suspekt angesehen werden können, wenn sie größer als 5 bzw. 10 mm sind [17, 26, 31]. Es ist jedoch bekannt, dass bei 32 % der nodal positiven Karzinome die Lymphknotenmetastasen kleiner als 5 mm sind, bei 8 % sogar unter 2 mm [32].

Hier haben erste Studien einer MRT-Untersuchung mit lymphknotenspezifischem Kontrastmittel (z.B. ultrakleine paramagnetische Eisenoxidpartikel) vielversprechende Ansätze mit einer Sensitivität bis zu 91 % gezeigt [26, 33], sind aber bisher aufgrund nicht ausreichender Zuverlässigkeit noch nicht in die klinische Routine übernommen worden.

Zur weiteren präoperativen Diagnostik gehört eine komplette Koloskopie zum Ausschluss eines Zweittumors, der in ungefähr 5 % der Fälle auftritt [18, 34, 35], oder bei Nichtpassierbarkeit ein radiologisches Ersatzverfahren wie ein Kontrastmitteleinlauf oder eine virtuelle Koloskopie [18].

Zur Suche nach Fernmetastasen erfolgt eine Röntgenaufnahme oder Computertomographie des Thorax sowie eine Sonographie und / oder CT des Abdomens [18].

1.5 Therapie

Die stadiengerechte Standardtherapie des Rektumkarzinoms ist durch die S3-Leitlinien von 2007 festgelegt [18]. Im Mittelpunkt steht bei kurativem Therapieansatz die radikale chirurgische Resektion nach onkologischen Gesichtspunkten, je nach Tumorhöhe mit partieller oder totaler mesorektaler Exzision [36-39].

1.5.1 Radikale Operation

Der operative Goldstandard ist die Rektumresektion mit partieller oder totaler mesorektaler Exzision [40]. Bei Karzinomen des oberen Drittels, die in den USA noch zu den Kolonkarzinomen gezählt werden [41], erfolgt die Resektion mit 5 cm distalem Sicherheitsabstand und partieller mesorektaler Exzision [36], bei Karzinomen des mittleren und unteren Drittels mit totaler mesorektaler Exzision [37-39]. Auch bei low-grade-Tumoren wird im Allgemeinen ein Sicherheitsabstand von 5 cm angestrebt, in Ausnahmefällen kann dieser jedoch hier bis auf 2 oder sogar 1 cm verringert werden, wenn dadurch noch die Anlage einer kontinenserhaltenden Anastomose ermöglicht werden kann [42].

Mit der Einführung der TME konnten die Lokalrezidivraten bei primär resektablen Tumoren des mittleren und unteren Drittels von 47 % auf 11 % gesenkt werden [43]. Auch in einer großen deutschen Multicenterstudie konnte eine deutliche Reduktion der Lokalrezidivrate von 24,1 % ohne TME auf 12,8 % mit TME nachgewiesen werden [44]. Als Grund dafür wird die Entfernung des gesamten Mesorektums mit seinen Lymphknoten angesehen, die somit die erste Station einer lymphogenen Metastasierung darstellen. Diese können nicht nur kranial, sondern auch distal des Primärtumors befallen sein [40]. Bei einer onkologisch nicht adäquaten Technik, d.h. bei der die ‚holy plane‘ um das Mesorektum und damit die Mesorektalfaszie nicht intakt belassen, sondern eröffnet wird könnten Lymphknoten oder auch sogenannte Tumorbudings, die sich knospenartig vor der Invasionsfront Karzinom oder

tumorbefallenen Lymphknoten ausdehnen, in situ verbleiben und somit zum Ursprung eines Lokalrezidives werden [40, 45].

Allerdings weist die TME auch spezielle Nebenwirkungen auf. Neben den allgemeinen OP-Komplikationen wie Anastomoseninsuffizienz [46], präsakrale Abszesse [47] und Wundheilungsstörungen zeigen mehr als 30 % der Patienten postoperative Störungen der Sexual- und Blasenfunktion [48-50] sowie Stuhlinkontinenz [51]. Schließlich ist die TME selbst mit einer perioperativen Letalität von 2 bis 7 % belastet [17].

1.5.2 Postoperative / adjuvante Therapie

Nach inkompletter Resektion (R1) oder intraoperativer Tumorperforation (RX) wird eine adjuvante Radiochemotherapie empfohlen, da diese das Risiko eines Lokalrezidivs um durchschnittlich 40 % senken kann [18, 52]. Hierbei sollte die Bestrahlung mit einer 5-Floururacil-Monotherapie kombiniert werden. Das gleiche gilt auch für Patienten des Stadiums II und III, die primär keine neoadjuvante Therapie erhalten haben [18, 52-54].

Bei allen Patienten, die eine neoadjuvante Therapie erhalten haben, wird in den S3-Leitlinien eine postoperative adjuvante Chemotherapie, je nach Response, als 5-Floururacil-Monotherapie oder 5-FU / Folinsäure-Kombination empfohlen. Diese hat zwar keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben, verlängert aber das lokalrezidivfreie Überleben im Mittel um ca. 6 %. [18, 55, 56].

1.5.3 Präoperative / neoadjuvante Therapie

Bei Karzinomen des UICC-Stadiums II und III ist nach den aktuellen AWMF-Leitlinien [18] eine neoadjuvante Radio- oder Radiochemotherapie (nRCT) indiziert, da sie die Lokalrezidivrate gegenüber ausschließlich chirurgisch behandelten Patienten signifikant verringert [57]. Bei UICC I ist sie nicht indiziert, im Stadium UICC IV ist die Indikation individuell zu stellen [18, 57]. Der Vorteil einer neoadjuvanten gegenüber einer adjuvanten Therapie ist durch zahlreiche Studien hinsichtlich der Lokalrezidivrate belegt [58-61], es treten signifikant weniger Lokalrezidive (6 % vs. 13 % in 5 Jahren [61]) auf. Ein positiver Effekt auf das Gesamtüberleben konnte jedoch nicht belegt werden [58, 60, 61].

Wenn ein Karzinom präoperativ als nicht resektabel oder nicht kontinenzerhaltend resezierbar eingeschätzt wird, kann eine neoadjuvante Therapie bei gutem Ansprechen die Rate sphinktererhaltender Operationen gegenüber dem primär chirurgischen Vorgehen wesentlich verbessern (39 % vs. 19 % kontinenzerhaltende Operationen bei vorher als exstirpationspflichtig eingestuften Patienten [61]). Bei diesen Fällen, meist $\geq T3$ -Karzinome, wird eine nRCT empfohlen, bestehend aus einer konventionell fraktionierten Bestrahlung mit einer Gesamtdosis von 50,4 Gy und einer systemischen Chemotherapie mit 5-Floururacil [18].

Der Nachteil der neoadjuvanten Therapie liegt jedoch in der Gefahr eines möglichen präoperativen Overstagings mit konsekutiver Übertherapie und der unnötigen Inkaufnahme von Nebenwirkungen der nRCT. Dazu zählen längere postoperative Genesungszeiten, Wundheilungsstörungen, Sexualfunktionsstörungen sowie Harn- und Stuhlinkontinenz [62-64].

Von diesem Hintergrund ausgehend wird bei cT1/cT2-Karzinomen mit präoperativ nicht eindeutig erkennbarem Lymphknotenmetastasen (Entscheidung zwischen UICC-Stadium I und III nicht sicher möglich) die primäre Operation empfohlen [18].

1.5.4 Lokale transanale Exzision

Eine Sonderstellung in der Therapie nehmen die T1-low-risk-Karzinome ein. Da sie mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit von nur 1 - 3 % Lymphknotenmetastasen aufweisen [17, 65], sind sie für die lokale Exzision geeignet. Als lokalchirurgisches Verfahren hat sich dabei über einen Zeitraum von 20 Jahren die transanale endoskopische Mikrochirurgie (TEM) durchgesetzt [17].

1.5.4.1 TEM bei T1-low-risk-Karzinomen

Die TEM, entwickelt von Buess [66, 67], wurde ursprünglich zur Entfernung von Adenomen des Rektums oder zur transanal Resektion von stenosierenden Rektumtumoren in palliativer Intention angewandt.

Das minimale Zugangstrauma und die Möglichkeit des Sphinktererhalts speziell bei Rektumtumoren des unteren Drittels führten zur schrittweisen Erweiterung der Indikation auf kurative Ansätze. Verantwortlich hierfür war das zum Teil fehlende

Auftreten von Rezidiven in Fällen, bei denen sich nach Resektion eines vermeintlichen Adenoms ein okkultes T1-Karzinom im Resektat zeigte, trotz nicht erfolgter radikaler Nachoperation [68, 69]. Eine erste Übersichtsarbeit hierzu ergab eine Lokalrezidivrate von durchschnittlich 19 %, die zwar größtenteils durch konventionelle Nachresektion ausgeglichen werden konnte [70], jedoch die Notwendigkeit einer besseren Patientenselektion deutlich machte. Mit der von Hermanek et al. [24] vorgeschlagenen Einteilung in high-risk / low-risk-Tumoren konnte die Indikationsstellung verbessert werden, da hierdurch T1-Karzinome bestimmt werden können, die mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 - 3 % für Lymphknotenmetastasen einhergehen [17, 24]. Deren Abwesenheit ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche chirurgische Therapie durch lokale Exzision, da mit dieser Technik keine systematische Lymphknotendissektion möglich ist [17].

Mittlerweile stellt die TEM mit einer durchschnittlichen Lokalrezidivrate von 5 % bei T1-low-risk-Karzinomen eine onkologisch adäquate Therapie dar [17, 69, 71]. Gleichzeitig zeichnet sie sich im Vergleich zur radikalen Operation durch eine praktisch nicht existierende perioperative Letalität von unter 1 % gegenüber 2 - 7 % nach konventioneller Resektion aus [17], die jedoch der höheren Lokalrezidivrate nach TEM gegenüberzustellen sind. Untersuchungen zeigten jedoch, dass Rezidive, die nach TEM von pT1-low-risk-Karzinomen auftraten, nahezu keine Lymphknotenmetastasen und somit ein günstiges Tumorstadium (UICC I-II) aufwiesen. Weitere Vorteile sind geringerer intraoperativer Blutverlust, kürzere Operationszeiten, kürzere Krankenhausaufenthaltsdauer und eine geringere postoperative Analgesie [71]. Außerdem sind die funktionellen Langzeitkomplikationen wie Inkontinenz oder Störungen der Sexualfunktion nahezu nicht vorhanden oder in der Regel nach 3-12 Monaten vollständig reversibel [72].

Folglich ist die TEM als das bevorzugte Verfahren für T1-low-risk-Karzinome anzusehen [17, 71]. Zeigt sich nach einer TEM ohne vorrausgegangene neoadjuvante Therapie ein fortgeschrittenes (\leq T2) oder high-risk-Karzinom als unerwarteter Befund, wurde nachgewiesen, dass eine konventionelle Nachoperation innerhalb 4

Wochen die gleichen onkologischen Erfolge aufweist wie die primäre radikale Operation [69, 73].

1.5.4.2 TEM bei fortgeschritteneren Karzinomen

Die signifikant niedrigeren Komplikationsraten durch geringere Invasivität haben die Diskussion über eine erweiterte Indikationsstellung der lokalen Exzision auf T2/3-Karzinome initiiert. Diese weisen allerdings in deutlich höherem Maße, etwa 20 - 50 %, Lymphknotenmetastasen auf [17, 74] und nach alleiniger TEM ist mit einer nicht akzeptablen Lokalrezidivrate von 20 - 50 % zu rechnen [75]. Durch anschließende adjuvante Radiochemotherapie kann diese ungefähr halbiert werden, was dennoch im Vergleich zum primär radikalchirurgischen Vorgehen inakzeptabel hoch ist [76].

Nach neoadjuvanter Radiochemotherapie und nachfolgender lokaler Exzision kann bei T2/3-Karzinomen eine durchschnittliche Lokalrezidivrate von 7 - 9 % erreicht werden, wobei besonders ein gutes Ansprechen auf die nRCT Voraussetzung für eine niedrige Lokalrezidivrate ist [76, 77]. Bei einer kompletten Remission (ypT0) nach nRCT, die in ungefähr 20 - 25 % der Fälle auftreten kann [78, 79], ist nach lokaler Exzision bisher noch kein Lokalrezidiv beobachtet worden [77].

1.6 Prognostische Faktoren

1.6.1 Prognostische Faktoren für das Gesamtüberleben

Die Prognose der Patienten mit Rektumkarzinom kann, wie bei den meisten Malignomen, variabel und von zahlreichen Einflussfaktoren abhängig sein. Als wichtigste Prädiktoren gelten der TNM-Status oder das davon abgeleitete UICC-Stadium [80-82] (siehe Tabelle 3), sowie die operative Radikalität (R-Status). Hier liegt das 5-Jahresüberleben bei durchschnittlich 60 - 80 % nach R0-Resektion und bei 30 - 50 % nach R1- oder R2-Resektion [82, 83]. Nach R1-Resektion, das heißt wenn die nicht vollständige Resektion nur mikroskopisch nachweisbar ist, liegt das mittlere Überleben bei 18,7 Monaten, nach einer R2-Resektion mit makroskopisch sichtbarem Resttumor bei 10,0 Monaten [21, 84].

Tabelle 3

UICC-Stadium	5-Jahres-Überleben nach R0-Resektion
I	80 - 90 % [80, 82]
II	65 - 85 % [80, 82]
III	50 - 70 % [80, 82]
IV	10 - 40 % [80, 82]

Zu den histologischen Merkmalen mit prognostischer Aussagekraft zählt unter anderem der Differenzierungsgrad, hier ist das Gesamtüberleben bei high-grade-Karzinomen um ca. 20 - 40 % kürzer [20-23] und auch Lymphgefäß-, Venen- sowie perineurale Invasion sind prognostisch ungünstige Faktoren für eine schlechtere Prognose [21, 85]. Weiterhin wurde eine negative prognostische Vorhersage für ausgeprägte Tumorbuddings festgestellt [86-88]. Zu prognostisch relevanten molekularen Markern gehören auch Mutationen der zellulären Signalverarbeitungskette in Tumorzellen, wie zum Beispiel die *K-ras*-Mutation, für die eine signifikante Korrelation mit erhöhtem Risiko für Lokalrezidive und verkürzter Lebenserwartung nachgewiesen wurde [89]. Weiterhin ist noch die Mikrosatelliteninstabilität als prognostisches Kriterium zu erwähnen. Hier entstehen durch Defekte in DNA-Reparaturenzymen (MMRs) Längenpolymorphismen in repetitiven DNA-Sequenzen, sogenannten Mikrosatelliten. Karzinome mit MSI weisen eine signifikant bessere Prognose auf [90, 91].

Als günstige prognostische Faktoren gelten insbesondere ein gutes Ansprechen auf die nRCT, im günstigsten Fall eine pathologische *complete response* (ypT0N0) [76, 77, 92], mehr als 7 intraoperativ entnommene Lymphknoten [22] und ein Lebensalter unter 65 Jahren [22].

Neben den tumoreigenen Merkmalen ist zunehmend auch die Immunreaktion des Organismus in den Fokus wissenschaftlicher Studien gerückt. Hier zeigte sich bei unspezifischer Betrachtung eine bessere Prognose bei hoher peritumorale Immunreaktion [22, 85, 93, 94].

1.6.2 Wahrscheinlichkeit für vorhandene Lymphknotenmetastasen

Das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen ist sowohl ein wichtiger prognostischer Marker für das Gesamtüberleben [80-82], als auch ein bedeutendes Entscheidungskriterium hinsichtlich der Therapie. So wird bei präoperativ nachgewiesenem Lymphknotenbefall eine neoadjuvante Therapie empfohlen [18]. Außerdem ist bei positivem N-Status eine lokale Exzision (TEM) kontraindiziert, da mit dieser keine Lymphknotendissektion möglich ist [17]. Bei T1/2-Karzinomen ist daher die Kenntnis über den N-Status essenziell für die Entscheidung hinsichtlich des weiteren therapeutischen Vorgehens. Da dieser, zum Beispiel aufgrund von Artefakten durch eine lokale Entzündung, nicht immer zweifelsfrei beurteilbar ist [17, 26, 28, 31, 32], wurden bereits einige Kriterien zur Abschätzung des individuellen Risikos für Lymphknotenbefall entwickelt.

Hinweise für vorhandene Lymphknotenmetastasen liefert neben der T-Kategorie und der Einschätzung der Prognose auch die high-risk / low-risk-Unterscheidung nach Hermanek, also die Kombination aus Differenzierungsgrad und Lymphgefäßinvasionen, die bei T1-Karzinomen eine Unterscheidung zwischen 1 - 3 % (low-risk) und 14 % (high-risk) Wahrscheinlichkeit für positiven N-Status zulässt [24, 65, 95]. Als weitere Marker für wahrscheinlichen Lymphknotenbefall werden ausgeprägte Tumorbuddings [22, 86, 87], ein hoher Anteil muzinöser Tumorzellen [22], geringe peritumorale Inflammation [22] und bei T1-Karzinomen die Infiltration bis ins untere Drittel der Submucosa (sm3) [22, 96] diskutiert.

Diesen Kriterien gemeinsam ist eine geringe Sensitivität, weswegen oft von falsch negativem Lymphknotenstatus ausgegangen wird. Zur genaueren Abschätzung des Risikos für Lymphknotenmetastasen ist es jedoch unbedingt erforderlich, weitere zuverlässige Kriterien zu finden, um damit eine individuellere und damit optimale Therapie ermöglichen.

1.7 Tumorinfiltrierende Lymphozyten (TILs)

In zahlreichen Experimenten und klinischen Studien wurde bisher belegt, dass das Immunsystem Malignome mit einer Abwehrreaktion bekämpfen kann [97, 98].

Aufgrund von genetischen und epigenetischen Veränderungen während der Karzinogenese tragen Tumorzellen Antigene, die durch Mutation oder veränderte Expressionsstärke als immunogene Stimuli wirken können [99, 100]. Die Hauptakteure der körpereigenen Abwehr gegen Tumoren sind Thymus-Zellen (T-Zellen) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) [98-101].

Tabelle 4

Systematik und Untergruppen der T-Zellen und NK-Zellen

T-Zellen						natürliche Killer-Zellen
αβ T-Zellen					γδ T-Zellen	natürliche Killer-T-Zellen
T-Helferzellen (CD4-positiv)			Zytotoxische T-Zellen (CD8-positiv)			
Th1 ¹	Th2	Th17	Treg ²	Tc1 ³	Treg	

¹ T-Helferzelle vom Typ 1

² regulatorische T-Zelle

³ zytotoxische T-Zelle vom Typ 1

Zytotoxische T-Lymphozyten können selektiv Zellen erkennen und abtöten, die tumorassoziierte Antigene per *Major Histocompatibility Complex I* (MHC-I) präsentieren [102]. Das geschieht überwiegend durch den Perforin-Granzyme-Pathway zur Apoptoseeinleitung [102, 103]. NK-Zellen erkennen hingegen Zellen mit auffällig niedriger Expression von MHC-I und lysieren diese [104].

Auch in therapeutischer Hinsicht wird vereinzelt die Induktion einer Immunreaktion zur Tumorbehandlung eingesetzt, so ist unter anderem die immunogene Bacillus Calmette-Guérin-Instillation bei oberflächlichen Blasenkarzinomen therapeutischer Standard [105].

Für viele Tumorentitäten wurde eine klare Korrelation zwischen Infiltrationsdichte mit tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) und verbesserter Prognose gezeigt, unter anderem auch bei kolorektalen Karzinomen [94, 106-108]: So wurde eine signifikant längere 5-Jahres-Überlebensrate bei hoher gegenüber niedriger

Lymphozyteninfiltration nachgewiesen [94] und es wurde demonstriert, dass die kombinierte Analyse der Dichte von CD3-positiven T-Effektor- und CD45RO-positiven T-Gedächtniszellen eine genauere Vorhersage des Gesamtüberlebens treffen kann als die konventionelle TNM-Klassifikation, wobei jeweils eine hohe Infiltration mit einer besseren Prognose assoziiert ist [107, 109].

Weiterhin wurden viele sogenannte *tumor-escape*-Mechanismen beschrieben, mit deren Hilfe Tumorzellen ihre Immunogenität hemmen und damit der körpereigenen Abwehr entgehen können. Dazu gehören Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen [110, 111], Herabregulation der MHC-I-Expression [112, 113], Apoptoseresistenz [114] und Rekrutierung von regulatorischen T-Lymphozyten (Tregs) [115-117].

Diese Subgruppe der T-Zellen ist in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus der Forschung über entzündliche und maligne Erkrankungen gerückt. Sie werden als wichtige Akteure in der Etablierung einer zellulären Immunsuppression angesehen, und sie wurden als prognostische Marker und teilweise sogar als Ansatzpunkt für Therapien entdeckt. Auf ihre Funktion und Bedeutung soll im folgenden Kapitel näher eingegangen werden.

1.8 Die regulatorischen T-Lymphozyten

1.8.1 Entdeckung und Geschichte

Als Entdeckung der regulatorischen Lymphozyten, wenn auch noch nicht unter dieser Bezeichnung, gilt ein Experiment von 1971, in dem gezeigt wurde, dass antigenspezifische Immuntoleranz durch T-Zellen von einer Maus auf eine andere übertragen werden konnte [118]. In den 80er Jahren legten erste Experimente die Vermutung nahe, dass es eine von bestimmten T-Zellen – damals noch Suppressor-T-Zellen genannt – gesteuerte Immuntoleranz gegen maligne Tumoren geben muss [119]. 1990 wurde dann *in vitro* gezeigt, dass ein CD4-positiver T-Zellklon, der mit Antigenen eines Melanoms stimuliert worden war, die spezifische zelluläre Immunantwort gegen diese Antigene supprimierte, während die Immunantwort gegen andere Antigene unbeeinträchtigt war [120]. Dies legte die Theorie einer tumorantigenindu-

zierten und -spezifischen Immuntoleranz durch regulatorische T-Lymphozyten (Tregs) nahe.

Als erster molekularer Marker für Tregs wurde 1995 der Interleukin-2-Rezeptor CD25 identifiziert, als gezeigt wurde, dass thymektomierte Mäuse, die CD25-depletierte CD4-positive T-Zellen transfundiert bekamen, verschiedene schwere Autoimmunreaktionen entwickelten. Durch rechtzeitige Rekonstitution der CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen konnte deren Ausbruch verhindert werden [121].

Beim im Normalfall nicht unter sterilen Laborbedingungen lebenden Menschen hat sich CD25 jedoch als nicht spezifisch genug herausgestellt, um als Marker für Tregs zu dienen, da alle T-Zellen bei ihrer Aktivierung CD25 als Rezeptor für IL-2, einen T-Zell-Wachstumsfaktor exprimieren [122].

Als gebräuchlichster Marker für Tregs, vor allem im Bereich der Immunhistochemie, gilt heute der 2003 beschriebene Transkriptionsfaktor *Forkhead-Box-Protein P3* (FoxP3) [123-125].

Mit Hilfe dieses Markers wurde 2003 eine neue Subgruppe der Tregs entdeckt. Diese zählt erstmals nicht zu den CD4-positiven T-Zellen, zeichnet sich aber durch die Expression von FoxP3 und regulatorische Aktivität aus. Diese sogenannten CD8⁺ Tregs exprimieren weiterhin CD8 und CD25 [126].

1.8.2 Definition

Wie bereits erwähnt zog sich die Entdeckung und Erforschung der Tregs über mehrere Jahrzehnte hin, ein wichtiger Grund dafür ist und bleibt die Schwierigkeit, sie eindeutig zu definieren, da bisher noch kein exklusiver molekularer Marker entdeckt wurde [127]. CD25 und FoxP3 werden von den meisten T-Zellen während ihrer Aktivierung unterschiedlich lang transient exprimiert [122, 128-130]. Damit ist die Definition über den molekularen Phänotyp bisher nicht eindeutig möglich, so dass sich momentan die Praxis durchsetzt, Tregs als eine heterogene Gruppe von T-Lymphozyten mit regulatorischer Aktivität anzusehen [131, 132].

1.8.3 Entstehung und Typen

Die Heterogenität dieser Gruppe ist unter anderem durch die verschiedenen Entstehungswege der Tregs bedingt (siehe auch Tabelle 5). Die sogenannten *naturally arising* Tregs, auch nTregs genannt, entstehen durch Selektion im Thymus [133, 134]. Daneben können Tregs aber auch durch periphere Induktion aus naiven CD4-positiven Lymphozyten entstehen (iTregs). Dabei spielt die Exposition gegenüber den antiinflammatorischen Zytokinen IL-10 und Transforming Growth Factor β (TGF- β) eine wichtige Rolle [135-137]. Für TGF- β wurde ein direkter Zusammenhang mit der Expression von FoxP3 und damit der Induktion zur Differenzierung von naiven T-Zellen in einen regulatorischen Phänotyp nachgewiesen [138]. Bei diesen iTregs wird derzeit zwischen regulatorischen T-Zellen vom Typ 1 (Tr1) und T-Helferzellen Typ 3 (Th3) unterschieden.

Tabelle 5

Treg-Subgruppen
Einteilung nach Cao [139]

Bezeichnung	Markerprofil	Beschreibung
<i>naturally arising</i> Tregs	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	· Entstehung im Thymus [133, 134]
Tr1	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁻	· Entstehung peripher durch Induktion mit IL-10 [135] · produzieren IL-10 und TGF- β [135, 140]
Th3	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	· Entstehung peripher durch Induktion mit TGF- β [136, 137] · produzieren TGF- β [136, 137]
CD8 ⁺ Tregs	CD8 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	· produzieren IL-10 und TGF- β [141, 142] · hemmen CD8-positive Tregs [143]
<i>double-negative</i> (DN) Tregs	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻ FoxP3 ⁻	· hemmen T-Zell-Aktivierung und -Proliferation [144, 145]

1.8.4 Funktion

Als mögliche physiologische Funktionen der Tregs werden unter anderem postuliert:

- Regulierung der Immunantwort im Sinne von negativem Feedback [146-149]
- Schutz vor Autoimmunkrankheiten durch Suppression autoreaktiver T-Zellen [121, 150-152]

- Unterdrückung von Allergien und Asthma [153, 154]
- Etablierung und Aufrechterhaltung der mütterlichen Toleranz gegenüber dem Fetus [155, 156]
- Unterdrückung einer überschießenden Immunreaktion gegenüber Kommensalen wie zum Beispiel Darmbakterien [157, 158]

Dabei werden Tregs antigenspezifisch aktiviert [159] und supprimieren die Immunantwort der T-Effektor-Zellen (Teffs), wobei es noch nicht eindeutig geklärt ist, ob sie nur T-Zellen mit der gleichen Antigen-spezifität hemmen. Es wurde sowohl monoklonale als auch polyklonale Suppression nachgewiesen [151, 160].

Es werden verschiedene Mechanismen der regulatorischen Funktion beschrieben (siehe auch Abbildung 1, S. 26):

1.8.4.1 Der Einsatz von membrangebundenen Liganden und Zell-Zell-Kontakten

Es wurde gezeigt, dass membranständiges Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4) auf Tregs als Ligand für CD80 / CD86 auf Teffs fungiert und damit deren Aktivierung, Proliferation und Funktion hemmt [161, 162]. Zusätzlich werden auf gleichem Wege auch antigen-präsentierende Zellen (APCs), wie zum Beispiel Makrophagen oder dendritische Zellen, in ihrer Teff-stimulatorischen Funktion gehemmt [163, 164], sowie dazu angeregt, das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) zu exprimieren [165]. Dieses baut Tryptophan ab und erzeugt damit einen lokalen Tryptophanmangel, der die Proliferation von T-Helferzellen (Ths) hemmt [166] und sogar deren Apoptose einleiten kann [167].

Die Bedeutung von CTLA-4 für die regulatorische Aktivität wurde durch Versuche nachgewiesen, in denen dieser Mechanismus durch gegen CTLA-4 gerichtete Antikörper blockiert wurde. Hier zeigte sich ein starker Rückgang der Treg-Aktivität [168-170].

1.8.4.2 Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen

Tregs produzieren die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β [171, 172]. Diese vermindern bei APCs die Expression von MHC-II und costimulierenden

Rezeptoren [173-175]. Bei CTLs bewirkt TGF- β eine Hemmung der Proliferation und der zytolytischen Aktivität [176, 177]. Außerdem wurde eine direkte Hemmung der Aktivität natürlicher Killerzellen durch membranständiges TGF- β nachgewiesen [178]. Weiterhin kann durch Stimulation naiver CD25-negativer T-Zellen mit IL-10 und TGF- β ein CD25-positiver Phänotyp mit regulatorischer Aktivität im Sinne von Tr1- und Th3-Zellen induziert werden [135-137] (siehe auch Tabelle 5, S. 23).

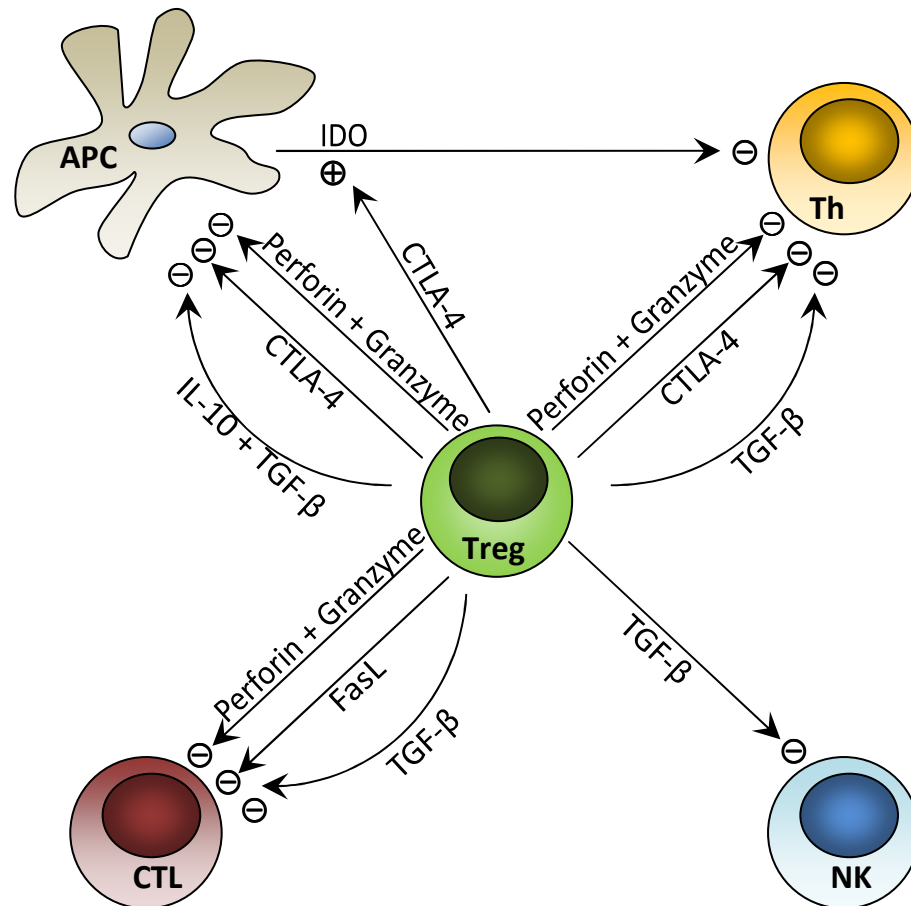
1.8.4.3 Apoptoseinduktion

Als ein weiterer Weg der regulatorischen Aktivität ist die Tatsache bekannt, dass Tregs bei T-Zellen, B-Zellen und dendritischen Zellen (DCs) über den Perforin-Granzyme-Pathway Apoptose induzieren können [179-183]. Die Expression von Granzyme B wurde bisher in situ nur bei tumorinfiltrierenden bzw. tumornahen Tregs nachgewiesen [184]. In einer neueren Studie mit Tregs, die aus dem peripheren Blut von Patienten mit Karzinomen des HNO-Bereiches isoliert worden waren, wurde gezeigt, dass außerdem auch der Fas / FasL-Pathway zur Apoptoseinduktion bei CD8-positiven T-Zellen verwendet wird [185].

Beide apoptosebezogenen Mechanismen konnten bisher in situ nur in Anwesenheit von Tumoren oder Tumorantigenen nachgewiesen werden [184, 185].

Außerdem werden zahlreiche weitere Mechanismen diskutiert, unter anderem die Möglichkeit, dass Tregs durch ihre starke Expression von CD25 den T-Zell-Wachstumsfaktor IL-2 bevorzugt binden und damit anderen T-Zellen einen Proliferationsstimulus vorenthalten [186]. Weiterhin wurde auch eine direkte Übertragung von cAMP als Hemmstoff der IL-2-Synthese über gap junctions beobachtet [187].

Abbildung 1



Schema der verschiedenen Treg-Regulationsmechanismen auf T-Helferzellen (Th), zytotoxische T-Zellen (CTL), professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) und natürliche Killerzellen (NK) [161-166, 171-183, 185]

1.8.5 Plastizität, Th17-Transformation

In einer lokalen Entzündungsreaktion werden von Makrophagen große Mengen IL-6 sezerniert. In Verbindung mit TGF-β in niedriger Konzentration können dadurch aus naiven CD4-positiven Lymphozyten proinflammatorische Th17-Zellen induziert werden [138, 188-190]. Diese zeichnen sich durch die Expression des Transkriptionsfaktors RORγt, die Produktion von IL-17 und die Reaktion auf körpereigene Antigene aus [189, 191]. Ihnen wird eine Schlüsselrolle bei der Etablierung von Autoimmunkrankheiten und Allergien zugeschrieben, unter anderem auch im Gastrointestinaltrakt [152, 189, 191-193]. Es stellte sich heraus, dass Tregs und Th17-Zellen in einer reziproken Beziehung zueinander stehen [189]. So können Tregs die Entstehung Th17-induzierter Autoimmunkrankheiten verhindern [151], zum Beispiel indem sie

deren Aktivität durch Sekretion von IL-10 hemmen [152]. So wurde gezeigt, dass das Verhältnis zwischen Tregs und Th17-Zellen bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses signifikant niedriger als bei gesunden Kontrollen ist und sogar invers mit der Krankheitsaktivität korreliert [126].

Ergebnisse neuerer Studien kommen zu dem Schluss, dass auch Tregs im Milieu chronischer Entzündungssituationen mit lokal hoher IL-6-Exposition die FoxP3-Expression herabregulieren, ROR γ t zu exprimieren beginnen, ihre regulatorische Aktivität verlieren und sich zu einen zumindest Th17-ähnlichen Phänotyp umdifferenzieren können [188, 194-198].

1.8.6 Tregs und Tumortoleranz

Besonders im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen hat die immunsuppressive Funktion der Tregs zu einer Vielzahl von Studien in Bezug auf Funktionsweise, prognostische Aussagekraft und mögliche Therapieansätze geführt.

So wurde festgestellt, dass die Zahl der Tregs bei Tumorpatienten im peripheren Blut erhöht ist [199-201]. Außerdem wurden gegenüber gesundem Gewebe deutlich erhöhte Zellzahlen in der Umgebung von Pankreas- und Mammakarzinomen [200], Ovarialkarzinomen [202], Melanomen [203], kolorektalen Karzinomen [176], und Bronchialkarzinomen [202] nachgewiesen.

Weiterhin sind bereits einige der Mechanismen bekannt, die zu dieser Ansammlung von Tregs im Tumorbereich führen. So produzieren bei Ovarialkarzinomen Tumorzellen und infiltrierende Makrophagen das Chemokin CCL2, das die Migration von Tregs in die Umgebung des Tumors induziert. Die chemotaktische Wirkung wird dabei durch Interaktion mit dem Chemokin-Rezeptor CCR4 auf der Treg-Oberfläche erzielt [115]. Der gleiche Mechanismus wurde auch bei B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen [116], Mammakarzinomen [204] und Magenkarzinomen [117] nachgewiesen.

Eine zweite Möglichkeit, die Treg-Zahl am Tumorort zu erhöhen, ist die periphere Induktion. Dazu passend wurde gezeigt, dass plasmacytoide DCs in Ovarialkarzinomen durch Sekretion von IL-10 CD8-positive Tregs induzieren können [205].

Durch die Hemmung der Aktivität von Tregs sind Tregs maßgeblich an der Etablierung der Tumortoleranz beteiligt [119, 206]. Sie hemmen sowohl APCs, Tregs, als auch NK-Zellen [161-163, 178]. Dabei kommen Zell-Zell-Kontakte mit Rezeptor-Ligand-Interaktionen, antiinflammatorische Zytokine und der offenbar für Tregs im Tumorbereich exklusive Perforin-Granzyme-Pathway zum Einsatz [164, 184, 206].

Die Bedeutung der Tregs für die Tumortoleranz wurde eindrucksvoll in einigen Tierexperimenten bewiesen, in denen es bei Treg-depletierten Mäusen zu einer deutlichen Tumorregression kam. Dabei handelte es sich um Melanome, Sarkome, Myelome und Leukämien [207-209].

Eine weitere Erkenntnis über die Bedeutung der Tumortoleranz durch Tregs ist noch erwähnenswert. In Studien zu sogenannten „Tumorimpfungen“ mit tumorassoziierten Antigenen, deren Intention ist, die Immunogenität von Malignomen und damit auch die Immunreaktion dagegen zu erhöhen, hat sich herausgestellt, dass ein Therapieversagen meistens darauf zurückzuführen ist, dass durch die Impfung hauptsächlich tumorspezifische Tregs stimuliert und aktiviert werden [210, 211].

1.8.7 Bedeutung als therapeutischer Ansatzpunkt

Die im vorigen Abschnitt erwähnten Tierversuche legen einen eindeutigen Zusammenhang zwischen Tregs und Tumortoleranz nahe, der Tregs als potentielle Ziele einer Tumorthherapie, sei es durch Depletion oder Funktionsunterdrückung, zum Gegenstand zahlreicher präklinischer und auch bereits einiger klinischer Studien gemacht hat.

In älteren Tierversuchen wurden Tregs durch monoklonale Antikörper, die gegen CD25 gerichtet waren, vollständig depletiert, was sehr häufig zu einer Tumorregression führte [207], die aber regelmäßig von neu entstandenen, schweren Autoimmunkrankheiten begleitet war [209, 212]. Da Tregs im Immunsystem ihre physiologischen Funktionen wahrnehmen, zu denen auch der Schutz vor Autoreaktivität gehört, ist diese Nebenwirkung nicht verwunderlich [121, 150]. Außerdem ist CD25 kein exklusiver Treg-Marker [122], so dass bei dieser Behandlung auch andere Zellen des Immunsystems beeinträchtigt werden können.

Dennoch gibt es einige klinische Studien mit Ontak (denileukin difitox), einem Fusionsprotein aus Diphtherietoxin und einer für CD25 hochaffinen IL-2-ähnlichen Domäne, das ursprünglich für die Behandlung von T-Zell-Lymphomen entwickelt worden war [213]. Dabei wird durch Dosisanpassung nicht die vollständige Depletierung, sondern eine Reduzierung der Tregs als Ziel angestrebt. Im Rahmen einer solchen Studie zeigten Patienten mit metastasiertem Melanom nach transientem Rückgang aller Lymphozyten im peripheren Blut eine teilweise Reduktion der Tumormasse, jedoch nur in 5 von 16 Fällen [214]. Bei Patienten mit nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom wurde kein therapeutischer Effekt nachgewiesen [215]

Ein weiterer experimenteller Ansatz ist die Unterdrückung der Mechanismen der regulatorischen Aktivität. So wurden die monoklonalen Antikörper Ipilimumab und Tremelimumab gegen CTLA-4 bei Patienten mit metastasiertem Melanom getestet. Es zeigte sich eine signifikante Tumorregression mit einem Rückgang der Tumormasse bei ungefähr 20 % der Patienten [216], wobei auch hier Autoimmunreaktionen auftraten, die aber weitgehend durch hochdosierte Kortikosteroidgabe therapierbar waren [168-170, 217].

Eine weitere Strategie, die klinisch erprobt wird, ist die Kombination aus Tumorimmunisierung und Treg-Hemmung mit dem Hintergrund, dass Tregs als Grund für häufiges Versagen der Tumorimmunisierung angesehen werden [210, 211]. So wurde bei Mammakarzinomen gezeigt, dass der gegen CD25 gerichtete Antikörper Daclizumab durch vorübergehende Elimination der Tregs aus dem peripheren Blut eine effektive T-Zellantwort auf eine Immunisierung mit tumorassoziierten Antigenen ermöglichen kann [218]. Eine Studie mit Ontak in Kombination mit einer Immunisierung bei Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom ergab eine deutliche Erhöhung der T-Zellantwort gegen Tumorantigene nach nur einmaliger Ontak-Gabe ohne Induktion von Autoreaktivität [219].

Ein weiterer denkbarer Ansatzpunkt für Treg-basierte Tumorthapien könnte die Blockade von CCR4 sein, um die Rekrutierung von Tregs zum Tumorort zu verhindern. Bisher wurde die CCR4-Blockade aber nur mit Erfolg als Adjuvans für Impfungen gegen Hepatitis B oder Tuberkulose erprobt [220].

1.8.8 Bedeutung als prognostischer Faktor

Ausgehend von ihrer immunsuppressiven Funktion und Schlüsselrolle in der Etablierung der Tumortoleranz liegt der Gedanke nahe, erhöhte Aufkommen von Tregs, sei es im Tumor selbst oder zirkulierend in der Peripherie, mit einer ungünstigen Prognose zu assoziieren [119, 161-164, 178, 184, 206, 206-209].

Tatsächlich hat sich diese Erwartung in vielen Untersuchungen bestätigt, zum Beispiel bei Ovarial- [115, 221], Mamma- [222], Pankreas- [223], Magen- [224, 225], Nierenzell- [226] und hepatozellulären Karzinomen [227, 228] sowie bei Melanomen [229, 230] und Gliomen [231]. Im Gegensatz dazu wurde sowohl bei Ösophagus- [232] und Kardiakarzinomen [233] als auch bei verschiedenen Lymphomen [234, 235] eine umgekehrte Korrelation festgestellt, hier war eine hohe Tumordinfiltration durch FoxP3-positive Tregs mit längerem Überleben vergesellschaftet. Hier zeigt sich bereits eine kontroverse prognostische Bewertung der Tregs, die jeweils im speziellen Zusammenhang neu analysiert werden muss.

Das ist auch bei den wenigen bisher veröffentlichten Studien zur Tregs bei kolorektalen Karzinomen der Fall (speziell für Rektumkarzinome gibt es bisher noch keine Daten): Die Resultate reichen von signifikant längerem tumorfreien und Gesamtüberleben bei erhöhtem CD8 / FoxP3-Quotient und damit einer indirekten Einordnung der Tregs als prognostisch ungünstigen Marker [236], über keine prognostische Aussagekraft [237, 238] bis zu einem signifikant positiven Effekt von intratumoralen Tregs auf das Gesamtüberleben [239-241]. Eine genauere Analyse folgt im Kapitel 4 - Diskussion (S. 62). Somit sind weitere Studien, besonders beim Rektumkarzinom, erforderlich, das sich anatomisch und im onkologischen Verhalten vom Kolonkarzinom unterscheidet.

1.9 Fragestellung

Beim Rektumkarzinom haben sich eine Reihe von Merkmalen (N0 vs. N1/2, G1-2 vs G3-4, L0 vs. L1, Mo vs. M1, T-Kategorie und UICC-Stadium) als prognostisch relevant herausgestellt und können in den Entscheidungsprozess einer individualisierten Therapiefindung mit einbezogen werden. Für eine differenziertere, hochindividuelle

Therapie, wie zum Beispiel die lokale Exzision bei fortgeschrittenen Karzinomen, ist jedoch unbedingt die Identifikation weiterer zuverlässiger Marker notwendig.

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit ist, inwiefern die Treg-Infiltrationsdichte in Rektumkarzinomen eine prognostische Aussagekraft hat (Gesamtüberleben, rezidivfreies Überleben) und ob sie möglicherweise dadurch oder auch als neuer Prädiktor für Lymphknotenmetastasen in Hinblick auf daraus abgeleitete Therapieentscheidungen eine Rolle spielen kann.

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Untersucht wurden histologische Schnitte der Tumorsektate von 80 Patienten, die zwischen Januar 1998 und April 2002 an der Klinik für Allgemein- und Abdominalchirurgie der Universitätsmedizin Mainz aufgrund eines Rektumkarzinoms radikal operiert worden waren. Dabei wurden alle Patienten, die die Einschlusskriterien erfüllten, chronologisch in der Operationsreihenfolge ohne weitere Selektion aufgenommen.

Die Einschlusskriterien waren R0-Resektion, keine vorangegangene neoadjuvante Therapie und eine 60-monatige Nachbeobachtungszeit. Letzteres war jedoch aufgrund von Todesfällen und ‚loss to follow-up‘ nicht immer zu erreichen, somit lag die mediane Nachbeobachtungszeit zum Zeitpunkt der Auswertung bei 72 (22,3 - 91,8) Monaten.

Das Patientenkollektiv war so zusammengesetzt, dass 40 Patienten zum Zeitpunkt der Operation histologisch gesicherten Lymphknotenbefall im Sinne von pN1 oder pN2 aufwiesen und sich 40 Patienten im Stadium pN0 befanden. Von den lymphknotenpositiven Patienten hatten 3 (3,75 %) eine postoperative adjuvante Radiochemotherapie und 4 (5 %) eine Chemotherapie erhalten, so dass dieser Einflussfaktor zu vernachlässigen war.

Zur statistischen Auswertung wurden für alle Patienten Informationen über die präoperative Diagnostik (z. B. Auswertung nach TNM bzw. UICC, klinischer Fernmetastasenstatus), histopathologische Evaluation (Differenzierungsgrad bzw. Grading) und zum weiteren Follow-Up erfasst und in Form einer SPSS-Datenbank aufbereitet.

Ausgewertet wurden Angaben über die Klassifizierung nach TNM und UICC, der Differenzierungsgrad sowie im Follow-Up das Gesamtüberleben, das lokalrezidivfreie Überleben und das Auftreten von synchronen und metachronen Fernmetastasen.

2.2 Material

Antikörper

CD4 (NCL-CD4-1F6)	Novocastra, Newcastle, GB
CD8 (C8/144B)	Dako, Glostrup, DK
CD25 (NCL-CD25-305)	Novocastra, Newcastle, GB
CD57 (HNK-1)	BD Pharmingen, San Diego, USA
FoxP3 (236A/E7)	Abcam, Cambridge, USA

ABC-Kit

REAL-Envision Detection System, Peroxidase / DAB+, Rabbit / Mouse	Dako, Glostrup, DK
-Lösung A: Mit HRP-Molekülen und sekundären caprinen Antikörpern gegen cuniculine und murine Immunglobuline gekoppeltes Dextran	
-Lösung B: Substratpuffer mit Wasserstoffperoxid	
-Lösung C: Chromogen (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid)	

Zubehör zur Färbung

Endogenous Peroxidase Blocking Solution	Dako, Glostrup, DK
Antikörper-Verdünnungspuffer	DCS Labline, Hamburg
Hämalaunlösung nach Meyer	Merck KGaA, Darmstadt
Eukitt (Einschlussmittel)	O. Kindler GmbH, Freiburg
Isopropylalkohol	O. Kindler GmbH, Freiburg
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt

Zutaten zur Pufferherstellung

Salzsäure (HCl) 1 N	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure (HCl) 2 N	Merck KGaA, Darmstadt
Natronlauge (NaOH) 1 N	Merck KGaA, Darmstadt
TRIS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natrium EDTA (Titriplex III)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumcitrat-Dihydrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA, Darmstadt

Zitronensäure-Monohydrat (C₆H₈O₇ x H₂O)

Merck KGaA, Darmstadt

Aqua B. Braun (H₂O)

B. Braun AG, Melsungen

Geräte und weiteres Zubehör

pH-Meter: Calimatic 761

Knick GmbH & Co. KG, Berlin

Dampfgarer: MultiGourmet FS10

Braun GmbH, Kronberg

Objektträger: SuperFrost Plus

Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig

Deckgläser 24 x 60 mm

Diagonal GmbH & Co. KG, Münster

Pipetten:

- Research 100

Eppendorf AG, Hamburg

- Nichipet 5000DG 0,5 - 10 µl

Nichiryo, Koshigaya-City, JP

- Nichipet 5000DG 20 - 200 µl

Nichiryo, Koshigaya-City, JP

- Nichipet 5000DG 100 - 1000 µl

Nichiryo, Koshigaya-City, JP

Mikroskop: DM LB

Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Kamera: DFC 290

Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Software

ImageJ (Version 1.43o)

National Institute of Health, USA

Leica IM50 (Version 5 Release 247)

Imagic Bildverarbeitung AG, CH

SPSS Statistics 17.0 (Version 17.0.1)

SPSS Inc., USA

Excel 2007

Microsoft Corp., USA

2.3 Herstellung der Pufferlösungen

2.3.1 EDTA-Puffer für die hitzeinduzierte Antigendemaskierung

Zuerst wurden 0,375 g Na-EDTA in 100 ml destilliertem Wasser aufgelöst, dann auf eine Gesamtmenge von 1000 ml aufgefüllt.

Durch tropfenweise Zugabe von 1 N Natronlauge wurde unter kontinuierlicher elektronischer pH-Messung ein Wert von 8,0 eingestellt.

2.3.2 Citrat-Puffer für die hitzeinduzierte Antigendemaskierung

Hierfür wurden zunächst zwei Stammlösungen angelegt, aus denen später der gebrauchsfertige Puffer hergestellt werden konnte.

Herstellung der Stammlösung A (0,1 M Zitronensäurelösung)

21,01 g Zitronensäure wurden in 1000 ml destilliertem Wasser aufgelöst.

Herstellung der Stammlösung B (0,1 M Natriumcitratlösung)

29,41 g Natriumcitrat wurden in 1000 ml destilliertem Wasser aufgelöst.

Herstellung des gebrauchsfertigen Puffers

18 ml Stammlösung A und 82 ml Stammlösung B wurden gemischt und der pH-Wert mit 2 N Salzsäure auf 6,1 eingestellt. Danach wurde mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

2.3.3 TRIS-gepufferte 0,9 % Kochsalzlösung (TBS) als Reaktionsmedium

Herstellung der 10-fach konzentrierten Stammlösung

60,5 g TRIS wurden in 600 ml destilliertem Wasser aufgelöst, mit 2 N Salzsäure auf einen pH von 7,6 titriert und anschließend auf 1000 ml aufgefüllt. Dazu wurden 90 g Natriumchlorid gegeben, um als Produkt eine 9-prozentige Kochsalzlösung zu erhalten.

Herstellung des gebrauchsfertigen Puffers

Durch Verdünnung von 100 ml der Stammlösung mit 900 ml destilliertem Wasser entstand eine 0,9 % Kochsalzlösung mit annähernd physiologischem pH-Wert.

2.4 Auswahl und Anfertigung der Schnitte

Zum Einsatz kamen 2-5 µm dicke Serienschnitte von Paraffinblöcken der formalinfixierten Tumorsektate. Diese wurden auf für die Immunhistochemie (IHC) geeignete Objektträger aufgezogen.

Da von einigen Resektaten mehr als ein Paraffinblock vorhanden waren, wurde von diesen zuerst jeweils ein mit Hämatoxylin / Eosin gefärbter Testschnitt von jedem Block angefertigt. Daraufhin wurde durch lichtmikroskopische Evaluation entschieden, welcher sich am besten für die Fragestellung eignete. Kriterien waren ein großer Karzinomanteil mit sichtbarem Übergang zu normaler Mukosa oder Adenomanteilen, eine gut erkennbare Invasionsfront des Karzinoms und eine allgemein gute Qualität des Schnittes ohne störende Gewebsfragmentierung.

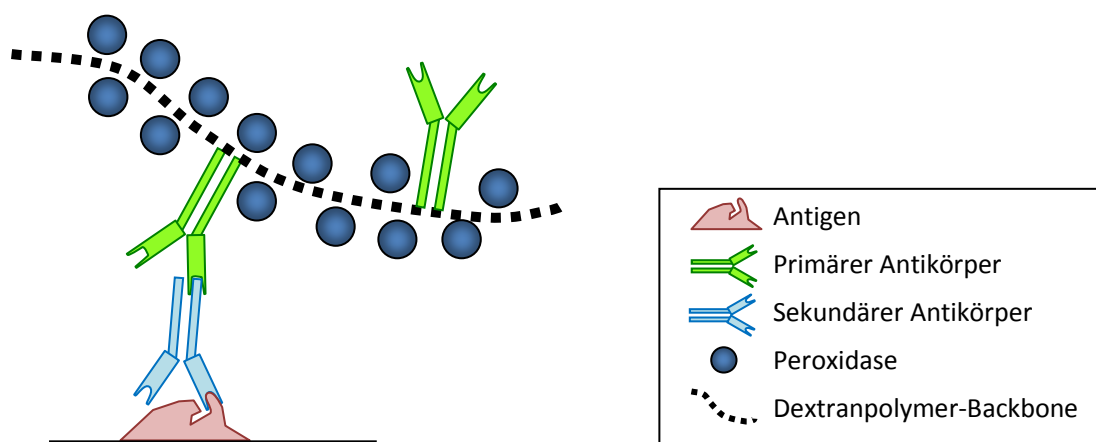
2.5 Immunhistochemische Färbung

2.5.1 Prinzip

Zur Identifizierung und Darstellung der gesuchten Zellen kam eine indirekte immunhistochemische Färbung nach der Dextranpolymer-Methode zum Einsatz.

Dabei bindet zuerst ein unkonjugierter primärer Antikörper an das nachzuweisende Epitop. Im zweiten Schritt wird dessen Fc-Teil von Sekundärantikörpern erkannt, die zusammen mit Peroxidasemolekülen an ein Dextranpolymer-Backbone gebunden sind.

Abbildung 2



Der optische Nachweis des gesuchten Antigens erfolgt über die Peroxidasereaktion, bei der im Substratpuffer enthaltenes Wasserstoffperoxid, katalysiert durch die Peroxidase, ein lösliches, farbloses Chromogen (hier DAB) zu einem braun gefärbten, unlöslichen Niederschlag oxidiert.

Die primären Antikörper waren gegen folgende Antigene gerichtet:

Tabelle 6

Marker	Zielmolekül / Funktion	Bedeutung / Interpretation
CD4	Korezeptor des T-Zell-Rezeptors bei der MHC-II-gebundenen Antigenpräsentation	Marker für T-Helferzellen
CD8	Korezeptor des T-Zell-Rezeptors bei der MHC-I-gebundenen Antigenpräsentation	Marker für zytotoxische T-Zellen
CD25	α -Kette des IL-2 Rezeptors	klassischer IHC-Marker für Tregs, v. a. bei Mäusen
CD57	HNK-1 (Adhäsionsmolekül)	Marker für natürliche Killerzellen
FoxP3	Forkhead Box Binding Protein (Transkriptionsfaktor)	Gebräuchlichster IHC-Marker zur Treg-Identifikation

Als Positivkontrolle dienten humane Tonsillenschnitte, als Negativkontrolle eindeutig identifizierbare nicht-lymphozytäre Gewebearten (z. B. glatte Muskulatur oder nicht infiltrierte Mukosa), die auf jedem Tumorschnitt vorhanden waren.

2.5.2 Durchführung

Die histologischen Tumorschnitte wurden zuerst 2 x 5 Minuten in Xylol deparaffiniert, dann für jeweils 2 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 100 %, 96 %, 70 % Isopropanol) und zuletzt destilliertem Wasser in wässrige Phase überführt.

Darauf folgte die hitzeinduzierte Antigenmaskierung im Dampfgerar. Dabei wurden die Schnitte für jeweils 40 Minuten in der für den jeweiligen primären Antikörper empfohlenen Pufferlösung erhitzt (siehe Tabelle 7).

Nach dem Abkühlen und Spülen der Objektträger mit Leitungswasser wurde die endogene Gewebeperoxidase durch fünfminütige Behandlung mit Blockierungsreagenz inaktiviert.

Nach gründlichem Abspülen unter fließendem Wasser wurden die Schnitte jeweils erst 5 Minuten in destilliertem Wasser gereinigt, dann wurden sie in TBS für die

nachfolgende Applikation des primären Antikörpers vorbereitet, indem durch die weitgehend physiologischen Werte des Puffers hinsichtlich Osmolarität und pH optimale Bedingungen für die Inkubation geschaffen wurden.

Nun wurden auf jedes Präparat 100 µl des verdünnten primären Antikörpers aufgetragen und bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Die verwendete Verdünnung und Inkubationszeit (siehe Tabelle 7) ergab sich aus Herstellerempfehlungen, in wissenschaftlichen Publikationen dokumentierten Werten und zahlreichen eigene Versuchsvarianten, in denen die Parameter für ein optimales Färbungsergebnis ermittelt wurden.

Tabelle 7

Antikörper	Verdünnung	Vorbehandlung	Inkubationszeit
CD4	1:40	EDTA (pH 8,0)	60 min
CD8	1:100	EDTA (pH 8,0)	30 min
CD25	1:100	Citrat (pH 6,1)	60 min
CD57	1:1600	EDTA (pH 8,0)	30 min
FoxP3	1:200	EDTA (pH 8,0)	30 min

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden nichtgebundene primäre Antikörper durch wiederholtes Ausspülen mit TBS ausgewaschen, danach erfolgte das Auftragen von 100 µl des dextran- und peroxidasegekoppelten sekundären Antikörpers, der in gebrauchsfertiger Verdünnung vorlag. Die Inkubation wurde in der feuchten Kammer für 30 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt.

Es folgte ein weiterer Auswaschvorgang mit TBS, der in gleicher Weise wie nach der Inkubation des primären Antikörpers durchgeführt wurde, und das Auftragen des Chromogens, das vorher im Verhältnis 1:50 mit Substratpuffer vermischt worden war. Die nun sichtbar ablaufende Peroxidasereaktion wurde standardisiert nach 5 Minuten durch Abspülen unter fließendem Wasser beendet.

Im Anschluss erfolgte die Gegenfärbung für 30 Sekunden in 1:5 verdünnter Hämalaunlösung mit anschließendem fünfminütigem Abspülen der fertig gefärbten Schnitte unter fließendem Leitungswasser.

Danach folgte die Entwässerung der Schnitte durch schrittweise Überführung in organische Phase mittels einer aufsteigende Alkoholreihe (96 %, 100 % Isopropanol) und 2 x Xylol als Intermedium. Zuletzt wurden die fertig bearbeiteten Schnitte mit Einschlussmittel und Deckgläschen versiegelt.

2.5.3 Schematisches Färbeprotokoll

1. Entparaffinierung			5. Applikation des sekundären Antikörpers		
Xylol		5 min	Sek. AK	100 µl	30 min
Xylol		5 min	spülen mit TRIS		
100 % Isopropanol		2 min	2x TRIS		5 min
100 % Isopropanol		2 min	6. Peroxidasereaktion		
96 % Isopropanol		2 min	DAB +Puffer (1:50)	100 µl	5 min
70 % Isopropanol		2 min	Spülen mit Leitungswasser		
aqua dest.		2 min	aqua dest.		5 min
2. hitzeinduzierte Antigendemaskierung			7. Gegenfärbung		
Kochen mit EDTA / Citrat		40 min	Hämalaun (1:5)		30 s
Spülen mit Leitungswasser		5 min	Spülen mit Leitungswasser		5 min
3. Blocken der endogenen Peroxidase			8. Entwässerung		
Peroxidaseblock	100 µl	5 min	96 % Isopropanol		2 min
Spülen mit Leitungswasser		5 min	100 % Isopropanol		2 min
aqua dest.		5 min	Xylol		2 min
TRIS		5 min	Xylol		2 min
4. Applikation des primären Antikörpers			9. Konservierung		
Prim. AK	100 µl	30 min	Eindecken mit Eukitt		
spülen mit TRIS			Deckgläschen		
2x TRIS		5 min			

2.6 Datenerhebung

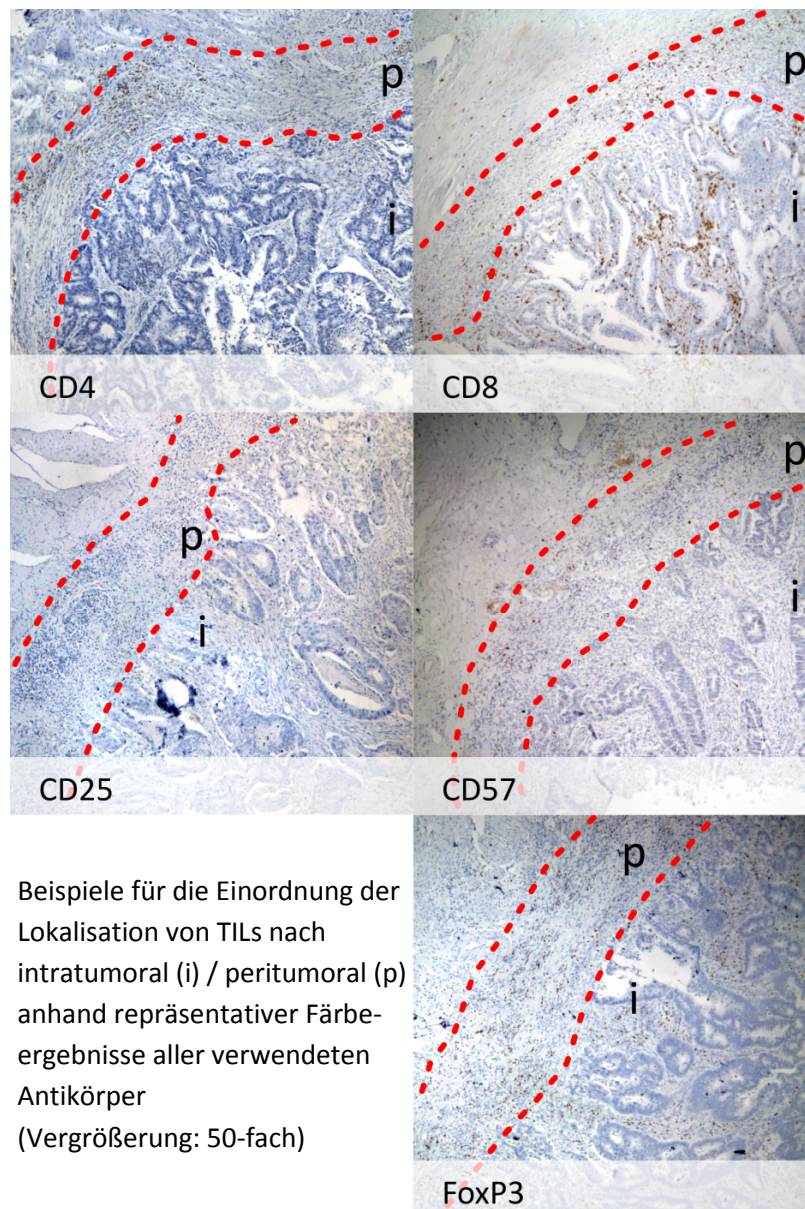
Die gefärbten Schnitte wurden verblindet ohne Kenntnis des TNM-Stadiums oder der Follow-Up-Daten unter dem Mikroskop evaluiert und der Bereich des Karzinoms identifiziert. Daraufhin wurden standardisiert mit Hilfe der Kamera zwei Übersichtsaufnahmen mit 16-facher und 50-facher Vergrößerung, sowie jeweils möglichst 5 überlappungsfreie Kamera-Gesichtsfelder mit 200-facher Vergrößerung aus dem Innern des Tumors (= intratumoral) und aus dem Bereich der Invasionsfront (= peritumoral) fotografiert (siehe Abbildung 3, S. 40). Hierdurch waren die

Tumorausschnitte für Kontrollen jederzeit reproduzierbar und nicht störanfällig. Die Unterscheidung nach der Lokalisation intratumoral / extratumoral hatte bereits zuvor in anderen Studien zu TILs Anwendung gefunden [107, 109].

Dafür wurden jeweils die Stellen mit der höchsten Dichte an positiv gefärbten Zellen ausgewählt. Wenn keine 5 überlappungsfreien Aufnahmen in einem deutlich infiltrierten Bereich möglich waren, wurde deren Anzahl reduziert.

Schließlich lagen von 72,7 % der Schnitte fünf intratumorale Aufnahmen vor, von 19,6 % vier. Damit konnten von 92,3 % mindestens vier Aufnahmen ausgewertet werden. Im peritumoralen Bereich waren von 67,8 % der Schnitte fünf Aufnahmen, von 21,2 % vier vorhanden, folglich von 89,0 % mindestens vier.

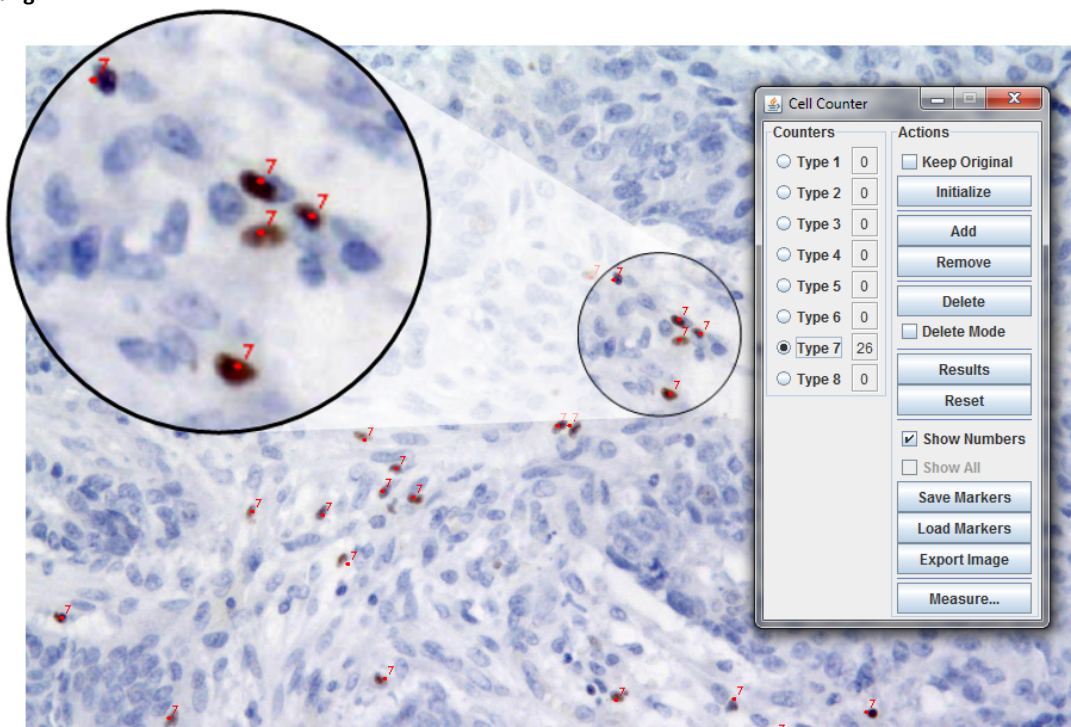
Abbildung 3



Die Aufnahmen wurden im Format 2048 × 1536 Bildpunkte für die – dadurch reproduzierbare – Evaluation gespeichert. Im Anschluss wurden sie zur besseren Erkennbarkeit der positiv gefärbten Zellen mit Hilfe der Stapelverarbeitungsfunktion des Programms *ImageJ* kontrastoptimiert. Dabei wurde für sämtliche Aufnahmen die Einstellung *enhance contrast (saturated pixels 0.0 %)* verwendet.

Danach wurden die optimierten Bilder unter Benutzung der manuellen Zählfunktion *Cell Counter* desselben Programms ausgewertet (siehe Abbildung 4). Hierbei erfolgt die Erfassung der gewünschten Zellen manuell durch Anklicken, wobei die Klicks automatisch gezählt und bereits angewählte Zellen graphisch markiert werden.

Abbildung 4



Aus den fünf ermittelten Zellzahlen wurde jeweils der Mittelwert für den intratumoralen und den peritumoralen Bereich errechnet.

Um eine bessere Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der ermittelten durchschnittlichen Infiltrationsdichte zu erreichen, wurden die Zellzahlen pro (Kamera-)Gesichtsfeld (1 GF \triangleq 0,64 mm²) in Zellen pro mm² umgerechnet:

$$\frac{\text{Zellen/GF}}{0,64 \text{ mm}^2/\text{GF}} = \text{Zellen/mm}^2$$

2.7 Statistische Auswertung

Unterschiede zwischen stetigen Messwerten zweier Gruppen wurden aufgrund nicht normalverteilter Werte mittels Mann-Whitney U-Test analysiert. Für Überlebenskurven und zur Berechnung von Risiken wurden zwei Gruppen gebildet (hohe / niedrige Infiltrationsdichte). Dabei erfolgte die Einteilung nicht subjektiv, sondern aufgrund der erhobenen Messwerte in Zellen/mm², indem der jeweils ermittelte Median als Cutoff verwendet wurde, so dass zwei gleich große Gruppen entstanden. Diese Dichotomisierung erfolgte vor Beginn der statistischen Auswertung, eine nachträgliche ergebnisorientierte Anpassung fand nicht statt.

War es möglich, ein Risiko zu berechnen (zum Beispiel bei der Fragestellung, ob Patienten mit hoher Infiltrationsdichte ein höheres Risiko für Lymphknotenbefall haben), wurde der Exakte Fisher-Test verwendet, um die Odds Ratio sowie den p-Wert zu berechnen.

Wie allgemein üblich, wurden p-Werte < 0,05 als signifikant angesehen.

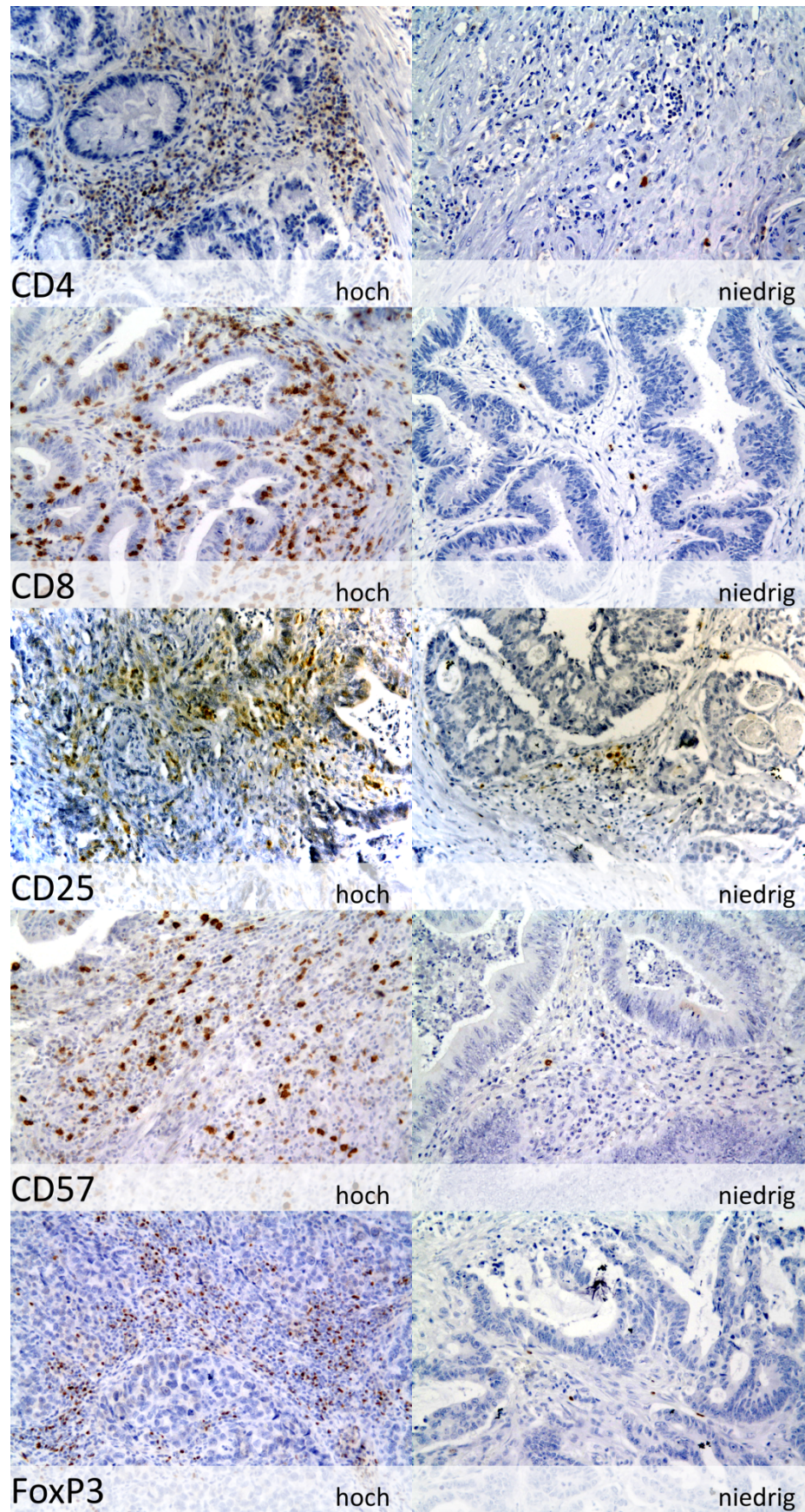
Zur zusätzlichen Untermauerung der Ergebnisse wurden die p-Werte in einem zweiten Schritt unter dem Gesichtspunkt des multiplen Testens erneut bewertet. Um, wie zunehmend gefordert, das Problem der α -Fehler-Kumulation [242] zu berücksichtigen, wurden alle durchgeführten statistischen Tests nach der explorativen Simes-Prozedur, beschrieben von Benjamini und Hochberg [243], auf Signifikanz überprüft. Dabei werden alle ermittelten p-Werte nach der Größe geordnet und der Reihe nach mit einem ansteigenden lokalen Signifikanzniveau verglichen. Die zugehörigen Nullhypothesen werden abgelehnt (d. h. der Unterschied gilt als statistisch signifikant), solange gilt:

$$p_{(i)} \leq \frac{i}{m} \alpha_{global}$$

wobei $p_{(i)}$ den p-Wert auf Platz i in der Reihenfolge, m die Anzahl aller p-Werte und α_{global} das globale Signifikanzniveau (hier 0,05) bezeichnet.

(Durchführung siehe Tabelle 17, Anhang S. 97)

Abbildung 5



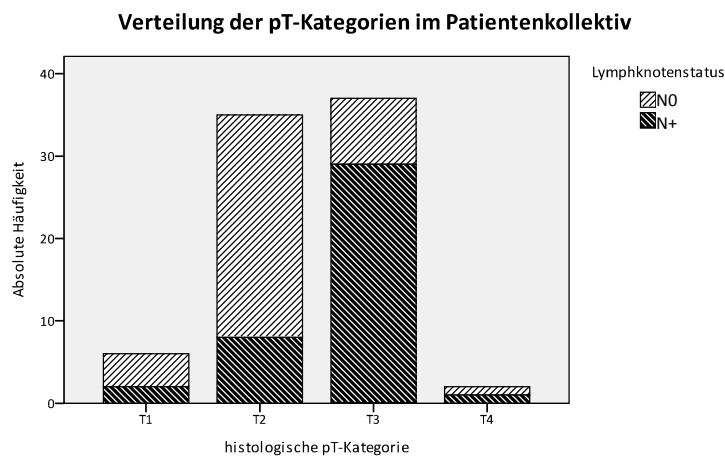
Repräsentative Beispiele für hohe und niedrige Infiltrationsdichte, aufgenommen in 200-facher Vergrößerung

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

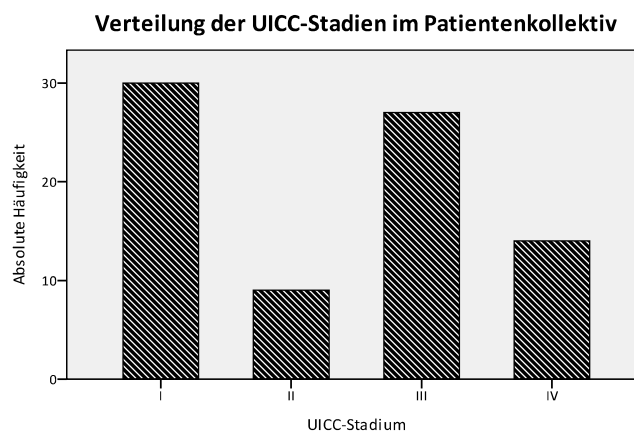
Die Verteilung der T-Kategorien zeigte einen Schwerpunkt auf T2 und T3 mit 43,8 % und 46,2 %, wobei der zu erwartende Zuwachs an lymphknotenpositiven Patienten von T2 (22,9 %) zu T3 (78,4 %) zu erkennen war.

Diagramm 1



Eingeteilt nach UICC-Stadien zeigte sich eine deutliche Häufung bei UICC I und III mit 36,7 % und 32,1 %, nur 9 Patienten (11,3 %) befanden sich im UICC-Stadium II, bedingt durch den niedrigen Anteil lymphknotennegativer T3/4-Karzinome.

Diagramm 2



3.2 Beschreibung der verschiedenen Färbungen

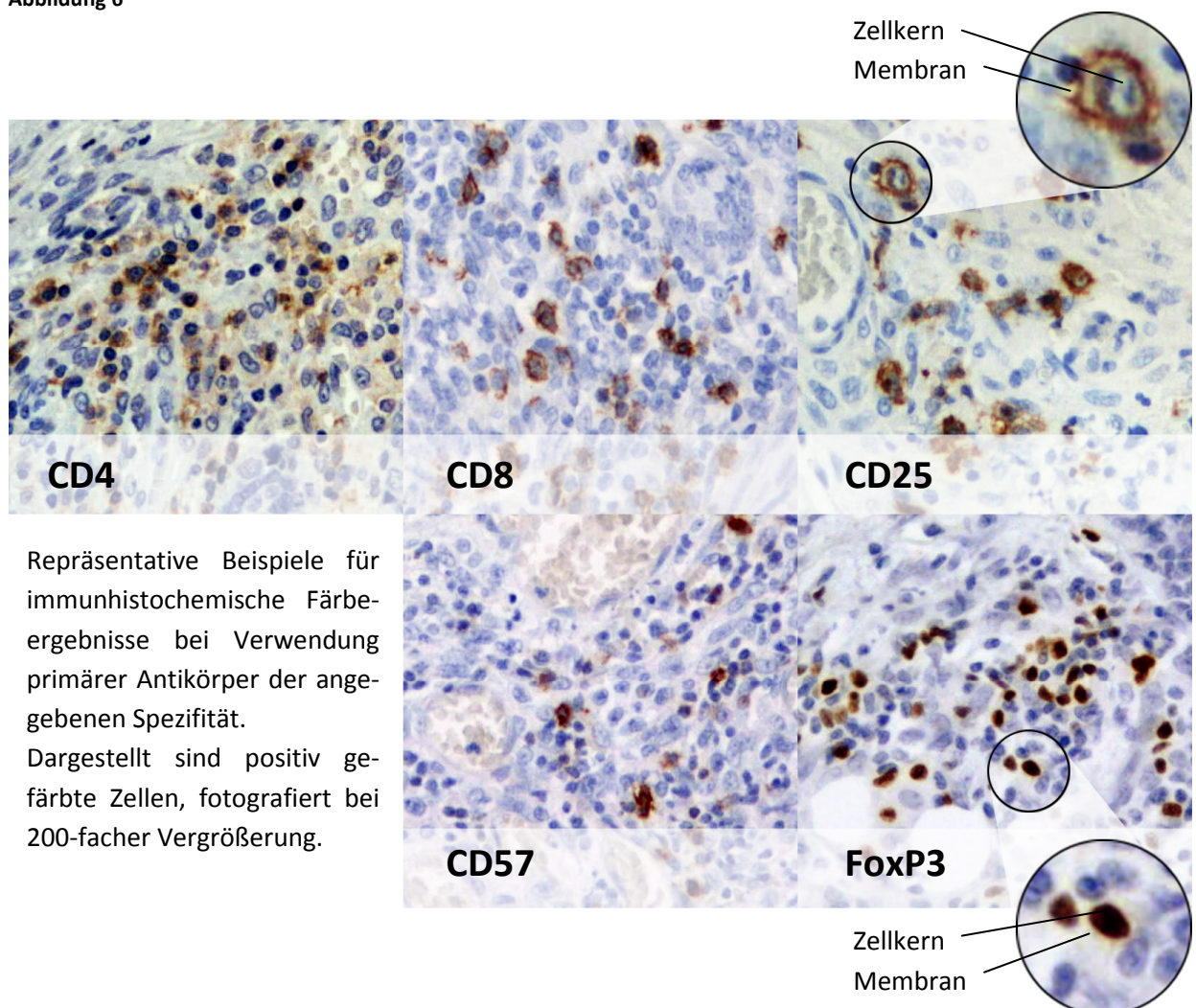
Insgesamt wurde jeder der immunhistochemischen Marker unter den tumorinfiltrierenden Lymphozyten nachgewiesen. Es zeigten sich jedoch Unterschiede im Färbeverhalten auf zellulärer Ebene sowie in der Anzahl der gefärbten Zellen pro mm^2 .

3.2.1 Färbecharakteristik

Die für die Oberflächenmarker CD8, CD4, CD25 und CD57 spezifischen Färbungen zeigten eine membranständige Färbung bei Lymphozyten, die diesen Marker exprimierten. Je nach Schnittebene war zu erkennen, dass der Zellkern jeweils ausgespart blieb. Die Färbung des Transkriptionsfaktors FoxP3 ergab eine spezifische Kernfärbung ohne Beteiligung des Zytoplasmas oder der Membran.

Somit war das Plausibilitätskriterium des zu erwarteten Färbemusters erfüllt.

Abbildung 6



3.2.2 Verteilung der positiv gefärbten Zellen

In den Auszählungen der Zellen pro mm² zeigten sich zwischen den einzelnen Färbungen unterschiedlicher Spezifität deutliche Unterschiede. Unter den verwendeten Markern wies CD57 mit einem Median von 16 intratumoralen und 33 peritumoralen Zellen pro mm² die geringste, CD4 mit 270 intratumoralen und 326 peritumoralen Zellen pro mm² die höchste Dichte auf (Diagramm 3; Tabelle 8). Weiterhin fiel auf, dass bei allen Markern außer FoxP3 die intratumorale Infiltration etwas niedriger war als die peritumorale.

Diagramm 3

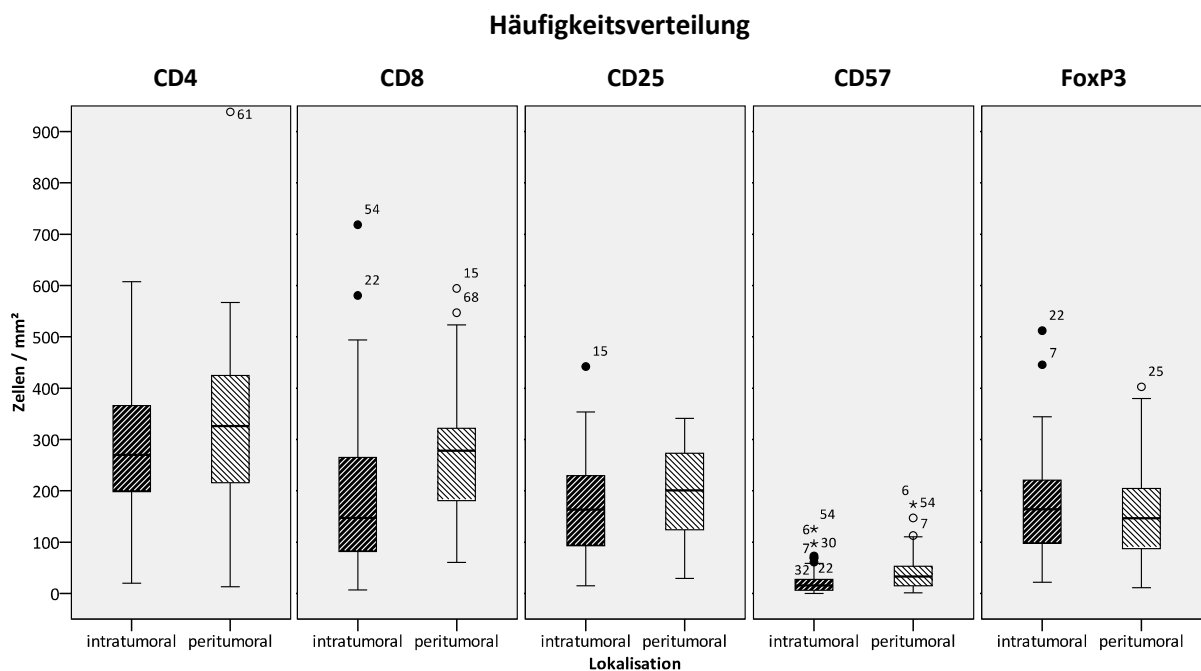


Tabelle 8

Infiltrationsdichten der einzelnen Färbungen

		Median (1. - 3. Quartil)*	Minimum / Maximum*
CD4	intratumoral	270 (197 - 368)	20 / 608
	peritumoral	326 (214 - 425)	14 / 938
CD8	intratumoral	148 (79 - 266)	7 / 718
	peritumoral	278 (181 - 322)	61 / 594
CD25	intratumoral	163 (93 - 230)	15 / 442
	peritumoral	201 (124 - 273)	30 / 341
CD57	intratumoral	16 (6 - 28)	0 / 126
	peritumoral	33 (15 - 55)	2 / 174
FoxP3	intratumoral	163 (97 - 222)	22 / 512
	peritumoral	147 (88 - 205)	11 / 403

*Angabe in Zellen / mm²

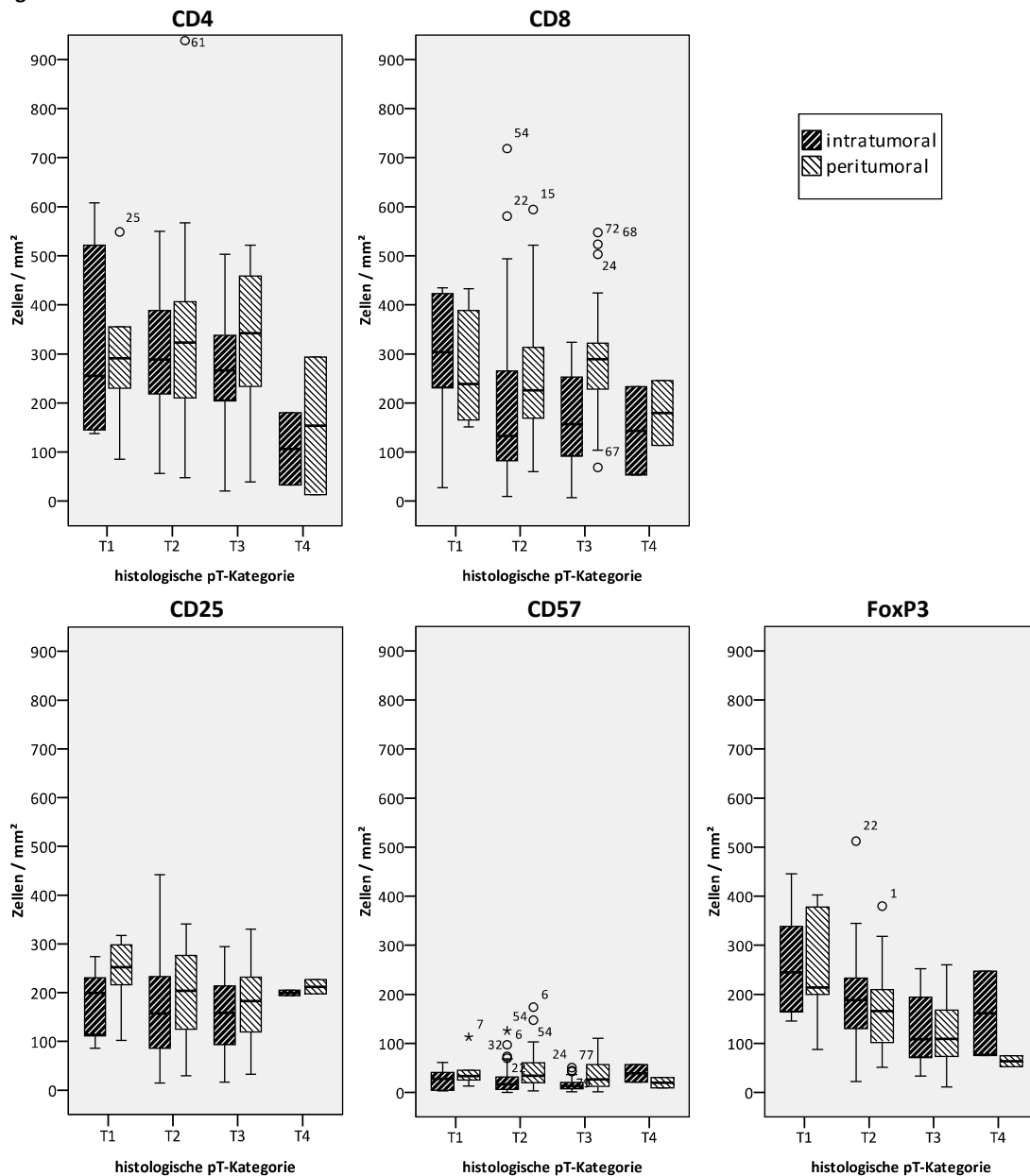
3.3 Korrelation mit klinischen / pathologischen Parametern

3.3.1 Tumorstadium

Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der Anzahl der FoxP3-positiven Zellen, zwischen Karzinomen verschiedener T-Kategorien. Die Infiltrationsdichte war bei T1-Karzinomen am höchsten (siehe Diagramm 4).

Im Vergleich von T1/2 gegenüber T3/4 (lokal begrenzt vs. fortgeschritten) lag sowohl bei intra- als auch bei peritumoralen FoxP3-positiven Zellen der p-Wert bei statistisch hochsignifikanten 0,002 und 0,001. Alle anderen zellspezifischen Marker wiesen keinen Unterschied zwischen beiden Gruppen auf (siehe Tabelle 10, S. 53).

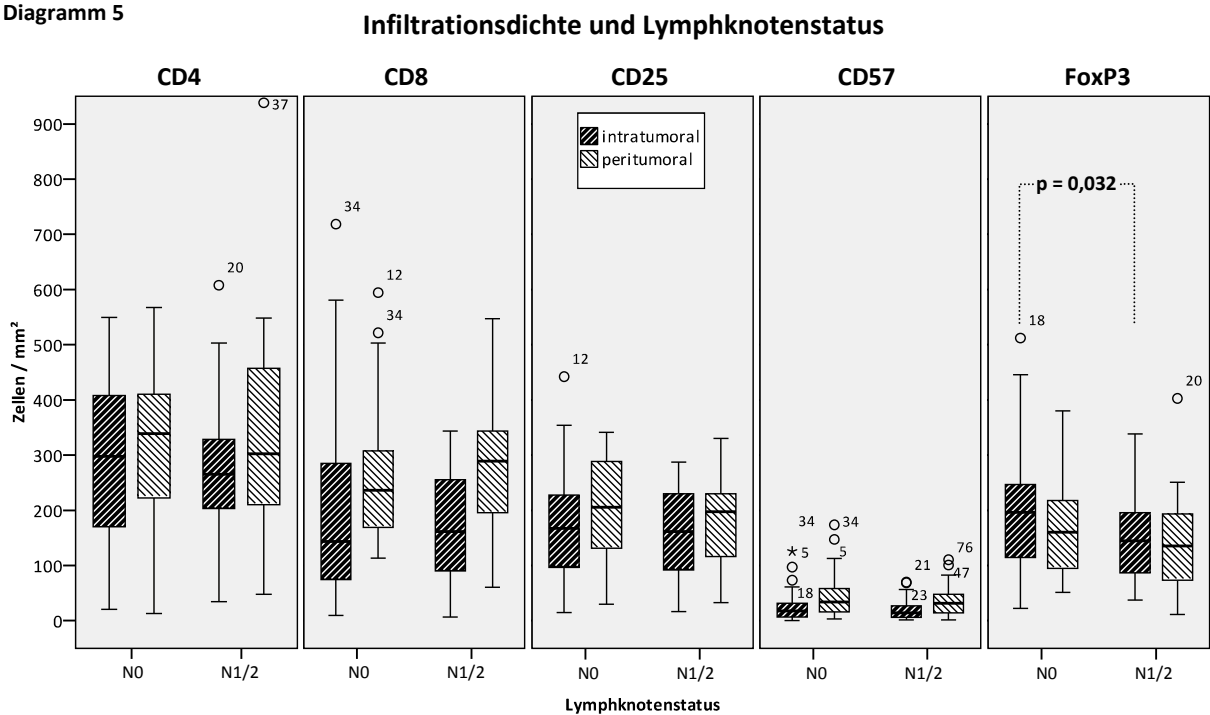
Diagramm 4



3.3.2 Lymphknotenstatus

Ein eventueller Unterschied hinsichtlich der Lymphozyten-Infiltrationsdichte zwischen nodal positiven und negativen Karzinomen wurde mittels Mann-Whitney U-Test untersucht. Hier wiesen lymphknotenpositive Karzinome mit einem p-Wert von 0,032 eine signifikant geringere intratumorale Infiltrationsdichte mit FoxP3-positiven Zellen auf (Diagramm 5). Bei den Infiltrationsdichten der Färbungen anderer Spezifität zeigte sich kein Unterschied zwischen beiden Gruppen (siehe auch Tabelle 10, S. 53).

Diagramm 5



Nach dem Nachweis eines signifikanten Unterschiedes in der intratumoralen Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen wurde im zweiten Schritt untersucht, ob diese sich eventuell als Risikofaktor oder protektiver Faktor für Lymphknotenbefall herausstellen würde. Dazu wurden die ermittelten Zellzahlen pro mm² mit dem Median (147 Zellen / mm²) als Cutoff in hoch / niedrig dichotomisiert und mittels Exaktem Fisher-Test die Odds Ratio berechnet. Hier erwies sich eine hohe Infiltrationsdichte als ein signifikanter (p = 0,044) protektiver Faktor gegen Lymphknotenmetastasen mit einer Odds Ratio von 0,360 (0,146 - 0,890).

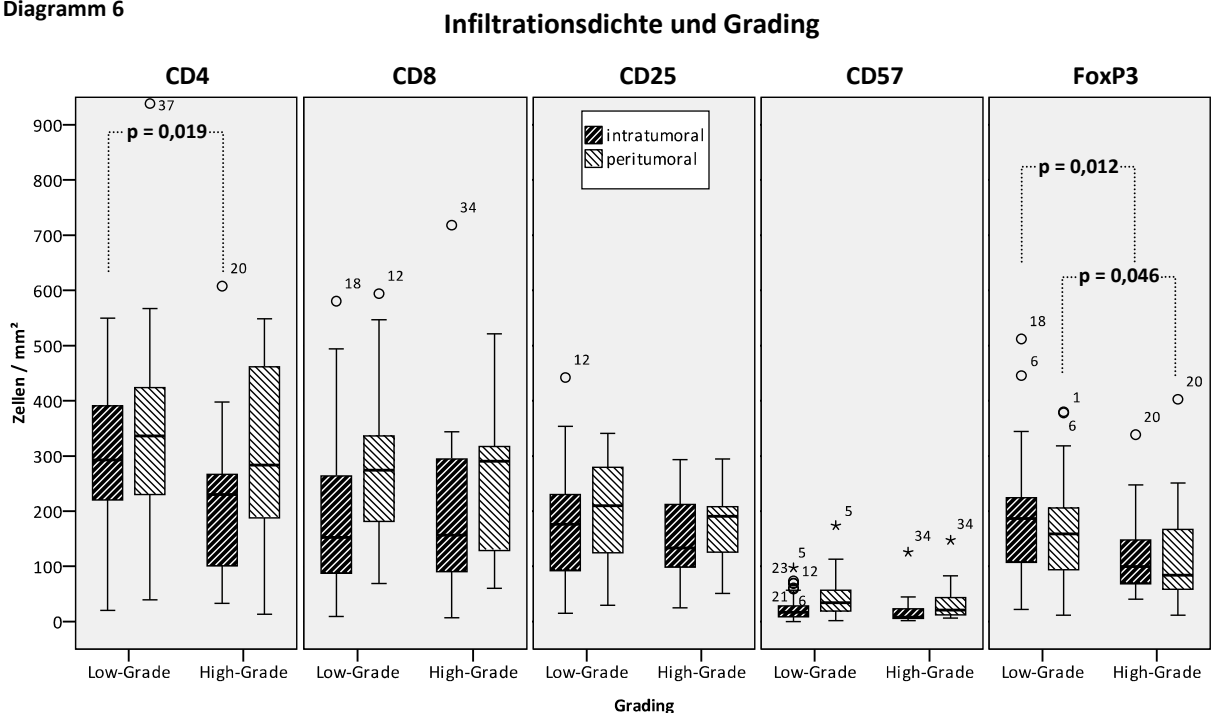
Im Umkehrschluss kann demnach eine niedrige Infiltrationsdichte als ein Risikofaktor (OR = 2,778) für Lymphknotenbefall angesehen werden (siehe Tabelle 11, S. 54).

3.3.3 Histologisches Grading

Zur Analyse eines eventuellen Zusammenhangs zwischen der Infiltrationsdichte positiv gefärbter Zellen und dem histologischen Grading des jeweiligen Karzinoms wurden zwei Gruppen für low-grade (G1/2) und high-grade (G3/4) gebildet. Zwei Patienten waren als „G2-3“ eingestuft worden und wurden daher aus der Analyse ausgeschlossen.

Bei low-grade-Karzinomen zeigte sich eine signifikant höhere Infiltration mit intratumoralen CD4-positiven ($p = 0,019$), intratumoralen FoxP3-positiven ($p = 0,012$) und peritumoralen FoxP3-positiven Zellen ($p = 0,046$) (Diagramm 6; Tabelle 10, S. 53).

Diagramm 6



3.3.4 Fernmetastasen

Zum Zeitpunkt der Operation wiesen 14 Patienten Fernmetastasen auf, im Follow-Up folgten weitere 11 Fälle mit metachroner Fernmetastasierung.

Untersucht wurden Unterschiede in der Infiltrationsdichte aller Marker zwischen Karzinomen ohne und mit synchroner Fernmetastasierung. In der Untergruppe der Patienten, die zum Operationszeitpunkt keine Metastasen aufwies, wurden Karzinomen ohne und mit metachroner Fernmetastasierung verglichen, und schließlich die beiden Gruppen Karzinome mit (synchroner und metachroner) „Gesamt-“Metastasierung und ohne Fernmetastasen im gesamten Beobachtungszeitraum (siehe Tabelle 9, S. 51). Der Vergleich der Infiltrationsdichten erfolgte durch den Mann-Whitney U-Test.

Bei allen drei analysierten Paarungen zeigte sich eine signifikant höhere peritumorale Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen ($p = 0,011$; $p = 0,012$; $p < 0,001$) bei Karzinomen ohne Metastasen. Im Vergleich der synchronen Metastasierung zeigte sich auch eine signifikant höhere intratumorale FoxP3-Infiltrationsdichte ($p = 0,006$).

Weiterhin wiesen Karzinomen mit metachroner Metastasierung eine signifikant niedrigere peritumorale Infiltrationsdichte mit CD25-positiven Zellen auf ($p = 0,045$). Wenn nun die Karzinome mit synchroner und metachroner Metastasierung als Gruppe zusammengefasst wurde, zeigten diese Karzinome eine signifikant niedrigere peritumorale CD25-Infiltrationsdichte ($p = 0,018$) und intratumorale CD57-Infiltrationsdichte ($p = 0,036$) als diejenigen ohne Metastasierung.

Daraufhin wurden erwähnten Infiltrationsdichten, die im Mann-Whitney U-Test einen signifikanten Unterschied aufwiesen, auf eine eventuelle Rolle als Risikofaktor bzw. protektiver Faktor analysiert.

Hier erwies sich nach Dichotomisierung eine hohe peritumorale FoxP3-Infiltrationsdichte als signifikanter protektiver Faktor gegenüber synchroner, metachroner und gesamter Metastasierung (Odds Ratio = 0,123; 0,214; 0,143). Eine hohe intratumorale FoxP3-Infiltrationsdichte war ein signifikanter protektiver Faktor (OR = 0,214) gegenüber gesamter Metastasierung (95 %-Konfidenzintervalle und p-Werte siehe Tabelle 11, S. 54).

Tabelle 9

Korrelation der Infiltrationsdichten mit der Metastasierung

Verteilung der Patienten nach Metastasierung und Infiltrationsdichte ^(a)			p-Wert ^(b)
	M0 zum OP-Zeitpunkt 66 Patienten	M1 zum OP-Zeitpunkt 14 Patienten	
CD4			
intratumoral	278 (193 - 373)	263 (196 - 362)	p = 0,709
peritumoral	336 (224 - 456)	294 (186 - 391)	p = 0,260
CD8			
intratumoral	148 (88 - 267)	155 (34 - 258)	p = 0,455
peritumoral	278 (197 - 315)	273 (136 - 385)	p = 0,825
CD25			
intratumoral	174 (96 - 231)	131 (61 - 196)	p = 0,171
peritumoral	205 (135 - 277)	133 (107 - 231)	p = 0,149
CD57			
intratumoral	17 (8 - 34)	10 (4 - 22)	p = 0,068
peritumoral	34 (19 - 61)	16 (8 - 38)	p = 0,055
FoxP3			
intratumoral	177 (106 - 232)	103 (71 - 155)	p = 0,006 (sig.)
peritumoral	159 (92 - 209)	97 (63 - 137)	p = 0,011 (sig.)
	↙ ↘		
	weiterhin M0 im Follow-Up 55 Patienten	M1 im Follow-Up 11 Patienten	
CD4			
intratumoral	297 (195 - 398)	267 (136 - 279)	p = 0,119
peritumoral	342 (243 - 455)	234 (189 - 468)	p = 0,177
CD8			
intratumoral	157 (88 - 280)	122 (65 - 217)	p = 0,434
peritumoral	275 (201 - 323)	280 (165 - 298)	p = 0,502
CD25			
intratumoral	162 (93 - 235)	178 (97 - 203)	p = 0,731
peritumoral	216 (137 - 280)	160 (94 - 207)	p = 0,045 (sig.)
CD57			
intratumoral	18 (8 - 37)	12 (7 - 17)	p = 0,245
peritumoral	34 (20 - 60)	35 (13 - 64)	p = 0,667
FoxP3			
intratumoral	185 (120 - 246)	127 (59 - 210)	p = 0,079
peritumoral	171 (95 - 213)	93 (42 - 158)	p = 0,012 (sig.)
	↓ ↘		
	nicht metastasierte Karzinome 55 Patienten	metastasierte Karzinome gesamt 25 Patienten	
CD4			
intratumoral	297 (195 - 398)	264 (188 - 295)	p = 0,189
peritumoral	342 (243 - 455)	257 (195 - 401)	p = 0,073
CD8			
intratumoral	157 (88 - 280)	133 (52 - 241)	p = 0,278
peritumoral	275 (201 - 323)	280 (145 - 338)	p = 0,503
CD25			
intratumoral	162 (93 - 235)	165 (76 - 196)	p = 0,241
peritumoral	216 (137 - 280)	159 (106 - 213)	p = 0,018 (sig.)
CD57			
intratumoral	18 (8 - 37)	12 (5 - 19)	p = 0,036 (sig.)
peritumoral	34 (20 - 60)	22 (9 - 47)	p = 0,098
FoxP3			
intratumoral	185 (120 - 246)	104 (71 - 191)	p = 0,098
peritumoral	171 (95 - 213)	94 (62 - 143)	p < 0,001 (sig.)

^(a) in Zellen / mm; Median (1. - 3. Quartil)^(b) Mann-Whitney-U-Test

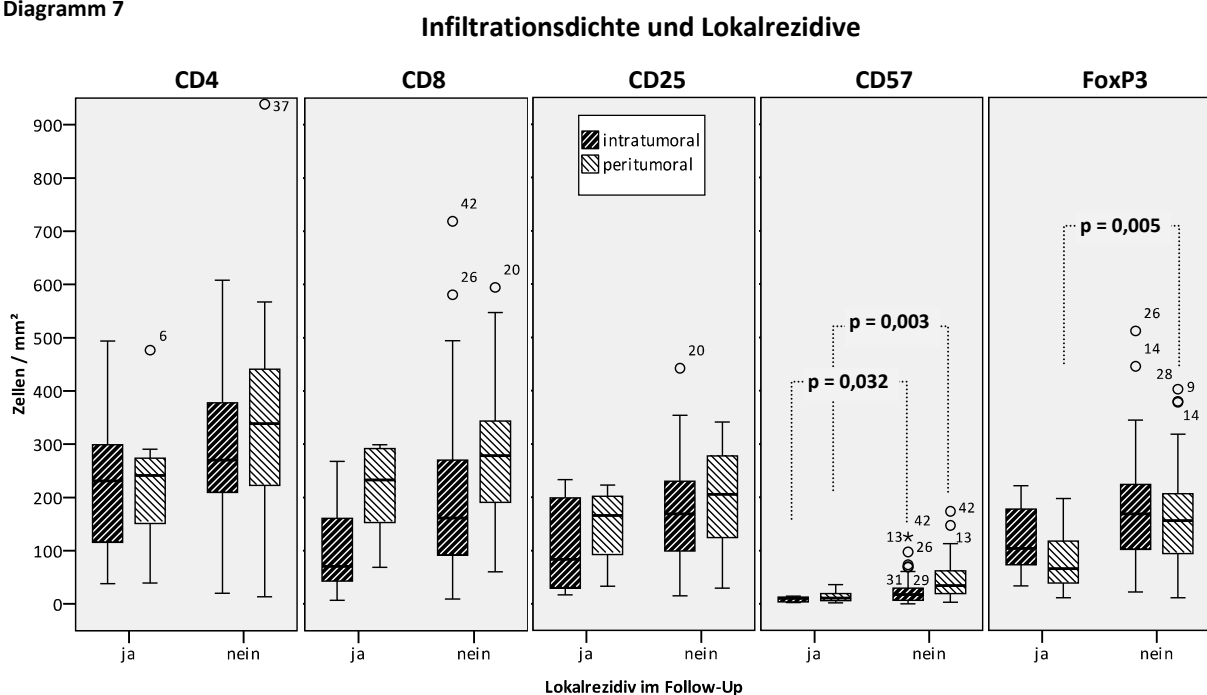
3.3.5 Lokalrezidive

Im Follow-Up entwickelten 8 Patienten (10 %) ein Lokalrezidiv, 7 davon waren zum Operationszeitpunkt lymphknotenpositiv.

Es wurden Unterschiede in der Infiltrationsdichte aller Marker zwischen Patienten mit und ohne Lokalrezidiv durch einen Mann-Whitney U-Test analysiert.

Hier zeigte sich, dass bei Patienten ohne Lokalrezidiv die intra- und peritumorale CD57-Infiltrationsdichte ($p = 0,032$; $p = 0,003$) und die peritumorale FoxP3-Infiltrationsdichte ($p = 0,005$) signifikant höher war (Diagramm 7; Tabelle 10, S. 53).

Diagramm 7



Auch diese Marker wurden auf ihre Rolle als Risikofaktor oder protektiver Marker überprüft. Hier erwies sich nur eine hohe intratumorale Infiltrationsdichte mit CD57-positiven Zellen als signifikanter ($p = 0,005$) protektiver Faktor gegen Lokalrezidive mit einer Odds Ratio von 0, da alle LR-Fälle ausschließlich bei niedriger Infiltrationsdichte aufgetreten waren.

(p-Werte der anderen – nicht signifikanten – Marker siehe Tabelle 10, S. 53 und Tabelle 11, S. 54)

Tabelle 10

Korrelation der Infiltrationsdichten mit klinisch-pathologischen Merkmalen

	N	CD4 ^(a)		CD8 ^(a)		CD25 ^(a)		CD57 ^(a)		FoxP3 ^(a)	
		intratumoral	peritumoral	intratumoral	peritumoral	intratumoral	peritumoral	intratumoral	peritumoral	intratumoral	peritumoral
T-Status	T1/2 (limitiert)	289 (208 - 408)	323 (210 - 407)	140 (82 - 281)	226 (166 - 330)	178 (89 - 233)	212 (125 - 283)	18 (6 - 37)	34 (20 - 61)	188 (135 - 253)	179 (102 - 225)
	T3/4 (fortgeschritten)	266 (180 - 338)	333 (212 - 458)	156 (76 - 252)	288 (201 - 322)	162 (93 - 214)	192 (119 - 232)	14 (8 - 21)	27 (11 - 57)	108 (71 - 197)	108 (73 - 168)
	p-Wert ^(b)	0,368	0,686	0,573	0,270	0,453	0,235	0,386	0,197	0,002 (sig.)	0,001 (sig.)
N-Status	N-	298 (157 - 416)	339 (221 - 412)	143 (73 - 286)	236 (168 - 309)	168 (94 - 232)	205 (129 - 289)	18 (6 - 32)	34 (15 - 59)	196 (111 - 247)	145 (84 - 196)
	N+	265 (203 - 330)	303 (209 - 458)	162 (89 - 257)	289 (191 - 347)	162 (91 - 230)	198 (114 - 231)	14 (6 - 27)	32 (14 - 48)	160 (94 - 220)	135 (73 - 196)
	p-Wert ^(b)	0,538	0,885	0,962	0,379	0,554	0,184	0,494	0,668	0,032 (sig.)	0,057
Grading	G1/2 (Low-Grade)	304 (219 - 399)	337 (229 - 424)	179 (85 - 265)	275 (181 - 340)	171 (92 - 231)	199 (122 - 280)	22 (8 - 28)	41 (18 - 58)	182 (106 - 226)	159 (94 - 206)
	G3/4 (High-Grade)	224 (99 - 267)	305 (187 - 462)	204 (83 - 305)	261 (122 - 320)	155 (96 - 222)	173 (125 - 213)	22 (6 - 24)	36 (12 - 45)	123 (64 - 158)	125 (58 - 178)
	p-Wert ^(b)	0,019 (sig.)	0,586	0,683	0,872	0,599	0,209	0,307	0,290	0,012 (sig.)	0,048 (sig.)
Lokal- rezidiv	nein	270 (207 - 382)	339 (221 - 448)	162 (92 - 272)	278 (186 - 347)	169 (98 - 230)	205 (124 - 278)	18 (7 - 30)	34 (19 - 63)	169 (102 - 224)	156 (94 - 207)
	ja	231 (106 - 309)	241 (123 - 282)	71 (40 - 186)	233 (147 - 295)	84 (27 - 201)	166 (63 - 203)	10 (3 - 13)	11 (6 - 21)	104 (38 - 130)	66 (38 - 130)
	p-Wert ^(b)	0,255	0,056	0,050	0,170	0,066	0,112	0,032 (sig.)	0,003 (sig.)	0,116	0,005 (sig.)

^(a) intratumorale und peritumorale Infiltrationsdichte in Zellen / mm²; Median (1. - 3. Quartil)^(b) Mann-Whitney-U-Test

* Erklärung: Zwei Patienten waren als „G2-3“ eingestuft und daher aus der Auswertung ausgeschlossen worden

Tabelle 11

Zusammenstellung der durchgeführten Risikoberechnungen

		Lymphknotenbefall			
		N-	N+	Odds Ratio (95 %-KI) ^(a)	p-Wert ^(a)
FoxP3	intratumoral				
	hohe Infiltrationsdichte	25 Patienten	15 Patienten	0,360	0,044 (sig.)
	niedrige Infiltrationsdichte	15 Patienten	25 Patienten	(0,146 - 0,890)	
synchrone Metastasierung					
		M-	M+	Odds Ratio (95 %-KI) ^(a)	p-Wert ^(a)
FoxP3	intratumoral				
	hohe Infiltrationsdichte	37 Patienten	3 Patienten	0,214	0,037 (sig.)
	niedrige Infiltrationsdichte	29 Patienten	11 Patienten	(0,055 - 0,838)	
	peritumoral				
	hohe Infiltrationsdichte	38 Patienten	2 Patienten	0,123	0,006 (sig.)
	niedrige Infiltrationsdichte	28 Patienten	12 Patienten	(0,025 - 0,593)	
metachrone Metastasierung					
		mM-	mM+	Odds Ratio (95 %-KI) ^(a)	p-Wert ^(a)
CD25	peritumoral				
	hohe Infiltrationsdichte	32 Patienten	4 Patienten	0,411	0,206
	niedrige Infiltrationsdichte	23 Patienten	7 Patienten	(0,108 - 1,569)	
FoxP3	peritumoral				
	hohe Infiltrationsdichte	35 Patienten	3 Patienten	0,214	0,043 (sig.)
	niedrige Infiltrationsdichte	20 Patienten	8 Patienten	(0,051 - 0,901)	
Gesamtmetastasierung					
		gM-	gM+	Odds Ratio (95 %-KI) ^(a)	p-Wert ^(a)
CD25	peritumoral				
	hohe Infiltrationsdichte	32 Patienten	8 Patienten	0,338	0,053
	niedrige Infiltrationsdichte	23 Patienten	17 Patienten	(0,125 - 0,916)	
CD57	peritumoral				
	hohe Infiltrationsdichte	32 Patienten	8 Patienten	0,338	0,053
	niedrige Infiltrationsdichte	23 Patienten	17 Patienten	(0,125 - 0,916)	
FoxP3	peritumoral				
	hohe Infiltrationsdichte	35 Patienten	5 Patienten	0,143	0,001 (sig.)
	niedrige Infiltrationsdichte	20 Patienten	20 Patienten	(0,046 - 0,439)	
Lokalrezidiv					
		nein	ja	Odds Ratio (95 %-KI) ^(a)	p-Wert ^(a)
CD57	intratumoral				
	hohe Infiltrationsdichte	40 Patienten	0 Patienten	0 *	0,005 (sig.)
	niedrige Infiltrationsdichte	32 Patienten	8 Patienten		
	peritumoral				
	hohe Infiltrationsdichte	39 Patienten	1 Patient	0,121	0,057
	niedrige Infiltrationsdichte	33 Patienten	7 Patienten	(0,014 - 1,033)	
FoxP3	peritumoral				
	hohe Infiltrationsdichte	39 Patienten	1 Patient	0,121	0,057
	niedrige Infiltrationsdichte	33 Patienten	7 Patienten	(0,014 - 1,033)	

* OR = 0 bzw. geht gegen 0, da eine der Häufigkeiten = 0

^(a) Exakter Fisher-Test (2-seitig)

3.4 Überlebenszeitanalyse

3.4.1 Univariate Analyse des lokalrezidivfreien Überlebens

Es wurde eine Analyse des lokalrezidivfreien Überlebens mit den verschiedenen dichotomisierten Infiltrationsdichten als Einflussfaktoren in Form von Kaplan-Meier-Überlebenskurven angefertigt (siehe Diagramm 8, S. 56). Der Vergleich der Einflussfaktoren erfolgte im univariaten Log-Rank-Test (Tabelle 12).

Es ergab sich eine signifikant längere Lokalrezidivfreiheit für Karzinome mit einer hohen peritumoralen CD4-Infiltration ($p = 0,019$), einer hohen intratumoralen ($p = 0,003$) und peritumoralen ($p = 0,027$) CD57-Infiltration sowie einer hohen intratumoralen ($p = 0,030$) und peritumoralen ($p = 0,005$) FoxP3-Infiltration.

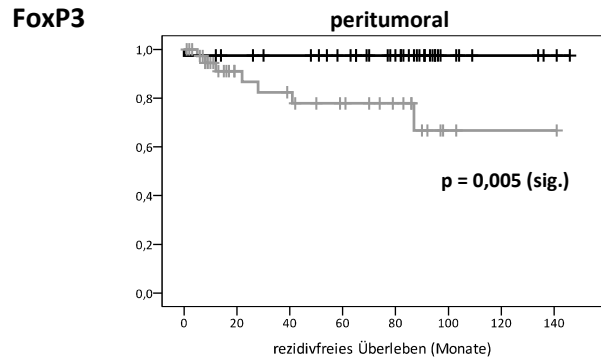
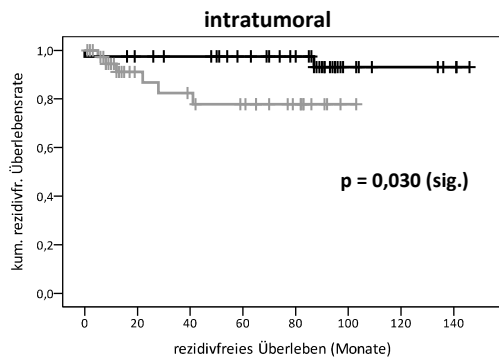
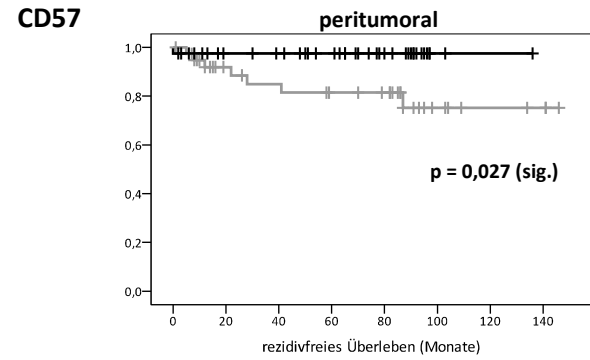
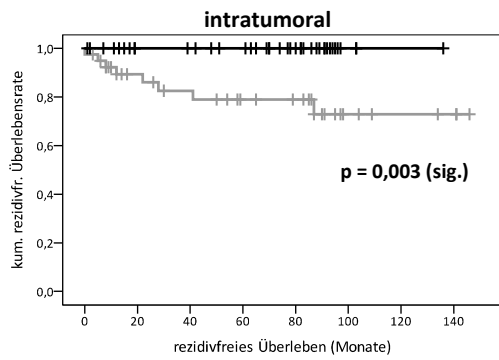
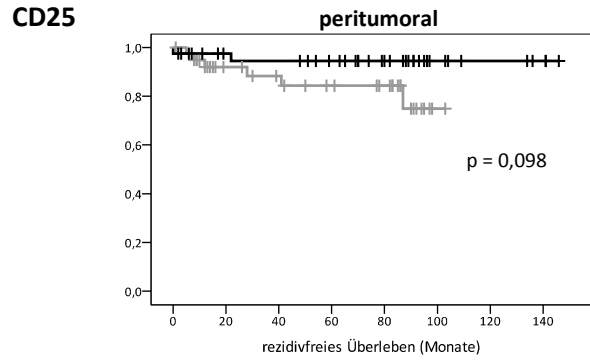
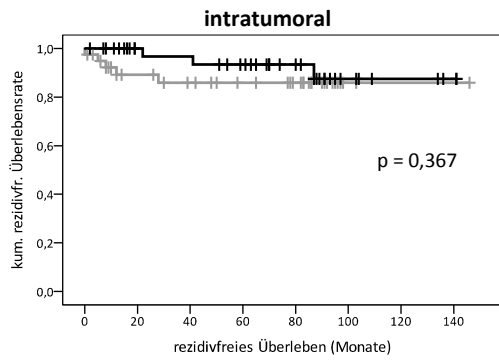
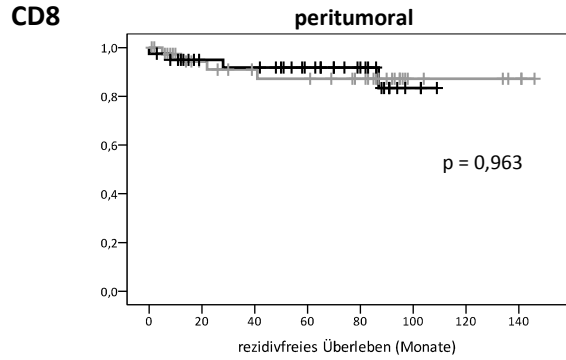
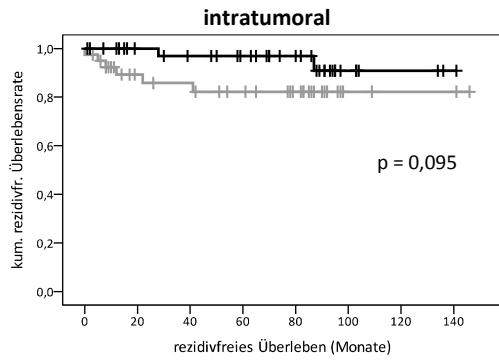
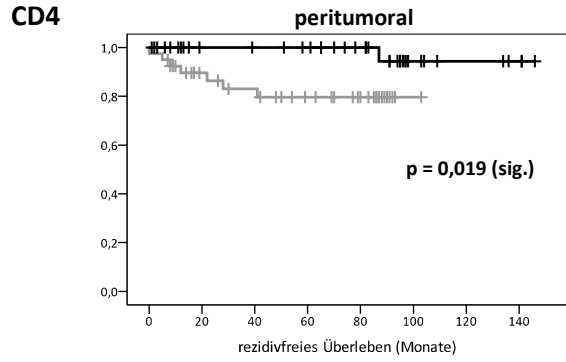
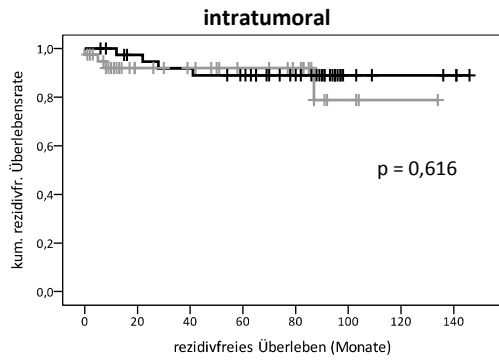
Tabelle 12

		5-Jahres-LR-Freiheitsrate	p-Wert ^(a)
CD4	intratumorale Infiltration		
	hoch	89,0 %	
	niedrig	92,0 %	0,616
	peritumorale Infiltration		
hoch	94,4 %		
niedrig	79,6 %	0,019 (sig.)	
CD8	intratumorale Infiltration		
	hoch	96,9 %	
	niedrig	82,2 %	0,095
	peritumorale Infiltration		
hoch	91,8 %		
niedrig	87,2 %	0,963	
CD25	intratumorale Infiltration		
	hoch	93,3 %	
	niedrig	85,9 %	0,367
	peritumorale Infiltration		
hoch	94,5 %		
niedrig	84,3 %	0,098	
CD57	intratumorale Infiltration		
	hoch	100 %	
	niedrig	79,0 %	0,003 (sig.)
	peritumorale Infiltration		
hoch	97,5 %		
niedrig	81,4 %	0,027 (sig.)	
FoxP3	intratumorale Infiltration		
	hoch	97,5 %	
	niedrig	77,8 %	0,030 (sig.)
	peritumorale Infiltration		
hoch	97,5 %		
niedrig	77,8 %	0,005 (sig.)	

^(a)Log-Rank-Test

Diagramm 8

Analyse des lokalrezidivfreien Überlebens



3.4.2 Univariate Analyse des Gesamtüberlebens

Ebenso wurden alle dichotomisierten Infiltrationsdichten als Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben analysiert (Kaplan-Meier-Überlebenskurven siehe Diagramm 9, S. 59).

Der Vergleich der Einflussfaktoren erfolgte im univariaten Log-Rank-Test. Hier ergab sich ein statistisch hochsignifikanter Überlebensvorteil für Patienten mit Karzinomen, die eine hohe Infiltrationsdichte FoxP3-positiver Zellen, sowohl intra- als auch peritumoral, oder eine hohe intratumorale CD4-Infiltration aufwiesen mit jeweils $p < 0,001$.

Weiterhin zeigte sich auch bei einer hohen peritumoralen CD4- und CD25-Infiltrationsdichte ein signifikant längeres Überleben mit $p = 0,036$ und $p = 0,044$ (weitere Kennzahlen und Ergebnisse siehe Tabelle 13, S. 58).

3.4.3 Multivariate Cox-Regression

Um den nachgewiesenen Einfluss der Infiltrationsdichten auf das Gesamtüberleben weiter zu untermauern und womöglich eine Rolle als unabhängiger prognostischer Faktor zu belegen, wurde eine multivariate Cox-Regression durchgeführt. Neben den Infiltrationsdichten aller untersuchten Marker wurde auch die T-Kategorie, der Lymphknotenstatus, synchrone Fernmetastasen und das Grading mit einbezogen. In Tabelle 13, S. 58 sind die Kennzahlen und p-Werte aller untersuchten Einflussfaktoren aufgeführt.

Als signifikante unabhängige Prognosefaktoren für ein längeres Gesamtüberleben bestätigten sich eine hohe intratumorale Infiltrationsdichte mit FoxP3- und CD4-positiven Zellen ($p = 0,001$; $p < 0,001$), eine hohe peritumorale Infiltrationsdichte mit CD8-positiven Zellen ($p = 0,026$) sowie ein negativer N- und M-Status ($p = 0,024$; $p = 0,013$).

Tabelle 13

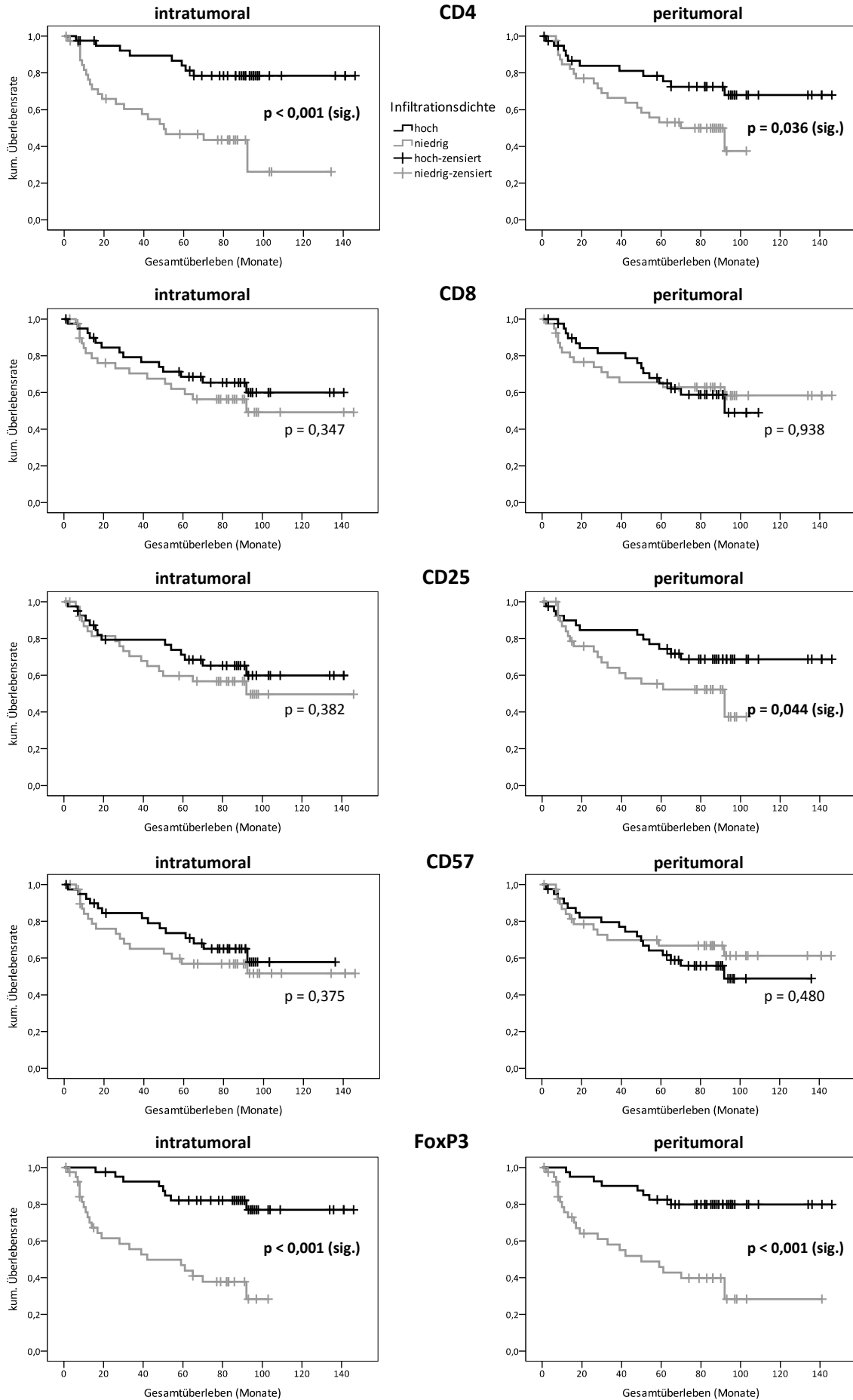
Analyse der Einflussfaktoren auf das Gesamtüberleben

		Mittleres Überleben (Monate)	5-Jahres- Überlebensrate	p-Wert univariat ^(a)	p-Wert multivariat ^(b)
CD4	intratumorale Infiltration				
	hoch	119,4	84,0 %	< 0,001 (sig.)	< 0,001 (sig.)
	niedrig	64,7	46,6 %		
	peritumorale Infiltration				
	hoch	107,9	78,3 %	0,036 (sig.)	0,891
	niedrig	64,6	53,1 %		
CD8	intratumorale Infiltration				
	hoch	100,3	68,5 %	0,347	0,460
	niedrig	87,7	61,9 %		
	peritumorale Infiltration				
	hoch	77,8	65,0 %	0,938	0,026 (sig.)
	niedrig	93,6	65,6 %		
CD25	intratumorale Infiltration				
	hoch	100,2	71,2 %	0,382	0,749
	niedrig	72,8	59,6 %		
	peritumorale Infiltration				
	hoch	107,8	74,4 %	0,044 (sig.)	0,743
	niedrig	63,7	55,4 %		
CD57	intratumorale Infiltration				
	hoch	97,6	73,6 %	0,375	0,061
	niedrig	87,7	56,8 %		
	peritumorale Infiltration				
	hoch	88,3	64,1 %	0,480	0,093
	niedrig	98,0	66,8 %		
FoxP3	intratumorale Infiltration				
	hoch	124,1	82,1 %	< 0,001 (sig.)	0,001 (sig.)
	niedrig	53,7	46,8 %		
	peritumorale Infiltration				
	hoch	124,2	82,5 %	< 0,001 (sig.)	0,805
	niedrig	65,8	45,8 %		
T-Status	(T1 / T2 / T3 / T4)				0,118
N-Status	(N0 / N1+2)				0,024 (sig.)
M-Status	(M0 / M1)				0,013 (sig.)
Grading	(low-grade / high-grade)				0,305

Statistische Verfahren: ^(a)Log-Rank-Test, ^(b)Cox-Regression

Diagramm 9

Analyse des Gesamtüberlebens



3.4.4 Anpassung des lokalen Signifikanzniveaus

Nach Erfassung aller durchgeführten statistischen Tests wurde für jeden eine Nullhypothese formuliert und die zugehörigen p-Werte der Größe nach geordnet (Tabelle 17, S. 97). Im Anschluss wurde die explorative Simes-Prozedur durchgeführt. Folgende Aussagen haben sich nach Anpassung des lokalen Signifikanzniveaus als hochsignifikant bestätigt:

Tabelle 14

Aussagen zum T-Status			
Aussage	durchgeführter Test	p-Wert	
Patienten im Stadium T1/2 haben eine höhere peritumorale Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen	Mann-Whitney U-Test	0,001	
Patienten im Stadium T1/2 haben eine höhere intratumorale Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen	Mann-Whitney U-Test	0,002	
Aussagen zur Fernmetastasierung			
Aussage	durchgeführter Test	p-Wert	
Patienten mit synchroner Metastasierung haben eine niedrigere intratumorale Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen	Mann-Whitney U-Test	0,006	
Das Risiko des Auftretens von synchroner Fernmetastasierung bei Patienten mit niedriger peritumorale Infiltration mit CD25-positiven Zellen ist höher	Exakter Fisher-Test	0,006	
Patienten mit synchroner oder metachroner Metastasierung haben eine niedrigere peritumorale Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen	Mann-Whitney U-Test	< 0,001	
Das Risiko des Auftretens von synchroner oder metachroner Fernmetastasierung bei Patienten mit niedriger peritumorale Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen ist höher	Exakter Fisher-Test	0,001	
Aussagen zu Lokalrezidiven			
Aussage	durchgeführter Test	p-Wert	
Patienten mit Lokalrezidiv haben eine niedrigere peritumorale Infiltration mit CD57-positiven Zellen	Mann-Whitney U-Test	0,003	
Patienten mit Lokalrezidiv haben eine niedrigere peritumorale Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen	Mann-Whitney U-Test	0,005	
Das Risiko des Auftretens von Lokalrezidiven bei Patienten mit niedriger intratumorale Infiltration mit CD57-positiven Zellen ist höher	Exakter Fisher-Test	0,005	

Aussagen zum rezidivfreien Überleben

Aussage	durchgeführter Test	p-Wert
Patienten mit hoher intratumoraler Infiltration an CD57-positiven Zellen haben ein längeres rezidivfreies Überleben	Log-Rank-Test	0,003
Patienten mit hoher peritumorale Infiltration an FoxP3-positiven Zellen haben ein längeres rezidivfreies Überleben	Log-Rank-Test	0,005

Aussagen zum Gesamtüberleben

Aussage	durchgeführter Test	p-Wert
Patienten mit hoher intratumoraler Infiltration an CD4-positiven Zellen haben ein längeres Gesamtüberleben	Log-Rank-Test	< 0,001
Patienten mit hoher intratumoraler Infiltration an FoxP3-positiven Zellen haben ein längeres Gesamtüberleben	Log-Rank-Test	< 0,001
Patienten mit hoher peritumorale Infiltration an FoxP3-positiven Zellen haben ein längeres Gesamtüberleben	Log-Rank-Test	< 0,001
Die intratumorale Infiltrationsdichte mit CD4-positiven Zellen ist ein unabhängiger Einflussfaktor auf das Gesamtüberleben	Cox-Regression	< 0,001
Die intratumorale Infiltrationsdichte mit FoxP3-positiven Zellen ist ein unabhängiger Einflussfaktor auf das Gesamtüberleben	Cox-Regression	0,001

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der peri- und intratumoralen Infiltrationsdichte mit FoxP3-positiven regulatorischen T-Zellen als prognostischer Faktor beim Rektumkarzinom untersucht. Hierbei zeigten sich von allen analysierten Färbungen hauptsächlich bei FoxP3, etwas seltener bei CD4, CD25, CD8 und CD57 signifikante Unterschiede in den ermittelten Infiltrationsdichten bei verschiedenen Ausprägungen von klinischen und pathologischen Parametern. Die drei erstgenannten Marker werden bekanntermaßen von den meisten Tregs exprimiert [133-137, 139-143], wobei sich FoxP3 als der spezifischste und zur Identifikation am besten geeignete herausgestellt hat [122-125]. In den immunhistochemischen Analysen vorausgegangener Untersuchungen wurden daher FoxP3-positiv gefärbte Zellen als Tregs angesehen, wenngleich hier kleine Einschränkungen hinsichtlich Sensitivität und Spezifität beachtet werden müssen (siehe Kapitel 1.8.2, S. 22). Aufgrund der angestrebten Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der erwähnten Studien wurde hier ebenso verfahren, das heißt Lymphozyten mit einer FoxP3-positiven Kernfärbung wurden als Tregs angesehen.

Es zeigte sich eine signifikante Assoziation hoher Treg-Infiltrationen mit niedriger Tumorkategorie, niedrigem Grading, Abwesenheit von synchronen und metachronen Fernmetastasen und Lokalrezidiven. Weiterhin ergab eine Überlebenszeitanalyse ein hochsignifikant längeres lokalrezidivfreies Überleben ($p = 0,005$) und Gesamtüberleben bei hoher Treg-Infiltrationsdichte ($p < 0,001$). Auch in der multivariaten Cox-Regression blieb dieser Einfluss erhalten ($p = 0,001$).

Zusammenfassend beinhalten diese Ergebnisse eine hohe Anzahl eindeutiger Aussagen mit hoher Signifikanz, die in der Zusammenschau eine schlüssige, konsequent aufeinander aufbauende Gesamtaussage ergeben. Diese steht jedoch im Widerspruch zu den meisten bisherigen Erkenntnissen zu dieser Thematik. Daher wird im Folgenden die bisherige – hypothetisch nachvollziehbare – Annahme, eine Suppression der Immunantwort gegen Malignome sei grundsätzlich kontraproduktiv,

unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse und im Vergleich mit anderen Studien analysiert und kritisch diskutiert.

4.1 Bisher bekannte Ergebnisse beim kolorektalen Karzinom

Da zum Zeitpunkt der Auswertung keine klinischen Studien zur Rolle von Tregs in Rektumkarzinomen bekannt waren, wurden die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse zu kolorektalen Karzinomen (CRCs) recherchiert und zusammengestellt (Tabelle 15, S. 64). Wie im Fall der meisten anderen Tumorentitäten wurde auch bei CRCs eine signifikant höhere Dichte von FoxP3-positiven Tregs im Tumorgewebe als in gesunder Mukosa nachgewiesen [237-239].

Allerdings wurden bei CRCs in einigen Untersuchungen, die eigenen Ergebnisse miteingeschlossen, signifikant höhere Treg-Infiltrationen in früheren Tumorstadien festgestellt, sowohl bei T1/2 Karzinomen gegenüber T3/4 [239, 240], als auch bei UICC II gegenüber UICC III [239] und UICC I / II gegenüber UICC III / IV [237]. Damit wurde eine höhere Treg-Infiltrationsdichte bei einer eindeutig günstigeren klinischen Prognose nachgewiesen.

Dieser Darstellung einer hohen Treg-Infiltration als vorteilhaften Marker steht eine anderweitig festgestellte Assoziation mit negativen Parametern gegenüber. So stellten Suzuki et al. eine signifikant höhere Treg-Infiltrationsdichte bei nodal positiven gegenüber negativen Karzinomen fest [236], was im Widerspruch zu der genannten Assoziation mit frühen UICC-Stadien steht. In einer weiteren Untersuchung konnten Ling et al. schließlich keinerlei Korrelation mit klinischen oder pathologischen Parametern nachweisen [238].

Ebenso wie die Ergebnisse zur Korrelation mit klinischen und pathologischen Parametern sind auch die Aussagen zur prognostischen Bedeutung von Tregs bei CRCs sehr heterogen. Die Resultate (siehe Tabelle 15, S. 64) reichen von signifikant längerem tumorfreien und Gesamtüberleben bei erhöhtem CD8 / FoxP3-Quotient und damit einer indirekten Einordnung der Tregs als prognostisch ungünstigen Marker [236], über keine prognostische Aussagekraft [237, 238] bis zu einem signifikant positiven Effekt von intratumoralen Tregs auf das Gesamtüberleben [239-241].

Tabelle 15

Bisherige Ergebnisse zu Tregs (definiert als FoxP3-positive Lymphozyten) in CRCs

Autoren	Patientenkollektiv	signifikante Aussagen
Loddenkemper et al. [237]	40 Patienten, UICC I-IV	· höhere Treg-Infiltration bei UICC I / II als bei III / IV
Suzuki et al. [236]	95 Patienten, UICC I-III	· hohe Treg-Infiltration ist mit positivem N-Status assoziiert · hoher CD8 / FoxP3-Quotient korreliert mit längerem rezidivfreien- und Gesamtüberleben
Ling et al. [238]	100 Patienten, UICC I-IV	· höhere Treg-Dichte im Tumorgewebe verglichen mit gesunder Mukosa
Salama et al. [239]	967 Patienten, UICC II und III	· hohe Treg-Infiltration korreliert mit längerem Gesamtüberleben, niedrigerem T- und UICC -Status
Frey et al. [240]	1420 Patienten, UICC I-IV*	· hohe Treg-Infiltration korreliert mit niedrigerem T-Status* und längerem Gesamtüberleben*
Correale et al. [241]	57 Patienten, UICC IV	· hohe Treg-Infiltration korreliert mit längerem rezidivfreien- und Gesamtüberleben

* Getrennt nach Mikrosatelliteninstabilität, die Aussage zum Gesamtüberleben gilt für beide Gruppen, die Korrelation mit dem T-Status nur für Karzinome ohne MSI

Correale et al. [241] begründeten die gute Prognose bei einer hohen Treg-Infiltrationsdichte unter anderem mit deren Funktion als Schutzmechanismus vor Autoimmunität und einer überschießenden Entzündungsreaktion, wobei diese Studie jedoch nur Patienten im Stadium UICC IV umfasste. Demgegenüber begründeten Suzuki et al. [236], die eine hohe Treg-Infiltration als einen negativen prognostischen Marker identifizierten, ihre Ergebnisse mit der immunsuppressiven Funktion der Tregs. Diese Gegenüberstellung macht bereits deutlich, dass eine gleiche Funktion als Erklärung für gegensätzliche Ergebnisse dienen kann. Daher soll im Folgenden erörtert werden, welche Gründe für die Unterschiede der einzelnen Studienergebnisse in Frage kommen und warum gerade beim CRC eine Hemmung der Immunantwort unter Umständen zu einer Prognoseverbesserung führen kann.

Als mögliche Gründe für die Heterogenität der verschiedenen Studienergebnisse ist, unabhängig von den jeweiligen Hypothesen und dem Studiendesign, zu erkennen,

dass sich jeweils die Fallzahlen, Einschlusskriterien und damit die Patientenkollektive der einzelnen Studien deutlich unterscheiden, was somit eine Vergleichbarkeit erschweren oder teilweise unmöglich machen kann.

4.2 Vergleichbarkeit der einzelnen Studien

Definition und Quantifizierung der Tregs

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, gibt es unterschiedliche Methoden, Tregs zu definieren. Obwohl sich FoxP3 als derzeit gebräuchlichster immunhistochemischer Marker mittlerweile durchgesetzt hat [124, 125], wird, vor allem in älteren Studien, noch der CD4⁺CD25⁺-Phänotyp als Tregs definiert [128, 133, 157, 164, 202, 209, 231]. Da diese Zuordnung aufgrund der ungenügenden Spezifität nur eingeschränkt gilt [122, 130-132], ist eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse unterschiedlicher Untersuchungen zu Tregs nicht immer gegeben.

Die aufgeführten Studien zum kolorektalen Karzinom, ebenso wie die eigenen Ergebnisse, sind jedoch zumindest in der Definition von Tregs als FoxP3-positive Lymphozyten vergleichbar [236-241]. Die Quantifizierung der Treg-Infiltration erfolgte entweder durch manuelles Auszählen von gefärbten Zellen pro Gesichtsfeld [236-238, 240] oder durch Evaluation mit Bildanalysesoftware [239]. Somit ist auch hier eine weitgehende Vergleichbarkeit gegeben. Unterschiede bestehen jedoch in der Anzahl der analysierten Gesichtsfelder (1 [240], 4 [238], 5 [241], 10 [236, 237]) und deren Auswahl (höchste Dichte [236] oder zufällig [237, 238, 240, 241]).

Patientenkollektive

Hinsichtlich der Anzahl und Auswahl der Patienten unterscheiden sich die einzelnen Studien erheblich. So waren nur in drei Patientenkollektiven alle vier UICC-Stadien vertreten [237, 238, 240]. Die restlichen Studien beschränkten sich auf drei [236], zwei [239], oder nur ein UICC-Stadium [241]. Dadurch ist die Vergleichbarkeit der einzelnen Studienergebnisse eingeschränkt, da es naheliegend ist, dass Ergebnisse von Patienten im Stadium UICC IV nicht ohne weiteres mit denen im Stadium I-III verglichen werden können.

Weiterhin unterschieden alle diese Studien nicht zwischen Rektum- und Kolonkarzinomen, deren Unterschiede bereits besprochen wurden (Unterschiedliches lymphogenes Metastasierungsverhalten und höherer Anteil an lymphknotenpositiven Karzinomen [13], höhere Lokalrezidivrate [14, 15], insgesamt schlechtere Prognose bei Rektumkarzinomen [16]).

4.3 Interpretation und Gegenüberstellung der eigenen Ergebnisse

Unabhängig von den verschiedenen Studiendesigns stellt sich die Frage, wie eine hohe Treg-Infiltrationsdichte, im Gegensatz zu den meisten anderen Tumorentitäten, beim Rektumkarzinom dennoch zu einer Prognoseverbesserung führen kann. Ansätze hierzu bietet eine differenzierte Betrachtung der peritumoralen Immunreaktion und der daran beteiligten Akteure.

Die lokale Entzündungsreaktion

Die lokale Entzündung als Zeichen der Immunabwehr gegen das kolorektale oder Rektumkarzinom wurde bereits mehrfach analysiert [93, 106, 107, 109]. Für Rektumkarzinome ergab sich bei unspezifischer Betrachtung der Immunreaktion eine Korrelation zwischen hohen Zahlen an infiltrierenden Immunzellen, längerem Überleben, niedrigerer Rezidivrate und weniger Fernmetastasierung [93]. Pagès et al. belegten, dass bei CRCs eine verbesserte Prognose aus einer hohen Infiltrationsdichte mit Effektor-T-Zellen resultierte [106]. Weiterhin zeigten sie, dass bei kombinierter Analyse der Dichte von CD3-positiven T-Effektor- und CD45RO-positiven T-Gedächtniszellen jeweils eine hohe Infiltration durch beide Zelltypen als ein günstiger Faktor anzusehen ist und eine bessere prognostische Aussagekraft hat als die konventionelle TNM-Klassifikation [107, 109]. Damit wurde bereits schon das prognostische Potential einer Auswertung der Immunreaktion des Organismus gegen das Karzinom eindrücklich demonstriert, bisher aber noch nicht in die klinische Routine übernommen. Ebenso zeigten unsere Ergebnisse eine deutliche prognostische Aussagekraft, die im Folgenden interpretiert und kritisch hinterfragt werden soll.

Die Rolle der Tregs in der lokalen Immunabwehr

Da die physiologische Funktion der Tregs unter anderem die Eindämmung überschießender Immunreaktionen ist [146-149], akkumulieren sie im Bereich einer lokalen Entzündungsreaktion [245, 246]. Da diese Hemmung in einem ausgeglichenen Immunsystem ein physiologischer Vorgang ist kann eine erhöhte Zahl an tumorinfiltrierenden Tregs daher als indirekter Marker für eine ausgeprägte lokale Immunreaktion und damit als prognostisch vorteilhaft angesehen werden [241, 245]. Diese Erklärung steht jedoch im Widerspruch zu den Untersuchungsergebnissen der meisten anderen Malignome, bei denen sich eine hohe Treg-Infiltrationsdichte als prognostisch negativ herausgestellt hat [115, 221-231]. Denn gerade im Fall einer Immunabwehr gegen Malignome kann die immunsuppressive Aktivität der Tregs überhand nehmen und zu einer immunologischen Toleranz gegen den Tumor führen [119, 161-164, 178, 184, 206, 206-209]. Außerdem wurde mehrfach nachgewiesen, dass Tumorzellen in der Lage sind, Tregs für diesem Zweck zu rekrutieren [115-117, 204]. Die Konsequenz dieser Funktion ist eine Hemmung der Immunabwehr gegen das Karzinom und damit die Interpretation einer erhöhten Treg-Dichte als offensichtlich prognostisch negativ. Daher sollte analysiert werden, was das Rektumkarzinom oder das CRC von diesen anderen Tumoren unterscheidet.

Im Gastrointestinaltrakt ist es bekannt, dass eine chronische Entzündung sowohl die Karzinogenese fördern als auch die Tumorprogression beeinflussen kann, unter anderem auch bei kolorektalen Karzinomen [248-256]. So wurde auch ein protektiver Effekt einer langjährigen Einnahme von ASS oder anderen Antiphlogistika auf die Entstehung von CRCs nachgewiesen [257, 258].

Daher ist es denkbar, dass Tregs durch ihre antiinflammatorische Wirkung möglicherweise einer Tumorprogression entgegenwirken [240, 259, 260]. Passend dazu wurde bei einem Mausmodell, dessen Tregs durch IL-10-Knockout in ihrer immunsuppressiven Funktion deutlich eingeschränkt waren, demonstriert, dass frühe invasive CRCs durch Transfer von uneingeschränkt funktionstüchtigen Wildtyp-Tregs vollständig reversibel waren [261].

Th17-Transformation durch chronische Inflammation

Die dichtere Treg-Infiltration in früheren gegenüber fortgeschrittenen Karzinomen könnte unter anderem auch durch die bereits beschriebene Th17-Transformation (siehe Kapitel 1.8.5, S. 26) erklärt werden. Die chronische Inflammation um Karzinome begünstigt sowohl die Induktion von Th17-Zellen aus naiven CD4-positiven Ths, als auch die Th17-Transformation von Tregs [188, 194-198]. Dies könnte eine Reduktion der Treg-Dichte über die Zeit des Bestehens des Karzinoms bewirken und damit eine geringere Anzahl an Tregs in fortgeschritteneren Karzinomen [247], wie von Loddenkemper et al. [237], Salama et al. [239] und Frey et al. [240] beschrieben sowie auch in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Damit wäre auch eine positive Rückkopplung der Tumorprogression in fortgeschrittenen Karzinomen möglich: Durch den Verlust der Tregs nimmt die Entzündungsaktivität zu, was zu einer weiteren Stimulation des Tumorwachstums führt [240, 259, 260].

Die Lokalisation im Gastrointestinaltrakt

Da sich außer beim kolorektalen Karzinom auch bei anderen Karzinomen des Gastrointestinaltrakts, bei Ösophagus- [232], Anal- [244] und Kardiakarzinomen [233] tumorinfiltrierende Tregs im Gegensatz zu den erwarteten Effekten als positive Prognosemarker herausgestellt haben, scheint diese Lokalisation einen Einfluss auf die Funktion der Tregs im Gesamtkontext aus Tumor und Immunreaktion zu haben. Der Gastrointestinaltrakt zeichnet sich unter anderem durch drei Besonderheiten aus:

- hoher Zell-Turnover des Epithels [262, 263]
- hohe lymphatische Dichte [269, 270]
- Besiedelung mit spezifischen (immunmodulierenden) Darmbakterien [265-268]

Dadurch entsteht ein äußerst sensibles immunologisches Gleichgewicht des enterischen Immunsystems, an dessen Etablierung und Aufrechterhaltung die Tregs maßgeblich beteiligt sind [157, 158, 264].

Die wichtige Rolle des Darmimmunsystems in der Entstehung von Pathologien wie chronisch entzündlichen Darmkrankheiten (CEDs) und Karzinomen wurde schon

mehrfach belegt [248-256, 265-268]. Der Darm als Organ, das sehr reich mit lymphatischem Gewebe durchsetzt ist, nimmt damit eine Sonderstellung innerhalb des Organismus ein und wird oft in seiner Gesamtheit als lymphatisches Organ angesehen [269, 270]. Das steht im Einklang mit der Tatsache, dass eine erhöhte Infiltration durch Tregs auch bei verschiedenen Lymphomen als prognostisch guter Marker erkannt wurde [234, 235].

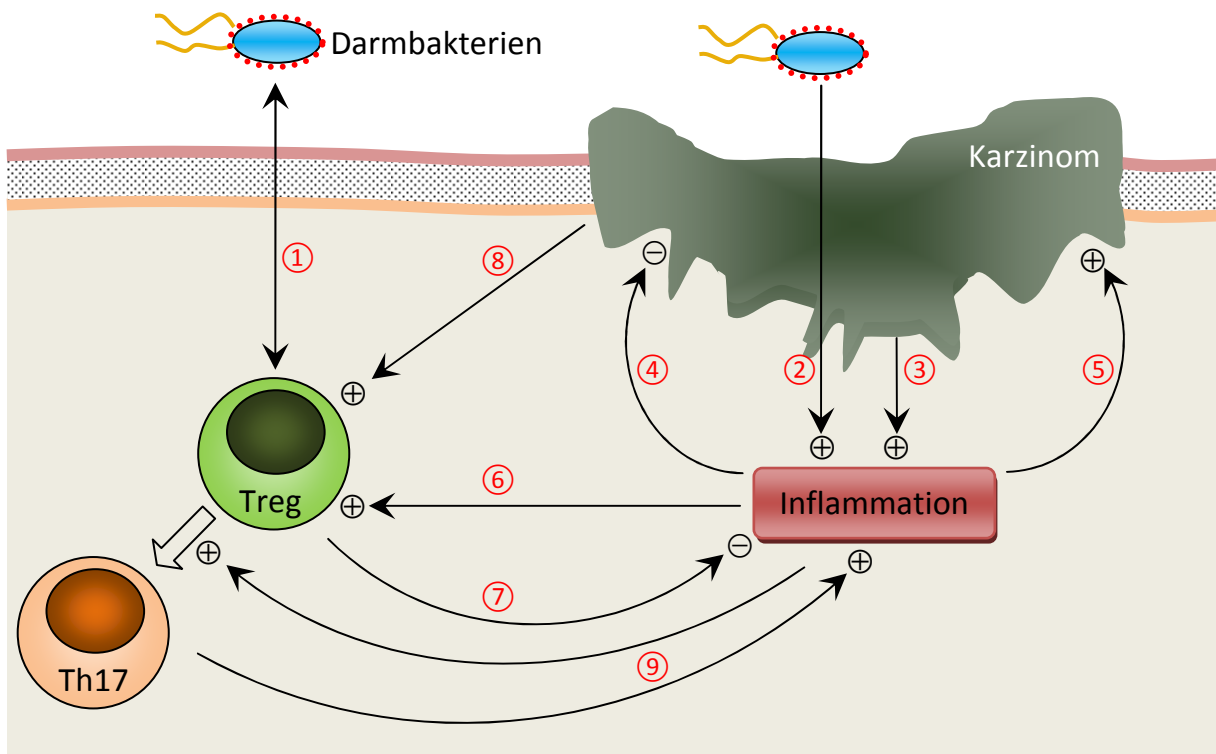
Eine weitere Besonderheit des enterischen Immunsystems ist die physiologische Toleranz gegenüber einer symbiontischen Besiedelung durch Darmbakterien. Ergebnisse von Tierversuchen legen nahe, dass Darmbakterien durch lokale Interaktion mit Tregs maßgeblich an der Etablierung der antiinflammatorischen Komponente der immunologischen Homöostase beteiligt sind [157, 158, 271] und dadurch vor chronisch entzündlichen Darmkrankheiten schützen können [265-268]. Weiterhin wurde gezeigt, dass Tregs von Mäusen, die Kontakt mit Darmbakterien hatten, effektiver vor einer Immunimbalance schützen können als naive Tregs, die aus sterilen Tieren gewonnen worden waren [247]. Dadurch könnten durch Darmbakterien geprägte Tregs möglicherweise einer inflammatorisch bedingten Karzinogenese oder Tumorprogression entgegenwirken [240, 247, 251-256, 259, 260].

Bei Tumoren der Haut, als weitere mit spezifischen Bakterien besiedelte Grenzfläche des menschlichen Körpers, die jedoch gegenüber dem GI nicht als lymphatisches Organ bezeichnet werden kann, lassen die bisherigen Untersuchungen zur Rolle von Tregs keine Ergebnisse in dieselbe Richtung erkennen. Für Melanome ergab sich ein signifikant kürzeres Gesamtüberleben bei hoher Treg-Infiltration [229, 230]. Außerdem wurde eine Zunahme der Anzahl tumorinfiltrierender Tregs während der Progression von kutanen Plattenepithelkarzinomen beschrieben [272]. Bei Basaliomen wurde lediglich eine erhöhte Treg-Dichte im Vergleich zu gesundem Gewebe gezeigt, Analysen zu prognostischen Aussagen existieren noch nicht [273]. Damit kommt der Eigenschaft des Darmes, eine unsterile Grenzfläche zu sein, eine untergeordnete Bedeutung zur Erklärung der gewonnenen Erkenntnisse zu. Wesentlich sinnvoller erscheint die Betrachtung des Wechselspiels zwischen dem enterischen Immunsystem, dem Tumor und spezifischen Darmbakterien.

Zusammenfassend ist damit die letztendliche Bedeutung der Tregs als immunsuppressive Komponente im Gesamtkontext der Wechselwirkungen zwischen lokaler Entzündungsreaktion und Tumor noch nicht einwandfrei geklärt. Die vielen möglichen Variablen (Tumordifferenzierung, -immunogenität, hochselektive antigenpräsentierende Bakterien, Immunkompetenz, Therapieeffekte) in diesem auch *tumor microenvironment* genannten System [115, 117, 200, 203, 205, 206, 211, 234, 235, 245, 251, 255, 273] können für die heterogenen und teilweise auch widersprüchlichen Ergebnisse in Bezug auf die letztlich klinisch relevanten Folgen der Treg-Funktionen verantwortlich sein (Zusammenfassung siehe Abbildung 7, S. 71).

Abbildung 7

Schema der diskutierten lokalen Wechselwirkungen zwischen Tregs, Tumor, Entzündungsreaktion und Darmbakterien



- ① Darmbakterien induzieren Immuntoleranz durch Tregs [157, 158, 268]
- ② Erhöhte Bakterientranslokation durch das Karzinom induziert eine Entzündungsreaktion [238, 274]
- ③ Das Karzinom induziert eine Entzündungsreaktion [93, 106, 107, 109]
- ④ Es erfolgt eine zelluläre Immunreaktion gegen das Karzinom durch CTLs und NKs [98-101]
- ⑤ Gleichzeitig regen proinflammatorische Zytokine wie IL-6 und TNF- α das Karzinom zum Wachstum an [251, 259, 275]
- ⑥ Die Immunreaktion aktiviert Tregs im Sinne einer negativen Rückkopplung [146-148]
- ⑦ Tregs hemmen die Immunreaktion, dabei kommen verschiedene Mechanismen zum Einsatz (siehe Abbildung 1, S. 26). Dies ist sowohl eine physiologische Funktion [151, 159, 160], als auch Bestandteil der pathologischen Tumortoleranz [119, 161-163, 178, 206]
- ⑧ Das Karzinom rekrutiert und induziert Tregs [115-117, 204, 205]
- ⑨ Im Milieu einer chronischen Entzündung können Tregs zu proinflammatorischen Th17-Zellen konvertieren [188, 194-198]

Tregs als Marker für inaktive systemische Immunantwort

Die Ergebnisse unserer Studie und die einiger anderer Untersucher [239, 240] weisen eine signifikant höhere Treg-Dichte bei T1/2 Karzinomen gegenüber T3/4 auf. Auch bei UICC II gegenüber UICC III [239] und UICC I / II gegenüber UICC III / IV [237] wurden höhere Infiltrationen nachgewiesen. Diese Beobachtung ist allein mit einem lokalen Entzündungsgeschehen nicht ausreichend erklärbar, der Tumor im fortgeschrittenen und möglicherweise auch metastasierten Stadium muss im Gesamtkontext als Systemerkrankung gesehen werden. Dabei wird eine systemische Immunreaktion gegen tumoreigene Antigene etabliert, die bei frühen, lokal begrenzten Tumorstadien (*limited disease*) meistens fehlt [276, 277].

Loddenkemper et al. [237], die eine signifikant höhere Treg-Infiltration bei UICC I / II, also *limited disease*, nachwiesen, analysierten einen Zusammenhang zwischen lokaler Treg-Infiltrationsdichte und systemischer T-Zellantwort. Dabei untersuchten sie per ELISPOT, ob reaktive T-Zellen gegen bereits vorbeschriebene CRC-assoziierte Antigene [277, 278] im peripheren Blut vorhanden waren. Patienten ohne systemische T-Zellantwort wiesen zwar eine höhere Treg-Infiltration im Tumor auf, der Unterschied erreichte jedoch mit $p = 0,16$ nicht das Signifikanzniveau [237]. Auch Salama et al. konnten keinen signifikanten Zusammenhang belegen [239].

Dennoch kann eine hohe Treg-Infiltration im frühen Tumorstadium möglicherweise als Zeichen eines noch erfolgreichen *tumor escape* - Mechanismus angesehen werden, welcher durch die besondere, auf Toleranz ausgelegte, immunologische Situation im Darm [157, 158, 264, 279] noch begünstigt werden könnte.

Diese Tarnung kann mit fortschreitender Invasion und Einbruch in Lymph- oder Blutgefäße nicht mehr aufrecht erhalten werden, da eine nun initiierte systemische T-Zellreaktion auch lokal im Tumorbereich durch proinflammatorische Th1-Zytokine wie IFN- γ die periphere Induktion von Tregs hemmen kann [280].

4.4 Synopsis

Die vorangegangenen Interpretationen und Erklärungsansätze lassen sich grob in allgemeine und organspezifische Theorien einteilen.

Zu den allgemeinen Ansätzen gehört die Interpretation einer hohen Treg-Dichte als Zeichen einer aktiven lokalen und einer inaktiven systemischen Immunreaktion [146-149, 237, 241, 245, 245, 246, 276-278] und die Erklärung einer niedrigeren Treg-Infiltration in fortgeschritteneren Karzinomen durch die Th17-Transformation als Konsequenz einer chronischen Inflammation [188, 194-198, 247].

Diese Theorien können jedoch letztlich keine zufriedenstellende Erklärung dafür liefern, warum die Untersuchungen zur Bedeutung der Tregs bei fast allen anderen Malignomen zu gegenteiligen Ergebnissen kommen [115, 221-231].

Die organspezifischen Erklärungsansätze beziehen die entzündliche Genese vieler Malignome des Gastrointestinaltrakts mit ein [248-256], die auch bei dem nicht CED-assoziierten Karzinom eine Rolle spielt [247], sowie die lokalen Gegebenheiten wie die intestinale immunologische Situation und spezifische Darmbakterien als Umgebungsfaktor. Diese können entweder durch Translokation infolge gestörter Barrierefunktion im Karzinombereich zu einer erhöhten Treg-Infiltrationsdichte führen [238, 274], oder auch im Zusammenspiel mit Tregs als wichtige Akteure in der Etablierung der antientzündlichen Komponente der Immunhomöostase [157, 158, 271] daran beteiligt sein, eine chronische Entzündungssituation als Grund für Tumorgenese und -progression zu verhindern [240, 247, 251-256, 259, 260].

Eine kombinierte Betrachtung der verschiedenen allgemeinen und organspezifischen, lokalen und systemischen Mechanismen und Wechselwirkungen ergibt ein komplexes, noch nicht völlig verstandenes Gesamtbild der Bedeutung von Inflammation und deren Eindämmung durch Tregs im Zusammenhang mit Malignomen allgemein und Rektumkarzinomen im Speziellen. Ein wichtiger Ansatzpunkt ist sicher die Tatsache, dass die Entzündungshemmung durch Tregs eine Karzinomprogression unterdrücken kann. Hier wären weitergehende Forschungen nötig, um zu klären, ob dabei ein Unterschied zwischen Karzinompatienten mit und ohne CED besteht. Weiterhin ist die Eigenschaft des Darmes als lymphatisches Organ von Bedeutung, da Treg auch in Lymphomen mit einer besseren Prognose einhergehen. Der Grund hierfür ist jedoch noch zu klären.

4.5 Kritische Betrachtung der Ergebnisse

Unsere Ergebnisse zeigen bei FoxP3-positive Tregs eine deutliche Assoziation mit günstigen klinisch-pathologischen Markern, ein signifikant längeres Überleben und sie stellen einen unabhängigen prognostischen Marker dar.

Als Einschränkung hinsichtlich der Aussagekraft dieser Ergebnisse ist das retrospektive, explorativ ausgelegte Studiendesign der vorliegenden Arbeit zu sehen. Dennoch weisen die genannten Ergebnisse als Resultat einer explorativen Studie eine deutliche Signifikanz und damit Aussagekraft auf, und sind daher als Basis für darauf aufbauende prospektive Studien mit größerer Fallzahl zu verstehen.

4.6 Mögliche Anwendungsbereiche

In weiterführenden Studien mit entsprechend hoher statistischer Power ist eine weitere Bestätigung und Untermauerung der bisherigen Ergebnisse zu erwarten. Hiernach könnte die Analyse der Treg-Infiltrationsdichte möglicherweise das Potential haben, in der Kombination mit anderen Markern ein System zur Prognose- und Risikostratifizierung zu bilden.

Als Beispiel einer überragenden Optimierung der Therapie durch prognoseorientierte Therapieanpassung sei an dieser Stelle noch einmal das bereits beschriebene System der high-risk / low-risk-Differenzierung erwähnt, das es möglich macht, die Patienten hinsichtlich des Risikos für vorhandene Lymphknotenmetastasen und damit auch für zu erwartende Lokalrezidive optimal zu selektionieren und der jeweils angemessenen Therapieoption zuzuführen [17, 24, 65].

Eine Analyse der Immunreaktion mit CD3-positiven T-Effektor- und CD45RO-positiven T-Gedächtniszellen als prognostischer Marker für CRCs wurde bereits 2006 von Galon und Pagés vorgeschlagen [107]. Weiterentwickelt zu einem prognostischen Immun-Scoring-System der Infiltration mit CTLs und T-Gedächtniszellen, wurde bei UICC I / II CRCs eine signifikante Korrelation mit dem Risiko eines Lokalrezidivs demonstriert [109, 281]. Eine zusätzliche Evaluation der Treg-Infiltrationsdichte könnte eine Ergänzung darstellen, die weitere Hinweise auf Prognose und somit Therapieentscheidungen liefern kann.

Es sind mehrere mögliche Fälle denkbar, in denen sich der behandelnde Arzt mehr Informationen bezüglich einer zu erwartenden Prognose wünschen könnte:

4.6.1 Verbesserung der Patientenselektion zur TEM

Die TEM setzt eine bestmögliche Kenntnis des Lymphknotenstatus voraus, um als schonendes Operationsverfahren eingesetzt werden zu können [17]. Nur dann können bei T1-Karzinomen Lokalrezidivraten von rund 5 % erreicht werden [17, 69, 71]. Da befallene Lymphknoten mit den aktuellen bildgebenden Verfahren nicht immer zuverlässig entdeckt werden können [17, 26, 28, 31, 32], ist die richtige Indikationsstellung auf Markersysteme wie die high-risk / low-risk-Differenzierung angewiesen [17, 24, 65].

Möglicherweise wäre durch deren Ergänzung mit Immunreaktions-basierten Kriterien eine weitere Optimierung der Indikationsstellung und damit des Outcomes zu erreichen.

4.6.2 Ausweitung der TEM nach nRCT auf fortgeschrittenere Karzinome

Bei alleiniger Durchführung der TEM bei T2/3-Karzinomen hat sich eine nicht akzeptable Lokalrezidivrate von 20 - 50 % gezeigt [75]. Diese konnte in ersten Studien mit hoch selektioniertem Patientengut nach nRCT auf 7 - 9 % gesenkt werden [76, 77].

Hier würde ein prognostisches Markersystem helfen, unter den Patienten mit fortgeschrittenen Karzinomen diejenigen herauszufinden, welche für diese Therapieoption in Frage kämen, das heißt fortgeschrittenere Karzinome mit niedrigem Risiko für Lymphknotenbefall und Lokalrezidive. Diesen Patienten könnte damit eine radikale Operation und die damit verbundenen Nebenwirkungen [17, 46-51] erspart werden.

4.6.3 Optimierung der Indikationsstellung zur neoadjuvanten Therapie und anderen individuellen Therapieformen.

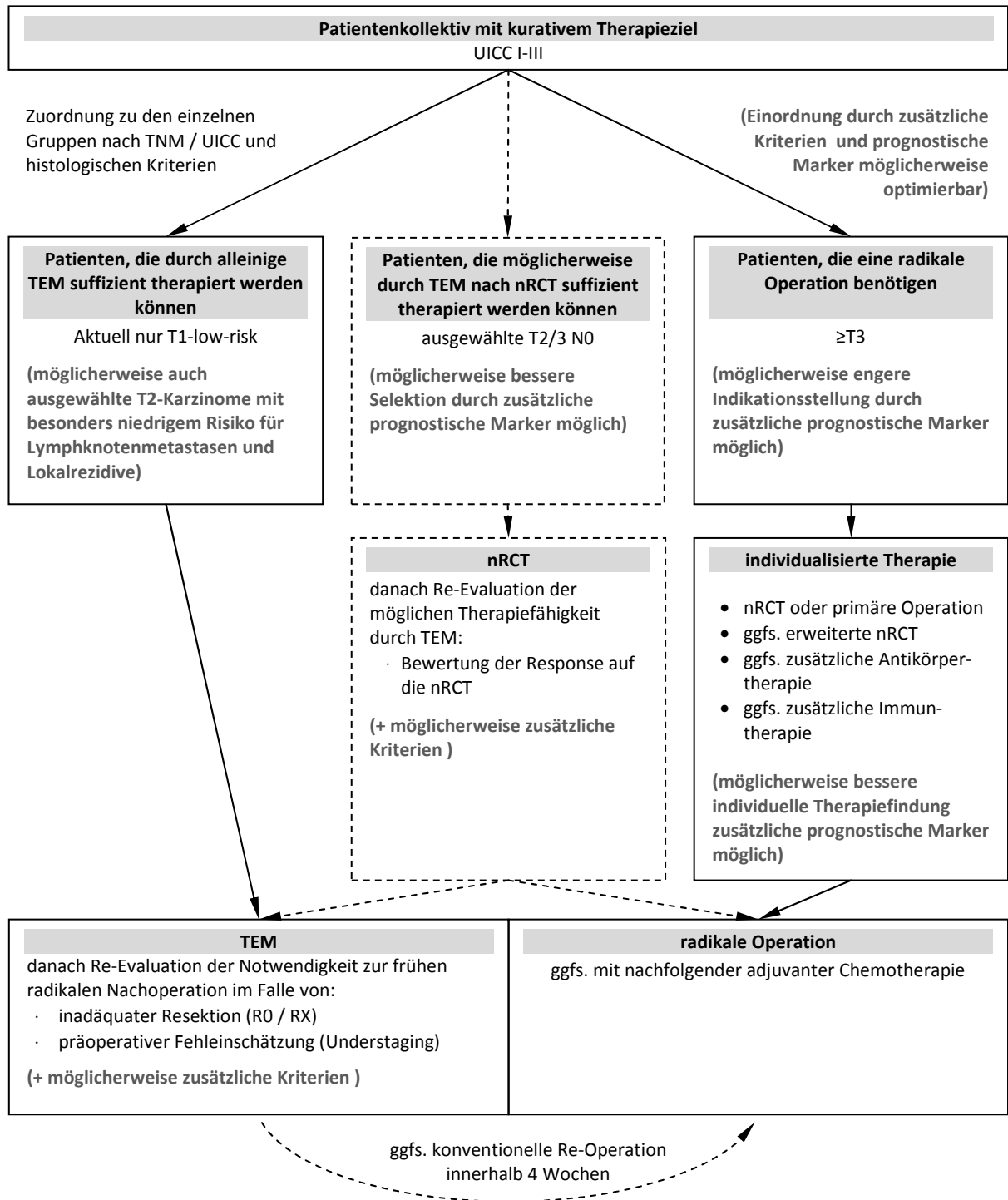
Bei Patienten, die nicht für eine TEM in Frage kommen, ist im UICC-Stadium II und III leitliniengerecht eine nRCT vorgesehen, die nach radikaler Operation (TME) das Risiko eines Lokalrezidivs senkt [18]. Bei UICC II - Karzinomen wurde eine Senkung der 2-Jahres-Lokalrezidivrate von 5,7 % auf 1,0 %, bei UICC III von 15,0 % auf 4,3 % [57]

beschrieben. Das entspricht jeweils auf 2 Jahre gesehen einer *number needed to treat* von 21,3 und 9,3. Angesichts der belastenden Nebenwirkungen der nRCT [62-64] könnte hier besonders bei UICC II - Karzinomen eine bessere Selektion der Patienten nach Lokalrezidiv-Risiko zu einer Therapieoptimierung in Form einer enger gefassten Indikationsstellung zur nRCT beitragen.

Weiterhin könnte möglicherweise ein erweitertes Markersystem helfen, diejenigen Patienten zu identifizieren, die von neueren Therapieformen wie Antikörpertherapie, Antiangiogenesetherapie oder medikamentöser Blockierung der intrazellulären Signalkaskaden profitieren könnten.

Letztendlich könnte mit allen diesen möglichen Anwendungsbereichen ein optimierter Behandlungsalgorithmus entwickelt werden, der alle potentiell kurativ therapierbaren Rektumkarzinome miteinschließt und dem jeweils individuell passenden Therapiefad zuweist (siehe Diagramm 10, S. 77).

Diagramm 10



Derzeitiger Stellenwert der TEM im Gesamttherapiekonzept des Rektumkarzinoms (der gestrichelte Weg ist keine leitliniengerechte Therapie und Gegenstand von Studien [17, 76, 77]).

Die möglichen Ansatzpunkte für eine Optimierung durch ein auf der Immunreaktion basierendes Markersystem zur Risikostratifizierung und besseren Beurteilung der Prognose sind hervorgehoben.

4.6.4 Tregs als therapeutisches Ziel beim Rektumkarzinom

Im Gegensatz zu den meisten Tumoren haben sich beim Rektumkarzinom hohe Zahlen an tumorinfiltrierenden Tregs als prognostisch günstig herausgestellt. Von einer Treg-depletierenden [207, 209, 212] oder -reduzierenden [214, 215] Immuntherapie ist daher nach jetzigem Kenntnisstand Abstand zu nehmen.

Da mit einer medikamentösen antiphlogistischen Therapie bereits Erfolge in der Prävention von CRCs nachgewiesen wurden [257, 258], wäre weitere Forschung in diese Richtung, auch als mögliche Therapieergänzung wünschenswert.

4.7 Abschließende Bemerkungen, Fazit

Die Entwicklung der TME mit der Kombination einer neoadjuvanten Radiochemotherapie hat zu einer deutlichen Verbesserung der Therapie des Rektumkarzinoms geführt [43, 44, 57-61]. Es stellt sich jedoch die Frage, ob angesichts der Nebenwirkungen und Spätfolgen tatsächlich jeder Patient die Maximaltherapie benötigt [17, 46-51, 62-64]. Hier hat sich für ein bestimmtes Patientengut mit der TEM eine Alternative zur radikalen Operation herausgestellt, wobei die Selektion dieser Patienten nur durch die Entwicklung der high-risk / low-risk-Differenzierung ermöglicht wurde [17, 24, 26, 28, 31, 32, 65, 69, 71]. Es gibt jedoch auch außerhalb dieser Indikation Patienten, denen möglicherweise diese weniger invasive Operationsmethode als Therapie ausreichen würde, sei es mit neoadjuvanter Therapie oder ohne [76, 77].

Weiterhin sind zusätzliche Kriterien nötig, um bei Patienten, die keiner lokalen Therapie zugeführt werden können, die Indikation zur nRCT individueller zu stellen, damit diese nur dann durchgeführt wird, wenn auch ein Nutzen für den Patienten zu erwarten ist.

Hier liegt das Potential für zusätzliche prognostische Marker, die auf einer Analyse der immunologischen Situation basieren. Die Arbeiten von Galon und Pagés zur prognostischen Aussagekraft der T-Zelleninfiltration [107, 109, 281] haben bereits eindrücklich deren Potential belegt. Auch die Ergebnisse unserer Arbeit zeigen eine vielversprechende prognostische Aussagekraft der Infiltrationsdichte mit regulatorischen T-Zellen, die signifikant mit günstigen klinischen und pathologischen

Parametern einhergeht sowie sich als ein unabhängiger positiver Einflussfaktor auf das Gesamtüberleben herausgestellt hat.

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, sind jedoch weitere Untersuchungen in Form prospektiver klinischer Studien mit histologischen Analysen an einer großer Fallzahl von Patienten nötig.

5. Literaturverzeichnis

1. Ferlay J; Shin HR; Bray F; Forman D; Mathers C; Parkin DM. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10: International Agency for Research on Cancer; 2010 [zitiert am 15.12.2010]. URL: <http://globocan.iarc.fr>.
2. Husmann G. Krebs in Deutschland 2005/2006: Häufigkeiten und Trends ; eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 7. Ausg. Berlin, Saarbrücken: Robert Koch-Inst; GEKID; 2010. (Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes).
3. Bertz J. Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland: Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010 ; eine Veröffentlichung des Zentrums für Krebsregisterdaten am RKI. Berlin: Robert-Koch-Inst; 2010. (Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes).
4. Fielding LP, Arsenault PA, Chapuis PH, Dent O, Gathright B, Hardcastle JD et al. Clinicopathological staging for colorectal cancer: an International Documentation System (IDS) and an International Comprehensive Anatomical Terminology (ICAT). *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1991; 6(4):325–44.
5. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. 7th ed. Chichester, West Sussex, UK, Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2010. URL: <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0917/2009029889-d.html>.
6. Bokelmann D, Drüner HU, Schulz U. Klinik und Prognose der Kolon- und Rektum-Karzinome. *Dtsch med Wochenschr* 1972; 97(42):1590–4.
7. Maglinte DD, Keller KJ, Miller RE, Chernish SM. Colon and rectal carcinoma: spatial distribution and detection. *Radiology* 1983; 147(3):669–72.
8. Kreis ME, Siebeck M, Adam M, Gross M, Tympner C, Zimmermann F et al. Rektumkarzinom. In: Sandler A, Hrsg. *Gastrointestinale Tumoren: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. 7. Aufl. München: Zuckschwerdt; 2006. p. 161–82 .
9. Schmidt-Decker S, Brannath J, Teichmann W. Häufigkeit und Lokalisation kolorektaler Adenome und Karzinome bei 4109 Patienten. *Dtsch med Wochenschr* 1990; 115(48):1819–24.
10. Abrams JS, Reines HD. Increasing incidence of right-sided lesions in colorectal cancer. *Am. J. Surg* 1979; 137(4):522–6.
11. Beart RW, Melton LJ, Maruta M, Dockerty MB, Frydenberg HB, O'Fallon WM. Trends in right and left-sided colon cancer. *Dis Colon Rectum* 1983; 26(6):393–8.
12. Li FY, Lai MD. Colorectal cancer, one entity or three. *J Zhejiang Univ Sci B* 2009; 10(3):219–29.
13. Wang H, Wei X, Fu C, Zhao R, Cao F. Patterns of lymph node metastasis are different in colon and rectal carcinomas. *World J. Gastroenterol* 2010; 16(42):5375–9.
14. Obrand DI, Gordon PH. Incidence and patterns of recurrence following curative resection for colorectal carcinoma. *Dis. Colon Rectum* 1997; 40(1):15–24.
15. Yun HR, Lee LJ, Park JH, Cho YK, Cho YB, Lee WY et al. Local recurrence after curative resection in patients with colon and rectal cancers. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23(11):1081–7.
16. Enblad P, Adami HO, Bergström R, Glimelius B, Krusemo U, Pahlman L. Improved survival of patients with cancers of the colon and rectum? *J. Natl. Cancer Inst* 1988; 80(8):586–91.

17. Borschitz T, Junginger T. Transanale endoskopische Mikrochirurgie (TEM). *Der Onkologe* 2008; 14(1):81–92.
18. Schmiegel W, Reinacher-Schick A, Arnold D, Graeven U, Heinemann V, Porschen R et al. S3-Leitlinie "Kolorektales Karzinom" - Aktualisierung 2008.; Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 2008; 46(8):799–840.
19. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J. Pathol* 1932; 35(3):323–32.
20. Schmiegel W, Pox C, Reinacher-Schick A, Adler G, Arnold D, Fleig W et al. S3 guidelines for colorectal carcinoma: results of an evidence-based consensus conference on February 6/7, 2004 and June 8/9, 2007 (for the topics IV, VI and VII). *Z Gastroenterol* 2010; 48(1):65–136.
21. Baldus SE. Clinical, pathological and molecular prognostic factors in colorectal carcinomas. *Pathologie* 2003; 24(1):49–60.
22. Wang H, Liang W, Lin T, Chen W, Jiang J, Yang S et al. Curative resection of T1 colorectal carcinoma: risk of lymph node metastasis and long-term prognosis. *Dis. Colon Rectum* 2005; 48(6):1182–92.
23. Freedman LS, Macaskill P, Smith AN. Multivariate analysis of prognostic factors for operable rectal cancer. *Lancet* 1984; 324(8405):733–6.
24. Hermanek P, Gall FP. Early (microinvasive) colorectal carcinoma. Pathology, diagnosis, surgical treatment. *Int J Colorectal Dis* 1986; 1(2):79–84.
25. Nicholls RJ, Mason AY, Morson BC, Dixon AK, Fry IK. The clinical staging of rectal cancer. *Br J Surg* 1982; 69(7):404–9.
26. Engelen SME, Beets GL, Beets-Tan RGH. Role of preoperative local and distant staging in rectal cancer. *Onkologie* 2007; 30(3):141–5.
27. Garcia-Aguilar J, Pollack J, Lee S, Hernandez Anda E de, Mellgren A, Wong WD et al. Accuracy of endorectal ultrasonography in preoperative staging of rectal tumors. *Dis. Colon Rectum* 2002; 45(1):10–5.
28. Hünerbein M, Schlag PM. Three-dimensional endosonography for staging of rectal cancer. *Ann. Surg.* 1997; 225(4):432–8.
29. Giovannini M, Bories E, Pesenti C, Moutardier V, Lelong B, Delpéro JR. Three-dimensional endorectal ultrasound using a new freehand software program: results in 35 patients with rectal cancer. *Endoscopy* 2006; 38(4):339–43.
30. Bartram C, Brown G. Endorectal ultrasound and magnetic resonance imaging in rectal cancer staging. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 2002; 31(3):827–39.
31. Schäfer A, Baumann T, Pache G, Wiech T, Langer M. Präoperatives Staging des Rektumkarzinoms. *Radiologie* 2007; 47(7):635–52.
32. Dworák O. Number and size of lymph nodes and node metastases in rectal carcinomas. *Surg Endosc* 1989; 3(2):96–9.
33. Misselwitz B. MR contrast agents in lymph node imaging. *Eur J Radiol* 2006; 58(3):375–82.
34. Fegiz G, Ramacciato G, Indinnimeo M, Gozzo P, Valabrega S, Angelis R de et al. Synchronous large bowel cancer: a series of 47 cases. *Ital J Surg Sci* 1989; 19(1):23–8.
35. Barillari P, Ramacciato G, Angelis R de, Gozzo P, Indinnimeo M, Valabrega S et al. Effect of preoperative colonoscopy on the incidence of synchronous and metachronous neoplasms. *Acta Chir Scand* 1990; 156(2):163–6.
36. Zaheer S, Pemberton JH, Farouk R, Dozois RR, Wolff BG, Ilstrup D. Surgical treatment of adenocarcinoma of the rectum. *Ann. Surg.* 1998; 227(6):800–11.

37. Ceelen W, Pattyn P. Total mesorectal excision in the treatment of rectal cancer: a review. *Acta Chir. Belg.* 2000; 100(3):94–9.
38. Heald RJ, Karanjia ND. Results of radical surgery for rectal cancer. *World J Surg* 1992; 16(5):848–57.
39. McCall JL, Cox MR, Wattchow DA. Analysis of local recurrence rates after surgery alone for rectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 1995; 10(3):126–32.
40. Heald RJ, Husband EM, Ryall RD. The mesorectum in rectal cancer surgery--the clue to pelvic recurrence? *Br J Surg* 1982; 69(10):613–6.
41. NIH consensus conference. Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. *JAMA* 1990; 264(11):1444–50.
42. Kwok SP, Lau WY, Leung KL, Liew CT, Li AK. Prospective analysis of the distal margin of clearance in anterior resection for rectal carcinoma. *Br J Surg* 1996; 83(7):969–72.
43. Dahlberg M, Glimelius B, Pahlman L. Changing strategy for rectal cancer is associated with improved outcome. *Br J Surg* 1999; 86(3):379–84.
44. Lippert H, Gastinger I. Versorgung von Patienten mit Rektumkarzinomen in Deutschland. *Dtsch Arztebl* 2006; 103(41):A-2704.
45. Hermanek P, Merkel S, Fietkau R, Rödel C, Hohenberger W. Regional lymph node metastasis and locoregional recurrence of rectal carcinoma in the era of TNM surgery. Implications for treatment decisions. *Int J Colorectal Dis* 2010; 25(3):359–68.
46. Peeters KCMJ, Tollenaar RAEM, Marijnen CAM, Klein Kranenbarg E, Steup WH, Wiggers T et al. Risk factors for anastomotic failure after total mesorectal excision of rectal cancer. *Br J Surg* 2005; 92(2):211–6.
47. Veenhof AAFA, Brosens R, Engel AF, van der Peet DL, Cuesta MA. Risk factors and management of presacral abscess following total mesorectal excision for rectal cancer. *Dig Surg* 2009; 26(4):317–21.
48. Kneist W, Junginger T. Validity of pelvic autonomic nerve stimulation with intraoperative monitoring of bladder function following total mesorectal excision for rectal cancer. *Dis. Colon Rectum* 2005; 48(2):262–9.
49. Junginger T, Kneist W, Borschitz T. Totale Mesorektumexzision kann urogenitale Dysfunktionen vermeiden. *Dtsch Arztebl* 2004; 101(46):A-3106.
50. Lange MM, Maas CP, Marijnen CAM, Wiggers T, Rutten HJ, Kranenbarg EK et al. Urinary dysfunction after rectal cancer treatment is mainly caused by surgery. *Br J Surg* 2008; 95(8):1020–8.
51. Lange MM, den Dulk M, Bossema ER, Maas CP, Peeters KCMJ, Rutten HJ et al. Risk factors for faecal incontinence after rectal cancer treatment. *Br J Surg* 2007; 94(10):1278–84.
52. Gastrointestinal Tumor Study Group. Prolongation of the Disease-Free Interval in Surgically Treated Rectal Carcinoma. *N Engl J Med* 1985; 312(23):1465–72.
53. Krook JE, Moertel CG, Gunderson LL, Wieand HS, Collins RT, Beart RW et al. Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 1991; 324(11):709–15.
54. Merkel S, Mansmann U, Siassi M, Papadopoulos T, Hohenberger W, Hermanek P. The prognostic inhomogeneity in pT3 rectal carcinomas. *Int J Colorectal Dis* 2001; 16(5):298–304.
55. Bosset J, Collette L, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radosevich-Jelic L et al. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355(11):1114–23.

56. Collette L, Bosset J, den Dulk M, Nguyen F, Mineur L, Maingon P et al. Patients with curative resection of cT3-4 rectal cancer after preoperative radiotherapy or radiochemotherapy: does anybody benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy? A trial of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Radiation Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25(28):4379–86.
57. Kapiteijn E, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Putter H, Steup WH, Wiggers T et al. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2001; 345(9):638–46.
58. Colorectal Cancer Collaborative Group. Adjuvant radiotherapy for rectal cancer: a systematic overview of 8,507 patients from 22 randomised trials. *Lancet* 2001; 358(9290):1291–304.
59. Cammà C, Giunta M, Fiorica F, Pagliaro L, Craxì A, Cottone M. Preoperative radiotherapy for resectable rectal cancer: A meta-analysis. *JAMA* 2000; 284(8):1008–15.
60. Frykholm GJ, Glimelius B, Pählman L. Preoperative or postoperative irradiation in adenocarcinoma of the rectum: final treatment results of a randomized trial and an evaluation of late secondary effects. *Dis. Colon Rectum* 1993; 36(6):564–72.
61. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351(17):1731–40.
62. Marijnen CAM, van de Velde CJH, Putter H, van den Brink M, Maas CP, Martijn H et al. Impact of short-term preoperative radiotherapy on health-related quality of life and sexual functioning in primary rectal cancer: report of a multicenter randomized trial. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23(9):1847–58.
63. Peeters KCMJ, van de Velde CJH, Leer JWH, Martijn H, Junggeburst JMC, Kranenbarg EK et al. Late side effects of short-course preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for rectal cancer: increased bowel dysfunction in irradiated patients--a Dutch colorectal cancer group study. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23(25):6199–206.
64. Schaffer M, Thoma M, Wilkowski R, Schaffer P, Dühmke E. Radio-chemotherapy as a preoperative treatment for advanced rectal cancer. Evaluation of down-staging and morbidity. *Onkologie* 2002; 25(4):352–6.
65. Deinlein P, Reulbach U, Stolte M, Vieth M. [Risk factors for lymphatic metastasis from pT1 colorectal adenocarcinoma]. *Pathologe* 2003; 24(5):387–93.
66. Buess G, Theiss R, Hutterer F, Pichlmaier H, Pelz C, Holfeld T et al. [Transanal endoscopic surgery of the rectum - testing a new method in animal experiments]. *Leber Magen Darm* 1983; 13(2):73–7.
67. Buess G, Theiss R, Günther M, Hutterer F, Pichlmaier H. [Transanal endoscopic microsurgery]. *Leber Magen Darm* 1985; 15(6):271–9.
68. Mentges B, Buess G, Effinger G, Becker HD. Die lokale Therapie des Rektumfrühkarzinomes in kurativer Absicht: Implikationen für eine Änderung der onkologischen Strategie. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1996; 113:543–6.
69. Borschitz T, Gockel I, Kiesslich R, Junginger T. Oncological outcome after local excision of rectal carcinomas. *Ann. Surg. Oncol.* 2008; 15(11):3101–8.
70. Graham RA, Garnsey L, Jessup JM. Local excision of rectal carcinoma. *Am. J. Surg.* 1990; 160(3):306–12.
71. Winde G, Nottberg H, Keller R, Schmid KW, Bünte H. Surgical cure for early rectal carcinomas (T1). Transanal endoscopic microsurgery vs. anterior resection. *Dis. Colon Rectum* 1996; 39(9):969–76.

72. Kreis ME, Jehle EC, Haug V, Manncke K, Buess GF, Becker HD et al. Functional results after transanal endoscopic microsurgery. *Diseases of the colon and rectum* 1996; 39(10):1116–21.
73. Hahnloser D, Wolff BG, Larson DW, Ping J, Nivatvongs S. Immediate radical resection after local excision of rectal cancer: an oncologic compromise? *Dis. Colon Rectum* 2005; 48(3):429–37.
74. Brodsky JT, Richard GK, Cohen AM, Minsky BD. Variables correlated with the risk of lymph node metastasis in early rectal cancer. *Cancer* 1992; 69(2):322–6.
75. Borschitz T, Heintz A, Junginger T. Transanal endoscopic microsurgical excision of pT2 rectal cancer: results and possible indications. *Dis. Colon Rectum* 2007; 50(3):292–301.
76. Borschitz T, Kneist W, Gockel I, Junginger T. Local excision for more advanced rectal tumors. *Acta Oncol* 2008; 47(6):1140–7.
77. Borschitz T, Wachtlin D, Möhler M, Schmidberger H, Junginger T. Neoadjuvant chemoradiation and local excision for T2-3 rectal cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 2008; 15(3):712–20.
78. Gollins SW, Myint S, Susnerwala S, Haylock B, Wise M, Topham C et al. Preoperative downstaging chemoradiation with concurrent irinotecan and capecitabine in MRI-defined locally advanced rectal cancer: a phase I trial (NCCOG-2). *Br. J. Cancer* 2009; 101(6):924–34.
79. Rödel C, Liersch T, Hermann RM, Arnold D, Reese T, Hipp M et al. Multicenter phase II trial of chemoradiation with oxaliplatin for rectal cancer. *J. Clin. Oncol* 2007; 25(1):110–7.
80. Kube R, Ptok H, Wolff S, Lippert H, Gastinger I. Quality of medical care in colorectal cancer in Germany. *Onkologie* 2009; 32(1-2):25–9.
81. Das P, Skibber JM, Rodriguez-Bigas MA, Feig BW, Chang GJ, Hoff PM et al. Clinical and pathologic predictors of locoregional recurrence, distant metastasis, and overall survival in patients treated with chemoradiation and mesorectal excision for rectal cancer. *Am. J. Clin. Oncol.* 2006; 29(3):219–24.
82. Andreoni B, Chiappa A, Bertani E, Bellomi M, Orecchia R, Zampino M et al. Surgical outcomes for colon and rectal cancer over a decade: results from a consecutive monocentric experience in 902 unselected patients. *World J Surg Oncol* 2007; 5:73.
83. Leite JS, Martins SC, Oliveira J, Cunha MF, Castro-Sousa F. Clinical significance of macroscopic completeness of mesorectal resection in rectal cancer. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland* 2009.
84. Hermanek P, Wittekind C. Residual tumor (R) classification and prognosis. *Semin Surg Oncol* 1994; 10(1):12–20.
85. Compton CC. Pathology report in colon cancer: what is prognostically important? *Dig Dis* 1999; 17(2):67–79.
86. Guzińska-Ustymowicz K. The role of tumour budding at the front of invasion and recurrence of rectal carcinoma. *Anticancer Res.* 2005; 25(2B):1269–72.
87. Homma Y, Hamano T, Otsuki Y, Shimizu S, Kobayashi H, Kobayashi Y. Severe tumor budding is a risk factor for lateral lymph node metastasis in early rectal cancers. *J Surg Oncol* 2010; 102(3):230–4.
88. Hase K, Shatney C, Johnson D, Trollope M, Vierra M. Prognostic value of tumor "budding" in patients with colorectal cancer. *Dis. Colon Rectum* 1993; 36(7):627–35.
89. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J. Natl. Cancer Inst* 1998; 90(9):675–84.

90. Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J. Clin. Oncol* 2005; 23(3):609–18.
91. Buckowitz A, Knaebel H, Benner A, Bläker H, Gebert J, Kienle P et al. Microsatellite instability in colorectal cancer is associated with local lymphocyte infiltration and low frequency of distant metastases. *Br. J. Cancer* 2005; 92(9):1746–53.
92. Park YJ, Oh BR, Lim SW, Huh JW, Joo JK, Kim YJ et al. Clinical Significance of Tumor Regression Grade in Rectal Cancer with Preoperative Chemoradiotherapy. *J Korean Soc Coloproctol* 2010; 26(4):279.
93. Nagtegaal ID, Marijnen CA, Kranenbarg EK, Mulder-Stapel A, Hermans J, van de Velde CJ et al. Local and distant recurrences in rectal cancer patients are predicted by the nonspecific immune response; specific immune response has only a systemic effect--a histopathological and immunohistochemical study. *BMC Cancer* 2001; 1:7.
94. Klintrup K, Mäkinen JM, Kauppila S, Väre PO, Melkko J, Tuominen H et al. Inflammation and prognosis in colorectal cancer. *Eur. J. Cancer* 2005; 41(17):2645–54.
95. Borschitz T, Heintz A, Junginger T. The influence of histopathologic criteria on the long-term prognosis of locally excised pT1 rectal carcinomas: results of local excision (transanal endoscopic microsurgery) and immediate reoperation. *Dis. Colon Rectum* 2006; 49(10):1492-506; discussion 1500-5.
96. Nascimbeni R, Burgart LJ, Nivatvongs S, Larson DR. Risk of lymph node metastasis in T1 carcinoma of the colon and rectum. *Dis. Colon Rectum* 2002; 45(2):200–6.
97. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat. Rev. Immunol* 2006; 6(11):836–48.
98. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001; 410(6832):1107–11.
99. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21(2):137–48.
100. Pardoll D. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu. Rev. Immunol.* 2003; 21:807–39.
101. Smyth MJ, Crowe NY, Godfrey DI. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int. Immunol.* 2001; 13(4):459–63.
102. Titu LV, Monson JRT, Greenman J. The role of CD8(+) T cells in immune responses to colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 2002; 51(5):235–47.
103. Atkinson EA, Bleackley RC. Mechanisms of lysis by cytotoxic T cells. *Crit. Rev. Immunol.* 1995; 15(3-4):359–84.
104. Bakker AB, Phillips JH, Figdor CG, Lanier LL. Killer cell inhibitory receptors for MHC class I molecules regulate lysis of melanoma cells mediated by NK cells, gamma delta T cells, and antigen-specific CTL. *J. Immunol.* 1998; 160(11):5239–45.
105. Herr HW, Morales A. History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story. *J. Urol* 2008; 179(1):53–6.
106. Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353(25):2654–66.

107. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313(5795):1960–4.
108. Deschoolmeester V, Baay M, van Marck E, Weyler J, Vermeulen P, Lardon F et al. Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal cancer patients. *BMC Immunol.* 2010; 11:19.
109. Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean M, Tartour E, Sautès-Fridman C, Fridman W. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 2009; 29(8):1093–102.
110. Galizia G, Lieto E, Vita F de, Romano C, Orditura M, Castellano P et al. Circulating levels of interleukin-10 and interleukin-6 in gastric and colon cancer patients before and after surgery: relationship with radicality and outcome. *J. Interferon Cytokine Res.* 2002; 22(4):473–82.
111. O'Hara RJ, Greenman J, MacDonald AW, Gaskell KM, Topping KP, Duthie GS et al. Advanced colorectal cancer is associated with impaired interleukin 12 and enhanced interleukin 10 production. *Clin. Cancer Res.* 1998; 4(8):1943–8.
112. Browning M, Petronzelli F, Bicknell D, Krausa P, Rowan A, Tonks S et al. Mechanisms of loss of HLA class I expression on colorectal tumor cells. *Tissue Antigens* 1996; 47(5):364–71.
113. Browning MJ, Krausa P, Rowan A, Hill AB, Bicknell DC, Bodmer JG et al. Loss of human leukocyte antigen expression on colorectal tumor cell lines: implications for anti-tumor immunity and immunotherapy. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1993; 14(3):163–8.
114. van Geelen CMM, Vries EGE de, Jong S de. Lessons from TRAIL-resistance mechanisms in colorectal cancer cells: paving the road to patient-tailored therapy. *Drug Resist. Updat.* 2004; 7(6):345–58.
115. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* 2004; 10(9):942–9.
116. Yang Z, Novak AJ, Stenson MJ, Witzig TE, Ansell SM. Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2006; 107(9):3639–46.
117. Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y, Akaike H, Kamimura K, Sugai H et al. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer. *Int. J. Cancer* 2008; 122(10):2286–93.
118. Gershon RK, Kondo K. Infectious immunological tolerance. *Immunology* 1971; 21(6):903–14.
119. Berendt MJ, North RJ. T-cell-mediated suppression of anti-tumor immunity. An explanation for progressive growth of an immunogenic tumor. *J. Exp. Med.* 1980; 151(1):69–80.
120. Chakraborty NG, Twardzik DR, Sivanandham M, Ergin MT, Hellstrom KE, Mukherji B. Autologous melanoma-induced activation of regulatory T cells that suppress cytotoxic response. *J. Immunol.* 1990; 145(7):2359–64.
121. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 1995; 155(3):1151–64.
122. Robb RJ, Munck A, Smith KA. T cell growth factor receptors. Quantitation, specificity, and biological relevance. *J. Exp. Med.* 1981; 154(5):1455–74.
123. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299(5609):1057–61.

124. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2003; 4(4):330–6.
125. Roncador G, Brown PJ, Maestre L, Hue S, Martínez-Torrecedrada JL, Ling K et al. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur. J. Immunol.* 2005; 35(6):1681–91.
126. Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Francalanci M, Angeli R, Mazzinghi B et al. Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. *Blood* 2003; 102(12):4107–14.
127. Möller G. Do suppressor T cells exist? *Scand. J. Immunol.* 1988; 27(3):247–50.
128. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* 2000; 192(2):303–10.
129. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1994; 1(5):405–13.
130. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int. Immunol.* 2007; 19(4):345–54.
131. Corthay A. How do regulatory T cells work? *Scand. J. Immunol.* 2009; 70(4):326–36.
132. Siddiqui SA, Frigola X, Bonne-Annee S, Mercader M, Kuntz SM, Krambeck AE et al. Tumor-infiltrating Foxp3-CD4+CD25+ T cells predict poor survival in renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13(7):2075–81.
133. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J. Immunol.* 1999; 162(9):5317–26.
134. Simons DM, Picca CC, Oh S, Perng OA, Aitken M, Erikson J et al. How specificity for self-peptides shapes the development and function of regulatory T cells. *Journal of leukocyte biology* 2010.
135. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, Vries JE de et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389(6652):737–42.
136. Apostolou I, Boehmer H von. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J. Exp. Med.* 2004; 199(10):1401–8.
137. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K, Li L, Marinos N et al. Conversion of peripheral CD4+CD25-naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 2003; 198(12):1875–86.
138. Ziegler SF, Buckner JH. FOXP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation. *Microbes Infect* 2009; 11(5):594–8.
139. Cao X. Regulatory T cells and immune tolerance to tumors. *Immunol Res* 2010; 46(1-3):79–93.
140. Vieira PL, Christensen JR, Minaee S, O'Neill EJ, Barrat FJ, Boonstra A et al. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 2004; 172(10):5986–93.

141. Singh RP, La Cava A, Wong M, Ebling F, Hahn BH. CD8+ T cell-mediated suppression of autoimmunity in a murine lupus model of peptide-induced immune tolerance depends on Foxp3 expression. *J. Immunol.* 2007; 178(12):7649–57.
142. Hahn BH, Singh RP, La Cava A, Ebling FM. Tolerogenic treatment of lupus mice with consensus peptide induces Foxp3-expressing, apoptosis-resistant, TGFbeta-secreting CD8+ T cell suppressors. *J. Immunol.* 2005; 175(11):7728–37.
143. Gilliet M, Liu Y. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2002; 195(6):695–704.
144. McIver Z, Serio B, Dunbar A, O'Keefe CL, Powers J, Wlodarski M et al. Double-negative regulatory T cells induce allotolerance when expanded after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* 2008; 141(2):170–8.
145. Fischer K, Voelkl S, Heymann J, Przybylski GK, Mondal K, Laumer M et al. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood* 2005; 105(7):2828–35.
146. Oldenhove G, Heusch M de, Urbain-Vansanten G, Urbain J, Maliszewski C, Leo O et al. CD4+ CD25+ regulatory T cells control T helper cell type 1 responses to foreign antigens induced by mature dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* 2003; 198(2):259–66.
147. Dubois B, Chapat L, Goubier A, Kaiserlian D. CD4+CD25+ T cells as key regulators of immune responses. *Eur J Dermatol* 2003; 13(2):111–6.
148. Nomura T, Sakaguchi S. Naturally arising CD25+CD4+ regulatory T cells in tumor immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2005; 293:287–302.
149. Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat. Immunol.* 2005; 6(4):353–60.
150. Piao W, Jee YH, Liu RL, Coons SW, Kala M, Collins M et al. IL-21 modulates CD4+ CD25+ regulatory T-cell homeostasis in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scand. J. Immunol.* 2008; 67(1):37–46.
151. Huter EN, Stummvoll GH, DiPaolo RJ, Glass DD, Shevach EM. Cutting edge: antigen-specific TGF beta-induced regulatory T cells suppress Th17-mediated autoimmune disease. *J. Immunol.* 2008; 181(12):8209–13.
152. Ciccia F, Accardo-Palumbo A, Giardina A, Di Maggio P, Principato A, Bombardieri M et al. Expansion of intestinal CD4+CD25(high) Treg cells in patients with ankylosing spondylitis: A putative role for interleukin-10 in preventing intestinal Th17 response. *Arthritis Rheum* 2010; 62(12):3625–34.
153. Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, Greenfield EA, Chang TT, Sharpe AH et al. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat. Med.* 2002; 8(9):1024–32.
154. Zuany-Amorim C, Sawicka E, Manlius C, Le Moine A, Brunet LR, Kemeny DM et al. Suppression of airway eosinophilia by killed Mycobacterium vaccae-induced allergen-specific regulatory T-cells. *Nat. Med.* 2002; 8(6):625–9.
155. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat. Immunol.* 2004; 5(3):266–71.
156. Piccinni M. T cell tolerance towards the fetal allograft. *J. Reprod. Immunol.* 2010; 85(1):71–5.
157. Coombes JL, Maloy KJ. Control of intestinal homeostasis by regulatory T cells and dendritic cells. *Semin. Immunol.* 2007; 19(2):116–26.

158. O'Mahony C, Scully P, O'Mahony D, Murphy S, O'Brien F, Lyons A et al. Commensal-induced regulatory T cells mediate protection against pathogen-stimulated NF-kappaB activation. *PLoS Pathog.* 2008; 4(8):e1000112.
159. Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K et al. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J. Exp. Med.* 2003; 198(2):235–47.
160. Yu P, Gregg RK, Bell JJ, Ellis JS, Divekar R, Lee H et al. Specific T regulatory cells display broad suppressive functions against experimental allergic encephalomyelitis upon activation with cognate antigen. *J. Immunol.* 2005; 174(11):6772–80.
161. Paust S, Lu L, McCarty N, Cantor H. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004; 101(28):10398–403.
162. Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol. Rev.* 2001; 182:58–67.
163. Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* 2006; 118(2):240–9.
164. Read S, Malmström V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 2000; 192(2):295–302.
165. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2003; 4(12):1206–12.
166. Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J. Exp. Med.* 1999; 189(9):1363–72.
167. Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A et al. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ.* 2002; 9(10):1069–77.
168. Blansfield JA, Beck KE, Tran K, Yang JC, Hughes MS, Kammula US et al. Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 blockage can induce autoimmune hypophysitis in patients with metastatic melanoma and renal cancer. *J. Immunother.* 2005; 28(6):593–8.
169. Maker AV, Phan GQ, Attia P, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL et al. Tumor regression and autoimmunity in patients treated with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and interleukin 2: a phase I/II study. *Ann. Surg. Oncol.* 2005; 12(12):1005–16.
170. Maker AV, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Kammula US, Royal RE et al. Inpatient dose escalation of anti-CTLA-4 antibody in patients with metastatic melanoma. *J. Immunother.* 2006; 29(4):455–63.
171. Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2002; 129(4):263–76.
172. Taylor A, Verhagen J, Blaser K, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology* 2006; 117(4):433–42.
173. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol.* 1991; 146(10):3444–51.
174. Moore KW, O'Garra A, Waal Malefyt R de, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* 1993; 11:165–90.

175. Strobl H, Knapp W. TGF-beta1 regulation of dendritic cells. *Microbes Infect.* 1999; 1(15):1283–90.
176. Somasundaram R, Jacob L, Swoboda R, Caputo L, Song H, Basak S et al. Inhibition of cytolytic T lymphocyte proliferation by autologous CD4+/CD25+ regulatory T cells in a colorectal carcinoma patient is mediated by transforming growth factor-beta. *Cancer Res.* 2002; 62(18):5267–72.
177. Chen M, Pittet MJ, Gorelik L, Flavell RA, Weissleder R, Boehmer H von et al. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005; 102(2):419–24.
178. Ghiringhelli F, Ménard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J. Exp. Med.* 2005; 202(8):1075–85.
179. Zhao D, Thornton AM, DiPaolo RJ, Shevach EM. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 2006; 107(10):3925–32.
180. Boissonnas A, Scholer-Dahirel A, Simon-Blancal V, Pace L, Valet F, Kissenpfennig A et al. Foxp3+ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes. *Immunity* 2010; 32(2):266–78.
181. Grossman WJ, Verbsky JW, Tollefsen BL, Kemper C, Atkinson JP, Ley TJ. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* 2004; 104(9):2840–8.
182. Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 2004; 21(4):589–601.
183. Gondek DC, Lu L, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J. Immunol.* 2005; 174(4):1783–6.
184. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnicka-Worms DR et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 2007; 27(4):635–46.
185. Strauss L, Bergmann C, Whiteside TL. Human circulating CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells kill autologous CD8+ but not CD4+ responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol.* 2009; 182(3):1469–80.
186. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* 2007; 8(12):1353–62.
187. Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E et al. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J. Exp. Med.* 2007; 204(6):1303–10.
188. Zhou L, Chong MMW, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* 2009; 30(5):646–55.
189. Chen Z, Lin F, Gao Y, Li Z, Zhang J, Xing Y et al. FOXP3 and RORyt: Transcriptional regulation of Treg and Th17. *International immunopharmacology* 2010.
190. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441(7090):235–8.

191. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat. Med* 2007; 13(2):139–45.
192. Nakae S, Iwakura Y, Suto H, Galli SJ. Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17. *J. Leukoc. Biol* 2007; 81(5):1258–68.
193. Schwartz S, Beaulieu JF, Ruemmele FM. Interleukin-17 is a potent immuno-modulator and regulator of normal human intestinal epithelial cell growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2005; 337(2):505–9.
194. Valmori D, Raffin C, Raimbaud I, Ayyoub M. Human ROR γ t+ TH17 cells preferentially differentiate from naive FOXP3+Treg in the presence of lineage-specific polarizing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2010; 107(45):19402–7.
195. Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* 2008; 29(1):44–56.
196. Zhou X, Bailey-Bucktrout S, Jeker LT, Bluestone JA. Plasticity of CD4(+) FoxP3(+) T cells. *Curr. Opin. Immunol* 2009; 21(3):281–5.
197. Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J. Immunol* 2007; 178(11):6725–9.
198. Lee YK, Mukasa R, Hatton RD, Weaver CT. Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. *Current Opinion in Immunology* 2009; 21(3):274–80.
199. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9(2):606–12.
200. Livanage UK, Moore TT, Joo H, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J. Immunol.* 2002; 169(5):2756–61.
201. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2005; 65(6):2457–64.
202. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G et al. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res.* 2001; 61(12):4766–72.
203. Viguier M, Lemaître F, Verola O, Cho M, Gorochov G, Dubertret L et al. Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J. Immunol.* 2004; 173(2):1444–53.
204. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V et al. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res.* 2009; 69(5):2000–9.
205. Wei S, Kryczek I, Zou L, Daniel B, Cheng P, Mottram P et al. Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 2005; 65(12):5020–6.
206. Strauss L, Bergmann C, Szczepanski M, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL. A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13(15 Pt 1):4345–54.

207. Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res.* 1999; 59(13):3128–33.
208. Nagai H, Horikawa T, Hara I, Fukunaga A, Oniki S, Oka M et al. In vivo elimination of CD25+ regulatory T cells leads to tumor rejection of B16F10 melanoma, when combined with interleukin-12 gene transfer. *Exp. Dermatol.* 2004; 13(10):613–20.
209. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J. Immunol.* 1999; 163(10):5211–8.
210. Zhou G, Drake CG, Levitsky HI. Amplification of tumor-specific regulatory T cells following therapeutic cancer vaccines. *Blood* 2006; 107(2):628–36.
211. Nair RE, Kilinc MO, Jones SA, Egilmez NK. Chronic immune therapy induces a progressive increase in intratumoral T suppressor activity and a concurrent loss of tumor-specific CD8+ T effectors in her-2/neu transgenic mice bearing advanced spontaneous tumors. *J. Immunol.* 2006; 176(12):7325–34.
212. Wei W, Jacob JB, Zielinski JF, Flynn JC, Shim KD, Alsharabi G et al. Concurrent induction of antitumor immunity and autoimmune thyroiditis in CD4+ CD25+ regulatory T cell-depleted mice. *Cancer Res.* 2005; 65(18):8471–8.
213. Foss FM. DAB(389)IL-2 (denileukin diftitox, ONTAK): a new fusion protein technology. *Clin Lymphoma* 2000; 1 Suppl 1:S27-31.
214. Rasku MA, Clem AL, Telang S, Taft B, Gettings K, Gragg H et al. Transient T cell depletion causes regression of melanoma metastases. *J Transl Med* 2008; 6:12.
215. Gerena-Lewis M, Crawford J, Bonomi P, Maddox AM, Hainsworth J, McCune DE et al. A Phase II trial of Denileukin Diftitox in patients with previously treated advanced non-small cell lung cancer. *Am. J. Clin. Oncol.* 2009; 32(3):269–73.
216. Weber J. Overcoming immunologic tolerance to melanoma: targeting CTLA-4 with ipilimumab (MDX-010). *Oncologist* 2008; 13 Suppl 4:16–25.
217. Phan GQ, Yang JC, Sherry RM, Hwu P, Topalian SL, Schwartzentruber DJ et al. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003; 100(14):8372–7.
218. Rech AJ, Vonderheide RH. Clinical use of anti-CD25 antibody daclizumab to enhance immune responses to tumor antigen vaccination by targeting regulatory T cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009; 1174:99–106.
219. Dannull J, Su Z, Rizzieri D, Yang BK, Coleman D, Yancey D et al. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J. Clin. Invest.* 2005; 115(12):3623–33.
220. Bayry J, Tchilian EZ, Davies MN, Forbes EK, Draper SJ, Kaveri SV et al. In silico identified CCR4 antagonists target regulatory T cells and exert adjuvant activity in vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008; 105(29):10221–6.
221. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005; 102(51):18538–43.
222. Xu L, Xu W, Qiu S, Xiong S. Enrichment of CCR6+Foxp3+ regulatory T cells in the tumor mass correlates with impaired CD8+ T cell function and poor prognosis of breast cancer. *Clin. Immunol.* 2010; 135(3):466–75.

223. Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12(18):5423–34.
224. Shen Z, Zhou S, Wang Y, Li R, Zhong C, Liang C et al. Higher intratumoral infiltrated Foxp3+ Treg numbers and Foxp3+/CD8+ ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2010; 136(10):1585–95.
225. Perrone G, Ruffini PA, Catalano V, Spino C, Santini D, Muretto P et al. Intratumoural FOXP3-positive regulatory T cells are associated with adverse prognosis in radically resected gastric cancer. *Eur. J. Cancer* 2008; 44(13):1875–82.
226. Li JF, Chu YW, Wang GM, Zhu TY, Rong RM, Hou J et al. The prognostic value of peritumoral regulatory T cells and its correlation with intratumoral cyclooxygenase-2 expression in clear cell renal cell carcinoma. *BJU Int.* 2009; 103(3):399–405.
227. Kobayashi N, Hiraoka N, Yamagami W, Ojima H, Kanai Y, Kosuge T et al. FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13(3):902–11.
228. Gao Q, Qiu S, Fan J, Zhou J, Wang X, Xiao Y et al. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25(18):2586–93.
229. Brody JR, Costantino CL, Berger AC, Sato T, Lisanti MP, Yeo CJ et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in metastatic malignant melanoma recruits regulatory T cells to avoid immune detection and affects survival. *Cell Cycle* 2009; 8(12):1930–4.
230. Mougiakakos D, Johansson CC, Trocme E, All-Ericsson C, Economou MA, Larsson O et al. Intratumoral forkhead box P3-positive regulatory T cells predict poor survival in cyclooxygenase-2-positive uveal melanoma. *Cancer* 2010; 116(9):2224–33.
231. Sonabend AM, Rolle CE, Lesniak MS. The role of regulatory T cells in malignant glioma. *Anticancer Res.* 2008; 28(2B):1143–50.
232. Yoshioka T, Miyamoto M, Cho Y, Ishikawa K, Tsuchikawa T, Kadoya M et al. Infiltrating regulatory T cell numbers is not a factor to predict patient's survival in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer* 2008; 98(7):1258–63.
233. Haas M, Dimmler A, Hohenberger W, Grabenbauer GG, Niedobitek G, Distel LV. Stromal regulatory T-cells are associated with a favourable prognosis in gastric cancer of the cardia. *BMC Gastroenterol* 2009; 9:65.
234. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, Colomo L, Martinez A, Roncador G et al. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood* 2006; 108(9):2957–64.
235. Kim WY, Jeon YK, Kim TM, Kim JE, Kim YA, Lee S et al. Increased quantity of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells is an independent predictor for improved clinical outcome in extranodal NK/T-cell lymphoma. *Ann. Oncol.* 2009; 20(10):1688–96.
236. Suzuki H, Chikazawa N, Tasaka T, Wada J, Yamasaki A, Kitaura Y et al. Intratumoral CD8(+)/T/FOXP3 (+) cell ratio is a predictive marker for survival in patients with colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 2009.
237. Loddenkemper C, Schernus M, Noutsias M, Stein H, Thiel E, Nagorsen D. In situ analysis of FOXP3+ regulatory T cells in human colorectal cancer. *J Transl Med* 2006; 4:52.
238. Ling KL, Pratap SE, Bates GJ, Singh B, Mortensen NJ, George BD et al. Increased frequency of regulatory T cells in peripheral blood and tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer patients. *Cancer Immun.* 2007; 7:7.

239. Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27(2):186–92.
240. Frey DM, Droezer RA, Viehl CT, Zlobec I, Lugli A, Zingg U et al. High frequency of tumor-infiltrating FOXP3(+) regulatory T cells predicts improved survival in mismatch repair-proficient colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer* 2010; 126(11):2635–43.
241. Correale P, Rotundo MS, Del Vecchio MT, Remondo C, Migali C, Ginanneschi C et al. Regulatory (FoxP3+) T-cell tumor infiltration is a favorable prognostic factor in advanced colon cancer patients undergoing chemo or chemoimmunotherapy. *J. Immunother.* 2010; 33(4):435–41.
242. Victor A, Elsässer A, Hommel G, Blettner M. Wie bewertet man die p-Wert-Flut?: Hinweise zum Umgang mit dem multiplen Testen. *Dtsch Arztebl Int* 2010; 107(4):50–6.
243. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 1995; 57(1):289–300.
244. Grabenbauer GG, Lahmer G, Distel L, Niedobitek G. Tumor-infiltrating cytotoxic T cells but not regulatory T cells predict outcome in anal squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12(11 Pt 1):3355–60.
245. Ahmadzadeh M, Felipe-Silva A, Heemskerk B, Powell DJ, Wunderlich JR, Merino MJ et al. FOXP3 expression accurately defines the population of intratumoral regulatory T cells that selectively accumulate in metastatic melanoma lesions. *Blood* 2008; 112(13):4953–60.
246. Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 2003; 197(4):403–11.
247. Erdman SE, Poutahidis T. Roles for inflammation and regulatory T cells in colon cancer. *Toxicol Pathol* 2010; 38(1):76–87.
248. Kuper H, Adami HO, Trichopoulos D. Infections as a major preventable cause of human cancer. *J. Intern. Med* 2000; 248(3):171–83.
249. Tsuji S, Kawai N, Tsujii M, Kawano S, Hori M. Review article: inflammation-related promotion of gastrointestinal carcinogenesis—a perigenetic pathway. *Aliment. Pharmacol. Ther* 2003; 18 Suppl 1:82–9.
250. Kim YJ, Hong KS, Chung JW, Kim JH, Hahm KB. Prevention of colitis-associated carcinogenesis with infliximab. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010; 3(10):1314–33.
251. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420(6917):860–7.
252. Coussens LM, Werb Z. Inflammatory cells and cancer: think different! *J. Exp. Med* 2001; 193(6):F23-6.
253. Nam J, Terabe M, Kang M, Chae H, Voong N, Yang Y et al. Transforming growth factor beta subverts the immune system into directly promoting tumor growth through interleukin-17. *Cancer Res.* 2008; 68(10):3915–23.
254. Hoption Cann SA, van Netten JP, van Netten C. Acute infections as a means of cancer prevention: opposing effects to chronic infections? *Cancer Detect. Prev.* 2006; 30(1):83–93.
255. Visser KE de. Spontaneous immune responses to sporadic tumors: tumor-promoting, tumor-protective or both? *Cancer Immunol. Immunother.* 2008; 57(10):1531–9.
256. Visser KE de, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat. Rev. Cancer* 2006; 6(1):24–37.

257. Rothwell PM, Wilson M, Elwin CE, Norrving B, Algra A, Warlow CP et al. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet* 2010; 376(9754):1741–50.
258. Chan AT, Giovannucci EL, Meyerhardt JA, Schernhammer ES, Curhan GC, Fuchs CS. Long-term use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal cancer. *JAMA* 2005; 294(8):914–23.
259. Erdman SE, Poutahidis T. Cancer inflammation and regulatory T cells. *Int. J. Cancer* 2010; 127(4):768–79.
260. Erdman SE, Rao VP, Poutahidis T, Ihrig MM, Ge Z, Feng Y et al. CD4(+)CD25(+) regulatory lymphocytes require interleukin 10 to interrupt colon carcinogenesis in mice. *Cancer Res.* 2003; 63(18):6042–50.
261. Poutahidis T, Haigis KM, Rao VP, Nambiar PR, Taylor CL, Ge Z et al. Rapid reversal of interleukin-6-dependent epithelial invasion in a mouse model of microbially induced colon carcinoma. *Carcinogenesis* 2007; 28(12):2614–23.
262. van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* 2009; 71:241–60.
263. Barker N, van de Wetering M, Clevers H. The intestinal stem cell. *Genes Dev* 2008; 22(14):1856–64.
264. Makita S, Kanai T, Oshima S, Uraushihara K, Totsuka T, Sawada T et al. CD4+CD25bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *J. Immunol.* 2004; 173(5):3119–30.
265. Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol. Rev* 2006; 212:256–71.
266. Kullberg MC, Jankovic D, Gorelick PL, Caspar P, Letterio JJ, Cheever AW et al. Bacteria-triggered CD4(+) T regulatory cells suppress *Helicobacter hepaticus*-induced colitis. *J. Exp. Med.* 2002; 196(4):505–15.
267. Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 2008; 453(7195):620–5.
268. Chow J, Mazmanian SK. Getting the bugs out of the immune system: do bacterial microbiota "fix" intestinal T cell responses? *Cell Host Microbe* 2009; 5(1):8–12.
269. Parrott DM. The gut as a lymphoid organ. *Clin Gastroenterol* 1976; 5(2):211–28.
270. Peaudecerf L, Rocha B. Role of the gut as a primary lymphoid organ. *Immunology letters* 2011.
271. Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu. Rev. Immunol* 2009; 27:313–38.
272. Jang TJ. Prevalence of Foxp3 positive T regulatory cells is increased during progression of cutaneous squamous tumors. *Yonsei Med J* 2008; 49(6):942–8.
273. Kaporis HG, Guttman-Yassky E, Lowes MA, Haider AS, Fuentes-Duculan J, Darabi K et al. Human basal cell carcinoma is associated with Foxp3+ T cells in a Th2 dominant microenvironment. *J Invest Dermatol* 2007; 127(10):2391–8.
274. Lescut D, Colombel JF, Vincent P, Cortot A, Fournier L, Quandalle P et al. Bacterial translocation in colorectal cancers. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 1990; 14(11):811–4.
275. Parmiani G. Tumor-infiltrating T cells--friend or foe of neoplastic cells? *N. Engl. J. Med.* 2005; 353(25):2640–1.

276. Nagorsen D, Keilholz U, Rivoltini L, Schmittel A, Letsch A, Asemissen AM et al. Natural T-cell response against MHC class I epitopes of epithelial cell adhesion molecule, her-2/neu, and carcinoembryonic antigen in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* 2000; 60(17):4850–4.
277. Nagorsen D, Scheibenbogen C, Schaller G, Leigh B, Schmittel A, Letsch A et al. Differences in T-cell immunity toward tumor-associated antigens in colorectal cancer and breast cancer patients. *Int. J. Cancer* 2003; 105(2):221–5.
278. Nagorsen D, Scheibenbogen C, Marincola FM, Letsch A, Keilholz U. Natural T cell immunity against cancer. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9(12):4296–303.
279. Saurer L, Mueller C. T cell-mediated immunoregulation in the gastrointestinal tract. *Allergy* 2009; 64(4):505–19.
280. Caretto D, Katzman SD, Villarino AV, Gallo E, Abbas AK. Cutting edge: the Th1 response inhibits the generation of peripheral regulatory T cells. *J. Immunol.* 2010; 184(1):30–4.
281. Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G et al. In Situ Cytotoxic and Memory T Cells Predict Outcome in Patients With Early-Stage Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27(35):5944–51.

6. Anhang

6.1 UICC-Stadien beim Rektumkarzinom

(siehe auch TNM-Klassifikation, Tabelle 1, S. 9)

Tabelle 16

UICC-Stadien beim Rektumkarzinom	
UICC 0	Carcinoma in situ (=Tis N0 M0)
UICC I	Infiltration bis maximal Muscularis propria = T1 N0 M0 und T2 N0 M0
UICC II	ab Infiltration von perirektalem Fettgewebe
UICC IIA	= T3 N0 M0
UICC IIB	= T4a N0 M0
UICC IIC	= T4b N0 M0
UICC III	vorhandene Lymphknotenmetastasen
UICC IIIA	= T1/2 N1 M0; T1 N2a M0
UICC IIIB	= T3/4a N1 M0; T1/2 N2b M0; T2/3 N2a M0
UICC IIIC	= T4a N2a M0, T3/4a N2b M0; T4b N1/2 M0
UICC IV	vorhandene Fernmetastasen
UICC IVA	= M1a
UICC IVB	= M1b

6.2 Hypothesen und Signifikanzbestimmung

Explorative Simes-Prozedur nach Benjamini und Hochberg

(Erklärung siehe Abschnitt 2.7, S. 42)

Tabelle 17

Nullhypothese	durchgeführter Test	p-Wert	lokales Sign.-niveau	Konsequenz
Die intratumorale Infiltrationsdichte mit CD4-positiven Zellen ist kein unabhängiger Einflussfaktor auf das GSÜ	Cox-Regression	0,000	0,0004	Nullhypothese ablehnen
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich des GSÜ zwischen Patienten mit niedriger und hoher intratumoraler Infiltration mit CD4-positiven Zellen	Log-Rank-Test	0,000	0,0009	Nullhypothese ablehnen
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich des GSÜ zwischen Patienten mit niedriger und hoher intratumoraler Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen	Log-Rank-Test	0,000	0,0013	Nullhypothese ablehnen

Nullhypothese	durchgeführter Test	p-Wert	lokales Sign.-niveau	Konsequenz
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich des GSÜ zwischen Patienten mit niedriger und hoher peritumorale Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen	Log-Rank-Test	0,000	0,0017	Nullhypothese ablehnen
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumorale Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne Metastasierung im gesamten Beobachtungszeitraum	Mann-Whitney U-Test	0,000	0,0022	Nullhypothese ablehnen
Die intratumorale Infiltrationsdichte mit FoxP3-positiven Zellen ist kein unabhängiger Einflussfaktor auf das GSÜ	Cox-Regression	0,001	0,0026	Nullhypothese ablehnen
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumorale Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen zwischen Patienten mit T1/2 und T3/4	Mann-Whitney U-Test	0,001	0,0030	Nullhypothese ablehnen
Das Risiko des Auftretens von synchroner oder metachroner Fernmetastasierung bei Patienten mit niedriger und hoher peritumorale Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen ist gleich	Exakter Fisher-Test	0,001	0,0034	Nullhypothese ablehnen
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumorale Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen zwischen Patienten mit T1/2 und T3/4	Mann-Whitney U-Test	0,002	0,0039	Nullhypothese ablehnen
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich des RFÜ zwischen Patienten mit niedriger und hoher intratumorale Infiltration mit CD57-positiven Zellen	Log-Rank-Test	0,003	0,0043	Nullhypothese ablehnen
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumorale Infiltration mit CD57-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne Lokalrezidiv	Mann-Whitney U-Test	0,003	0,0047	Nullhypothese ablehnen
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich des RFÜ zwischen Patienten mit niedriger und hoher peritumorale Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen	Log-Rank-Test	0,005	0,0052	Nullhypothese ablehnen
Das Risiko des Auftretens von Lokalrezidiven bei Patienten mit niedriger und hoher intratumorale Infiltration mit CD57-positiven Zellen ist gleich	Exakter Fisher-Test	0,005	0,0056	Nullhypothese ablehnen
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumorale Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne Lokalrezidiv	Mann-Whitney U-Test	0,005	0,0060	Nullhypothese ablehnen
Das Risiko des Auftretens von synchroner Fernmetastasierung bei Patienten mit niedriger und hoher peritumorale Infiltration mit CD25-positiven Zellen ist gleich	Exakter Fisher-Test	0,006	0,0065	Nullhypothese ablehnen
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumorale Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen zwischen M+ und M-Patienten	Mann-Whitney U-Test	0,006	0,0069	Nullhypothese ablehnen
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumorale Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen zwischen M+ und M-Patienten	Mann-Whitney U-Test	0,011	0,0073	Nullhypothese beibehalten

Nullhypothese	durchgeführter Test	p-Wert	lokales Sign.-niveau	Konsequenz
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen zwischen mit Patienten low-grade und high-grade-Karzinomen	Mann-Whitney U-Test	0,012	0,0078	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumoraler Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne metachrone Metastasierung	Mann-Whitney U-Test	0,012	0,0082	Nullhypothese beibehalten
Der M-Status ist kein unabhängiger Einflussfaktor auf das GSÜ	Cox-Regression	0,013	0,0086	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumoraler Infiltration mit CD25-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne Metastasierung im gesamten Beobachtungszeitraum	Mann-Whitney U-Test	0,018	0,0091	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich des RFÜ zwischen Patienten mit niedriger und hoher peritumoraler Infiltration mit CD4-positiven Zellen	Log-Rank-Test	0,019	0,0095	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD4-positiven Zellen zwischen Patienten mit low-grade und high-grade-Karzinomen	Mann-Whitney U-Test	0,019	0,0099	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD4-positiven Zellen zwischen mit Patienten low-grade und high-grade-Karzinomen	Mann-Whitney U-Test	0,019	0,0103	Nullhypothese beibehalten
Der N-Status ist kein unabhängiger Einflussfaktor auf das GSÜ	Cox-Regression	0,024	0,0108	Nullhypothese beibehalten
Die peritumorale Infiltrationsdichte mit CD8-positiven Zellen ist kein unabhängiger Einflussfaktor auf das GSÜ	Cox-Regression	0,026	0,0112	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich des RFÜ zwischen Patienten mit niedriger und hoher peritumoraler Infiltration mit CD57-positiven Zellen	Log-Rank-Test	0,027	0,0116	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich des RFÜ zwischen Patienten mit niedriger und hoher intratumoraler Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen	Log-Rank-Test	0,030	0,0121	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen zwischen nodal positiven und negativen Patienten	Mann-Whitney U-Test	0,032	0,0125	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD57-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne Lokalrezidiv	Mann-Whitney U-Test	0,032	0,0129	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich des GSÜ zwischen Patienten mit niedriger und hoher peritumoraler Infiltration mit CD4-positiven Zellen	Log-Rank-Test	0,036	0,0134	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD57-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne Metastasierung im gesamten Beobachtungszeitraum	Mann-Whitney U-Test	0,036	0,0138	Nullhypothese beibehalten

Nullhypothese	durchgeführter Test	p-Wert	lokales Sign.-niveau	Konsequenz
Das Risiko des Auftretens von synchroner Fernmetastasierung bei Patienten mit niedriger und hoher intratumoraler Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen ist gleich	Exakter Fisher-Test	0,037	0,0142	Nullhypothese beibehalten
Das Risiko des Auftretens von metachroner Fernmetastasierung bei Patienten mit niedriger und hoher peritumorale Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen ist gleich	Exakter Fisher-Test	0,043	0,0147	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich des GSÜ zwischen Patienten mit niedriger und hoher peritumorale Infiltration mit CD25-positiven Zellen	Log-Rank-Test	0,044	0,0151	Nullhypothese beibehalten
Das Risiko des Auftretens von Lymphknotenmetastasen bei Patienten mit niedriger und hoher intratumoraler Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen ist gleich	Exakter Fisher-Test	0,044	0,0155	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumorale Infiltration mit CD25-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne metachrone Metastasierung	Mann-Whitney U-Test	0,045	0,0159	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumorale Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen zwischen Patienten mit low-grade und high-grade-Karzinomen	Mann-Whitney U-Test	0,048	0,0164	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD8-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne Lokalrezidiv	Mann-Whitney U-Test	0,050	0,0168	Nullhypothese beibehalten
Das Risiko des Auftretens von synchroner oder metachroner Fernmetastasierung bei Patienten mit niedriger und hoher peritumorale Infiltration mit CD57-positiven Zellen ist gleich	Exakter Fisher-Test	0,053	0,0172	Nullhypothese beibehalten
Das Risiko des Auftretens von synchroner oder metachroner Fernmetastasierung bei Patienten mit niedriger und hoher peritumorale Infiltration mit CD25-positiven Zellen ist gleich	Exakter Fisher-Test	0,053	0,0177	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumorale Infiltration mit CD57-positiven Zellen zwischen M+ und M-Patienten	Mann-Whitney U-Test	0,055	0,0181	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumorale Infiltration mit CD4-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne Lokalrezidiv	Mann-Whitney U-Test	0,056	0,0185	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumorale Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen zwischen nodal positiven und negativen Patienten	Mann-Whitney U-Test	0,057	0,0190	Nullhypothese beibehalten
Das Risiko des Auftretens von Lokalrezidiven bei Patienten mit niedriger und hoher peritumorale Infiltration mit CD57-positiven Zellen ist gleich	Exakter Fisher-Test	0,057	0,0194	Nullhypothese beibehalten
Das Risiko des Auftretens von Lokalrezidiven bei Patienten mit niedriger und hoher peritumorale Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen ist gleich	Exakter Fisher-Test	0,057	0,0198	Nullhypothese beibehalten

Nullhypothese	durchgeführter Test	p-Wert	lokales Sign.-niveau	Konsequenz
Die intratumorale Infiltrationsdichte mit CD57-positiven Zellen ist kein unabhängiger Einflussfaktor auf das GSÜ	Cox-Regression	0,061	0,0203	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD25-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne Lokalrezidiv	Mann-Whitney U-Test	0,066	0,0207	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD57-positiven Zellen zwischen M+ und M-Patienten	Mann-Whitney U-Test	0,068	0,0211	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumoraler Infiltration mit CD4-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne Metastasierung im gesamten Beobachtungszeitraum	Mann-Whitney U-Test	0,073	0,0216	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne metachrone Metastasierung	Mann-Whitney U-Test	0,079	0,0220	Nullhypothese beibehalten
Die peritumorale Infiltrationsdichte mit CD57-positiven Zellen ist kein unabhängiger Einflussfaktor auf das GSÜ	Cox-Regression	0,093	0,0224	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich des RFÜ zwischen Patienten mit niedriger und hoher intratumoraler Infiltration mit CD8-positiven Zellen	Log-Rank-Test	0,095	0,0228	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich des RFÜ zwischen Patienten mit niedriger und hoher peritumoraler Infiltration mit CD25-positiven Zellen	Log-Rank-Test	0,098	0,0233	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumoraler Infiltration mit CD57-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne Metastasierung im gesamten Beobachtungszeitraum	Mann-Whitney U-Test	0,098	0,0237	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne Metastasierung im gesamten Beobachtungszeitraum	Mann-Whitney U-Test	0,098	0,0241	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumoraler Infiltration mit CD25-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne Lokalrezidiv	Mann-Whitney U-Test	0,112	0,0246	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne Lokalrezidiv	Mann-Whitney U-Test	0,116	0,0250	Nullhypothese beibehalten
Der T-Status ist kein unabhängiger Einflussfaktor auf das GSÜ	Cox-Regression	0,118	0,0254	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD4-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne metachrone Metastasierung	Mann-Whitney U-Test	0,119	0,0259	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumoraler Infiltration mit CD25-positiven Zellen zwischen M+ und M-Patienten	Mann-Whitney U-Test	0,149	0,0263	Nullhypothese beibehalten

Nullhypothese	durchgeführter Test	p-Wert	lokales Sign.-niveau	Konsequenz
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumoraler Infiltration mit CD8-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne Lokalrezidiv	Mann-Whitney U-Test	0,170	0,0267	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD25-positiven Zellen zwischen M+ und M-Patienten	Mann-Whitney U-Test	0,171	0,0272	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumoraler Infiltration mit CD4-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne metachrone Metastasierung	Mann-Whitney U-Test	0,177	0,0276	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumoraler Infiltration mit CD25-positiven Zellen zwischen nodal positiven und negativen Patienten	Mann-Whitney U-Test	0,184	0,0280	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD4-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne Metastasierung im gesamten Beobachtungszeitraum	Mann-Whitney U-Test	0,189	0,0284	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumoraler Infiltration mit CD57-positiven Zellen zwischen Patienten mit T1/2 und T3/4	Mann-Whitney U-Test	0,197	0,0289	Nullhypothese beibehalten
Das Risiko des Auftretens von metachroner Fernmetastasierung bei Patienten mit niedriger und hoher peritumoraler Infiltration mit FoxP3-positiven Zellen ist gleich	Exakter Fisher-Test	0,206	0,0293	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumoraler Infiltration mit CD25-positiven Zellen zwischen Patienten mit low-grade und high-grade-Karzinomen	Mann-Whitney U-Test	0,209	0,0297	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumoraler Infiltration mit CD25-positiven Zellen zwischen Patienten mit T1/2 und T3/4	Mann-Whitney U-Test	0,235	0,0302	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD25-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne Metastasierung im gesamten Beobachtungszeitraum	Mann-Whitney U-Test	0,241	0,0306	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD57-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne metachrone Metastasierung	Mann-Whitney U-Test	0,245	0,0310	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD4-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne Lokalrezidiv	Mann-Whitney U-Test	0,255	0,0315	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumoraler Infiltration mit CD4-positiven Zellen zwischen M+ und M-Patienten	Mann-Whitney U-Test	0,260	0,0319	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumoraler Infiltration mit CD8-positiven Zellen zwischen Patienten mit T1/2 und T3/4	Mann-Whitney U-Test	0,270	0,0323	Nullhypothese beibehalten

Nullhypothese	durchgeführter Test	p-Wert	lokales Sign.-niveau	Konsequenz
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD8-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne Metastasierung im gesamten Beobachtungszeitraum	Mann-Whitney U-Test	0,278	0,0328	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumoraler Infiltration mit CD57-positiven Zellen zwischen Patienten mit low-grade und high-grade-Karzinomen	Mann-Whitney U-Test	0,290	0,0332	Nullhypothese beibehalten
Die Unterscheidung in low-grade oder high-grade ist kein unabhängiger Einflussfaktor auf das GSÜ	Cox-Regression	0,305	0,0336	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD57-positiven Zellen zwischen mit Patienten low-grade und high-grade-Karzinomen	Mann-Whitney U-Test	0,307	0,0341	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich des GSÜ zwischen Patienten mit niedriger und hoher intratumoraler Infiltration mit CD8-positiven Zellen	Log-Rank-Test	0,347	0,0345	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich des RFÜ zwischen Patienten mit niedriger und hoher intratumoraler Infiltration mit CD25-positiven Zellen	Log-Rank-Test	0,367	0,0349	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD4-positiven Zellen zwischen Patienten mit T1/2 und T3/4	Mann-Whitney U-Test	0,368	0,0353	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich des GSÜ zwischen Patienten mit niedriger und hoher intratumoraler Infiltration mit CD57-positiven Zellen	Log-Rank-Test	0,375	0,0358	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumoraler Infiltration mit CD8-positiven Zellen zwischen nodal positiven und negativen Patienten	Mann-Whitney U-Test	0,379	0,0362	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich des GSÜ zwischen Patienten mit niedriger und hoher intratumoraler Infiltration mit CD25-positiven Zellen	Log-Rank-Test	0,382	0,0366	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD57-positiven Zellen zwischen Patienten mit T1/2 und T3/4	Mann-Whitney U-Test	0,386	0,0371	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD8-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne metachrone Metastasierung	Mann-Whitney U-Test	0,434	0,0375	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD25-positiven Zellen zwischen Patienten mit T1/2 und T3/4	Mann-Whitney U-Test	0,453	0,0379	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD8-positiven Zellen zwischen M+ und M-Patienten	Mann-Whitney U-Test	0,455	0,0384	Nullhypothese beibehalten
Die intratumorale Infiltrationsdichte mit CD8-positiven Zellen ist kein unabhängiger Einflussfaktor auf das GSÜ	Cox-Regression	0,460	0,0388	Nullhypothese beibehalten

Nullhypothese	durchgeführter Test	p-Wert	lokales Sign.-niveau	Konsequenz
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich des GSÜ zwischen Patienten mit niedriger und hoher peritumorale Infiltration mit CD57-positiven Zellen	Log-Rank-Test	0,480	0,0392	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD57-positiven Zellen zwischen nodal positiven und negativen Patienten	Mann-Whitney U-Test	0,494	0,0397	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumorale Infiltration mit CD8-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne metachrone Metastasierung	Mann-Whitney U-Test	0,502	0,0401	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumorale Infiltration mit CD8-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne Metastasierung im gesamten Beobachtungszeitraum	Mann-Whitney U-Test	0,503	0,0405	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD4-positiven Zellen zwischen nodal positiven und negativen Patienten	Mann-Whitney U-Test	0,538	0,0409	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD25-positiven Zellen zwischen nodal positiven und negativen Patienten	Mann-Whitney U-Test	0,554	0,0414	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD8-positiven Zellen zwischen Patienten mit T1/2 und T3/4	Mann-Whitney U-Test	0,573	0,0418	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumorale Infiltration mit CD4-positiven Zellen zwischen Patienten mit low-grade und high-grade-Karzinomen	Mann-Whitney U-Test	0,586	0,0422	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD25-positiven Zellen zwischen mit Patienten low-grade und high-grade-Karzinomen	Mann-Whitney U-Test	0,599	0,0427	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich des RFÜ zwischen Patienten mit niedriger und hoher intratumoraler Infiltration mit CD4-positiven Zellen	Log-Rank-Test	0,616	0,0431	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumorale Infiltration mit CD57-positiven Zellen zwischen nodal positiven und negativen Patienten	Mann-Whitney U-Test	0,665	0,0435	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumorale Infiltration mit CD57-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne metachrone Metastasierung	Mann-Whitney U-Test	0,667	0,0440	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD8-positiven Zellen zwischen mit Patienten low-grade und high-grade-Karzinomen	Mann-Whitney U-Test	0,683	0,0444	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumorale Infiltration mit CD4-positiven Zellen zwischen Patienten mit T1/2 und T3/4	Mann-Whitney U-Test	0,686	0,0448	Nullhypothese beibehalten

Nullhypothese	durchgeführter Test	p-Wert	lokales Sign.-niveau	Konsequenz
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD4-positiven Zellen zwischen M+ und M-Patienten	Mann-Whitney U-Test	0,709	0,0453	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD25-positiven Zellen zwischen Patienten mit und ohne metachrone Metastasierung	Mann-Whitney U-Test	0,731	0,0457	Nullhypothese beibehalten
Die peritumorale Infiltrationsdichte mit CD25-positiven Zellen ist kein unabhängiger Einflussfaktor auf das GSÜ	Cox-Regression	0,743	0,0461	Nullhypothese beibehalten
Die intratumorale Infiltrationsdichte mit CD25-positiven Zellen ist kein unabhängiger Einflussfaktor auf das GSÜ	Cox-Regression	0,749	0,0466	Nullhypothese beibehalten
Die peritumorale Infiltrationsdichte mit FoxP3-positiven Zellen ist kein unabhängiger Einflussfaktor auf das GSÜ	Cox-Regression	0,805	0,0470	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumoraler Infiltration mit CD8-positiven Zellen zwischen M+ und M-Patienten	Mann-Whitney U-Test	0,825	0,0474	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumoraler Infiltration mit CD8-positiven Zellen zwischen Patienten mit low-grade und high-grade-Karzinomen	Mann-Whitney U-Test	0,872	0,0478	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich peritumoraler Infiltration mit CD4-positiven Zellen zwischen nodal positiven und negativen Patienten	Mann-Whitney U-Test	0,885	0,0483	Nullhypothese beibehalten
Die peritumorale Infiltrationsdichte mit CD4-positiven Zellen ist kein unabhängiger Einflussfaktor auf das GSÜ	Cox-Regression	0,891	0,0487	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich des GSÜ zwischen Patienten mit niedriger und hoher peritumoraler Infiltration mit CD8-positiven Zellen	Log-Rank-Test	0,938	0,0491	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich intratumoraler Infiltration mit CD8-positiven Zellen zwischen nodal positiven und negativen Patienten	Mann-Whitney U-Test	0,962	0,0496	Nullhypothese beibehalten
Es besteht kein Unterschied hinsichtlich des RFÜ zwischen Patienten mit niedriger und hoher peritumoraler Infiltration mit CD8-positiven Zellen	Log-Rank-Test	0,963	0,0500	Nullhypothese beibehalten

6.3 Datenbank

Tabelle 18

Nr	T	N	s_M	m_M	G	RFÜ	LR	GSÜ	Vst	CD4i	CD4p	CD8i	CD8p	CD25i	CD25p	CD57i	CD57p	FoxP3i	FoxP3p
1	T3	N2	ja	nein	G3	5	ja	8	v	96	248	7	141	25	200	4	16	53	37
2	T2	N0	nein	nein	G2	109	nein	109	I	490	478	95	282	220	212	7	20	284	380
3	T3	N2	nein	ja	G3	9	nein	9	v	96	181	34	104	132	94	3	13	40	11
4	T3	N1	nein	ja	G2	41	ja	48	I	276	234	49	187	194	160	3	13	93	11
5	T2	N0	nein	nein	G2	141	nein	141	I	482	469	102	155	272	320	0	28	345	318
6	T2	N0	nein	nein	G2	92	nein	92	v	195	313	20	156	101	125	22	40	137	94
7	T3	N0	nein	nein	G2	104	nein	104	I	229	489	148	228	294	280	6	13	204	213
8	T2	N1	nein	ja	G2	22	ja	93	I	319	95	65	165	203	203	14	23	145	93
9	T1	N1	nein	nein	G3	103	nein	103	I	608	548	344	296	231	217	19	32	338	403
10	T3	N0	nein	nein	G2	103	nein	103	I	20	323	303	311	162	192	18	57	60	86
11	T3	N1	nein	nein	G2	65	nein	65	v	363	456	93	307	158	202	21	68	149	171
12	T2	N0	nein	nein	G2	146	nein	146	I	481	469	108	138	135	204	6	30	248	268
13	T2	N0	nein	nein	G2	90	nein	90	I	307	129	147	200	150	186	11	39	277	79
14	T2	N0	nein	nein	G2	89	nein	89	I	425	300	399	384	283	283	97	174	224	207
15	T2	N1	nein	nein	G2	14	nein	14	v	215	190	88	219	66	96	5	25	158	154
16	T1	N0	nein	nein	G2	88	nein	88	I	522	85	423	433	274	298	61	113	446	378
17	T2	N0	nein	nein	G2	98	nein	98	I	289	406	130	223	109	98	3	15	287	120
18	T3	N0	nein	nein	G2	97	nein	97	I	369	389	91	287	135	183	10	40	108	108
19	T3	N1	nein	nein	G2	97	nein	97	I	491	409	202	274	230	280	37	110	185	206
20	T2	N0	nein	nein	G2	96	nein	96	I	271	339	88	166	154	213	21	75	188	211

Legende:

s_M synchrone Fernmetastasen
m_M metachrone Fernmetastasen
G Grading
LR Lokalrezidiv
RFÜ rezidivfreies Überleben in Monaten
GSÜ Gesamtüberleben in Monaten
Vst Vitalstatus (I = lebt, v = verstorben)
CD4i mittlere intratumorale Dichte an CD4-positiven Zellen (Zellen / mm²)
CD4p mittlere peritumorale Dichte an CD4-positiven Zellen (Zellen / mm²)

Nr	T	N	s_M	m_M	G	RFÜ	LR	GSÜ	Vst	CD4i	CD4p	CD8i	CD8p	CD25i	CD25p	CD57i	CD57p	FoxP3i	FoxP3p
21	T3	N1	ja	nein	G2	26	nein	26	v	263	206	54	181	59	107	5	7	187	203
22	T3	N2	ja	nein	G3	12	nein	12	v	262	422	203	322	125	51	6	8	104	190
23	T2	N0	nein	nein	G2	39	nein	39	v	222	424	267	216	78	63	30	49	103	109
24	T2	N0	nein	nein	G2	95	nein	95	l	391	555	264	214	200	289	17	34	259	238
25	T3	N2	ja	nein	G2	12	ja	33	v	494	291	37	69	50	33	2	2	101	73
26	T1	N0	nein	nein	G2	95	nein	95	l	359	355	231	181	112	102	3	26	224	200
27	T3	N1	nein	nein	G3	8	nein	8	l	398	464	124	313	104	124	8	19	77	45
28	T3	N1	nein	ja	G3	19	nein	19	v	267	487	315	292	257	232	44	83	57	141
29	T3	N0	nein	nein	G2	94	nein	94	l	338	413	263	424	71	181	20	60	168	149
30	T3	N1	nein	nein	G2	141	nein	141	l	423	459	157	275	235	251	8	27	252	136
31	T4	N2	nein	nein	G2	7	nein	7	v	180	294	233	246	205	227	57	31	75	53
32	T3	N0	nein	nein	G2	93	nein	93	l	331	209	178	201	173	295	26	24	246	260
33	T3	N2	ja	nein	G2	11	nein	11	v	220	380	143	547	255	330	26	75	104	94
34	T3	N1	ja	nein	G2	16	nein	16	v	503	138	229	150	196	104	14	10	194	135
35	T3	N1	nein	ja	G2	87	ja	92	v	136	477	213	298	233	151	12	6	222	143
36	T3	N2	ja	nein	G3	1	nein	1	l	267	478	324	256	127	119	20	23	113	116
37	T2	N0	nein	nein	G2	136	nein	136	l	459	403	301	224	354	239	38	34	208	185
38	T2	N0	nein	nein	G2	91	nein	91	l	514	529	494	594	442	313	59	74	295	247
39	T2	N0	nein	nein	G2	91	nein	91	l	351	567	71	303	216	300	37	103	157	190
40	T3	N1	nein	ja	G2	51	nein	51	v	270	468	113	364	175	218	17	69	238	219

Legende:

s_M synchrone Fernmetastasen

m_M metachrone Fernmetastasen

G Grading

LR Lokalrezidiv

RFÜ rezidivfreies Überleben in Monaten

GSÜ Gesamtüberleben in Monaten

Vst Vitalstatus (l = lebt, v = verstorben)

CD4i mittlere intratumorale Dichte an

CD4p positive Zellen (Zellen / mm²)

CD4i mittlere peritumorale Dichte an CD4-

positiven Zellen (Zellen / mm²)

Nr	T	N	s_M	m_M	G	RFÜ	LR	GSÜ	Vst	CD4i	CD4p	CD8i	CD8p	CD25i	CD25p	CD57i	CD57p	FoxP3i	FoxP3p
41	T2	N0	nein	nein	G2	91	nein	91	I	138	171	283	357	27	79	8	20	221	179
42	T3	N0	nein	nein	G2	8	ja	8	v	38	39	109	299	33	172	13	5	34	59
43	T4	N0	nein	nein	G3	19	nein	21	I	33	13	53	113	194	198	21	9	248	75
44	T2	N0	nein	nein	G2	134	nein	134	I	252	407	190	263	236	273	6	7	210	203
45	T1	N0	nein	nein	G2	87	nein	87	I	145	243	28	151	181	288	5	13	164	222
46	T2	N0	nein	nein	G2	86	nein	86	I	126	174	13	244	80	30	9	4	22	66
47	T3	N1	ja	nein	G2	15	nein	15	I	471	355	166	304	196	108	18	15	144	109
48	T2	N0	nein	nein	G2	86	nein	86	I	448	270	286	304	92	126	25	19	170	117
49	T2	N0	nein	nein	G2	85	nein	85	I	239	251	36	143	157	70	11	13	188	173
50	T2	N0	nein	ja	G2	54	nein	54	v	310	226	133	285	178	207	15	35	210	158
51	T2	N0	nein	nein	G3	83	nein	83	I	106	383	77	280	72	199	5	17	81	229
52	T2	N2	nein	nein	G3	83	nein	83	I	202	270	135	117	155	186	25	46	94	80
53	T1	N0	nein	nein	G1	2	nein	2	v	138	339	434	166	217	317	38	34	145	88
54	T2	N0	ja	nein	G2	10	nein	10	v	56	48	9	121	61	184	4	14	39	52
55	T2	N2	nein	ja	G3	8	nein	8	v	215	189	122	60	188	159	7	41	127	67
56	T2	N0	nein	nein	G2	82	nein	82	I	550	393	184	262	214	273	18	20	102	158
57	T3	N1	ja	nein	G2	6	nein	6	v	280	327	25	106	65	297	14	35	71	73
58	T2	N1	nein	nein	G2	82	nein	82	I	236	938	115	351	45	143	29	21	161	166
59	T2	N0	nein	nein	G2	80	nein	80	I	308	323	581	472	341	341	73	72	512	162
60	T2	N0	nein	nein	G2-3	79	nein	79	I	110	219	140	323	146	266	3	3	69	95

Legende:

s_M synchrone Fernmetastasen

m_M metachrone Fernmetastasen

G Grading

LR Lokalrezidiv

RFÜ rezidivfreies Überleben in Monaten

GSÜ Gesamtüberleben in Monaten

Vst Vitalstatus (I = lebt, v = verstorben)

CD4i mittlere intratumorale Dichte an

CD4-positive Zellen (Zellen / mm²)

CD4p mittlere peritumorale Dichte an CD4-

positiven Zellen (Zellen / mm²)

Nr	T	N	s_M	m_M	G	RFÜ	LR	GSÜ	Vst	CD4i	CD8i	CD25i	CD25p	CD57i	CD57p	FoxP3i	FoxP3p
61	T3	N0	nein	nein	G2	61	nein	61	v	316	342	214	137	18	36	66	88
62	T3	N2	ja	nein	G2	17	nein	17	v	264	202	187	239	28	46	92	65
63	T3	N1	nein	nein	G2	3	nein	3	l	158	426	90	276	9	40	38	97
64	T2	N0	nein	nein	G2	78	nein	78	l	283	398	15	32	18	48	219	255
65	T2	N0	nein	nein	G2-3	77	nein	77	l	259	326	35	99	33	86	133	150
66	T3	N1	nein	ja	G3	42	nein	42	v	34	213	87	195	43	64	59	88
67	T3	N2	ja	nein	G3	59	nein	59	v	326	297	268	228	2	6	82	58
68	T3	N2	nein	ja	G2	28	ja	28	v	279	257	17	34	9	8	107	42
69	T3	N1	ja	nein	G3	50	nein	50	v	172	48	135	146	6	34	199	144
70	T3	N2	nein	ja	G2	30	nein	30	v	263	280	97	70	11	49	197	159
71	T3	N0	nein	nein	G2	74	nein	74	l	489	522	252	296	51	79	220	95
72	T2	N0	nein	nein	G3	70	nein	70	v	255	186	293	295	126	147	120	59
73	T3	N1	ja	nein	G2	13	nein	13	v	204	519	165	113	28	101	71	100
74	T3	N1	nein	nein	G2	70	nein	86	l	332	333	253	225	17	23	186	168
75	T3	N1	nein	nein	G2	0	ja	67	l	186	208	117	223	13	36	210	198
76	T2	N1	nein	nein	G2	69	nein	69	l	297	202	248	251	69	78	230	200
77	T1	N1	nein	nein	G2	48	nein	48	v	151	230	86	216	41	45	266	206
78	T2	N1	nein	nein	G2	65	nein	65	l	303	392	230	279	5	35	164	208
79	T2	N1	nein	nein	G2	63	nein	63	l	386	308	288	284	70	80	236	234
80	T3	N1	nein	nein	G3	58	nein	58	l	245	459	93	127	8	11	169	251

Legende:

s_M synchrone Fernmetastasen

m_M metachrone Fernmetastasen

G Grading

LR Lokalrezidiv

RFÜ rezidivfreies Überleben in Monaten

GSÜ Gesamtüberleben in Monaten

Vst Vitalstatus (l = lebt, v = verstorben)

CD4i mittlere intratumorale Dichte an

CD4-positiven Zellen (Zellen / mm²)

CD4p mittlere peritumorale Dichte an CD4-

positiven Zellen (Zellen / mm²)

7. Danksagung

8. Tabellarischer Lebenslauf