

Aus dem Lehrstuhl für Chirurgie
Prof. Dr. Hans J. Schlitt
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Einfluss der GLUT1+ Lymphozyten auf das Überleben bei kolorektalen Lebermetastasen und
der GLUT1 Positivität auf die Funktionalität des adaptiven Immunsystems

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Eva Stephanie Susanne Griebhammer

2024

Aus dem Lehrstuhl für Chirurgie
Prof. Dr. Hans J. Schlitt
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Einfluss der GLUT1+ Lymphozyten auf das Überleben bei kolorektalen Lebermetastasen und
der GLUT1 Positivität auf die Funktionalität des adaptiven Immunsystems

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Eva Stephanie Susanne Griebhammer

2024

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. S. Brunner

2. Berichterstatter:

PD Dr. K. Evert

Tag der mündlichen Prüfung

08.04.2025

Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....	3
Kolorektales Karzinom.....	3
Epidemiologie und Ätiologie	3
Prognose.....	3
Metastasierungsmuster	4
Lebermetastasen: Behandlung und Prognose	4
Immunsystem.....	5
Angeborenes Immunsystem.....	5
Adaptives Immunsystem	5
Antitumorale Effekte.....	7
Cancer Immunoediting.....	8
Die Rolle CD8 ⁺ Lymphozyten in der Immunosurveillance	9
Glukosetransporter	9
GLUT1	10
GLUT1-Expression im Immunsystem.....	10
GLUT1 bei neoplastischen Geschehen	11
Zielsetzung der Studie	12
Material und Methoden.....	13
Material	13
Geräte.....	13
Verbrauchsmaterial.....	14
Chemikalien	14
Antikörper	17
Software	22
Methoden.....	23
Humane Gewebeproben und Datensammlung	23
Lymphozytengewinnung	23
Färbung für das Fluorescence-Activated Cell Scanning.....	24
Catch-Assay	27
Bestimmung der Zellzahl	28
Immunhistochemie	28
Ergebnisse	31
Patientenkollektivdaten	31
GLUT1 Positivität als Einflussfaktor auf das Patientenüberleben	31

KI67 und GLUT1-Expression	36
GLUT1 ⁺ Zellen im Übergangsgewebe entsprechen eingewanderten Lymphozyten	38
FACS Analyse FACS1	39
Immunzelldifferenzierung	40
Zytotoxizität der TEMRA-Zellen.....	54
Diskussion.....	58
Zusammenfassung.....	62
Abkürzungsverzeichnis	63
Abbildungsverzeichnis.....	67
Tabellenverzeichnis	68
References	69

Einleitung

Kolorektales Karzinom

Epidemiologie und Ätiologie

Das kolorektale Karzinom (CRC) war 2020 weltweit mit insgesamt 1,9 Millionen Neuerkrankungen und 916.000 Todesfällen pro Jahr der dritthäufigste diagnostizierte maligne Tumor bei Männern, bei Frauen sogar der zweithäufigste (1). In Deutschland belegt das kolorektale Karzinom bei Männern sowohl bei der Inzidenz als auch bei der Mortalität Rang drei; Frauen erkranken am zweithäufigsten an einem kolorektalen Karzinom und versterben am dritthäufigsten daran (2). Deutschland gehört mit Australien, Neuseeland sowie den nordamerikanischen und europäischen Staaten zu den Ländern mit der höchsten Anzahl an jährlichen Erstdiagnosen eines CRC; in Afrika als auch in Süd- und Zentralasien ist die Inzidenz um bis zu 90% geringer (3).

Unter den Einflüssen, die das Risiko erhöhen, ein kolorektales Karzinom zu entwickeln, kann zwischen erblichen Komponenten und Umweltfaktoren unterschieden werden (4). Genetische Prädispositionen führen zu einer vielfach gesteigerten Wahrscheinlichkeit, Krebs zu entwickeln, sporadische CRC sind jedoch den familiären an Häufigkeit weit überlegen (5). Zu den allgemeinen Risikofaktoren gehören körperliche Inaktivität, Ernährungsgewohnheiten, Rauchen und Übergewicht (6–8), jedoch korrelieren auch der sozioökonomische Status (9), das Geschlecht und die Rasse (10) mit der Entstehung dieses Malignoms. Auch an einem CRC erkrankte Verwandte korrelieren positiv mit einer erhöhten Inzidenz (5,11).

Prognose

Aufgrund der hohen Inzidenz und der Entwicklung des Karzinoms aus einem Adenom (12) und der daraus resultierenden Möglichkeit einer Früherkennung wurde 2002 die Vorsorgeuntersuchung mittels Koloskopie für Menschen ab 55 Jahren in Deutschland eingeführt (13). Seither konnte die bis dahin steigende Anzahl der jährlichen Neuerkrankungen kontinuierlich vermindert und der prozentuelle Anteil der Karzinome im lokalisierten Stadium bei Erstdiagnose erhöht werden, was zur positiven Entwicklung der Sterblichkeitsrate beitrug (14–16). Im Zeitraum von 2003 bis 2012 verringerte sich das kumulative Sterberisiko bei

Männern um 18%, bei Frauen um 23% (17). 65% der Patienten leben nach fünf Jahren nach Erstdiagnose (18).

Metastasierungsmuster

CRC metastasieren sowohl lymphogen als auch hämatogen. Leber, Lunge, Lymphknoten und Peritoneum sind typische Lokalisationen der Absiedlungen, wobei der häufigste und zumeist erste Manifestationsort von Fernmetastasen die Leber ist (12,19). Bei bis zu 50% der Patienten werden syn- oder metachrone Lebermetastasen entdeckt (20–22). Bis zu 20% der Erkrankten leiden an pulmonalen Absiedlungen (23). Obwohl bei Fernmetastasierung des CRC die 5-Jahresüberlebensrate bei nur 13% liegt (23) und die häufigste Todesursache des Darmkrebs von den hepatischen Absiedlungen ausgeht (21), können Patienten, deren Erkrankung sich ausschließlich auf Leber und/ oder Lunge ausgeweitet hat, weiterhin mit kurativer Intention behandelt werden (23).

Lebermetastasen: Behandlung und Prognose

Bei einer Metastasierung, die auf die Leber beschränkt ist, kann eine kurative Therapie angestrebt werden (24,25). Diese Behandlungsverfahren beinhalten eine Resektion (12) oder eine lokale Ablation der Leberläsionen mittels Radiofrequenzablation (26,27). Jedoch können nur 25% der Patienten mit Lebermetastasen der Gruppe zugeordnet werden, die sich für ein operatives Vorgehen qualifiziert, 3-5% eignen sich für das ablativ Verfahren (26). Die Operation erfolgt primär oder nach neoadjuvanter Therapie (28–31). Bei Inoperabilität stehen verschiedene Optionen zur Verfügung. Die systemische Chemotherapie, lokale Tumorablationsverfahren – ausgenommen der Radiofrequenz- oder Mikrowellenablation (32,33) – wie die Installation von Alkohol und die transarterielle Chemoembolisation (33,34) stellen jedoch ausschließlich palliative Alternativen dar (12). Das mediane Überleben im Stadium IV ohne Möglichkeit einer kurativen Resektion variiert stark in Abhängigkeit der Leberfunktionseinschränkung und liegt zwischen 6-9 und 24-30 Monaten (12).

Bei der Operation in kurativer Intention ist ein Einflussfaktor der Resektionsrand (35,36). Wird beim Entfernen der hepatischen Absiedlung ein mikroskopisch tumorfreier Resektionsrand erreicht, also eine R0-Resektion, so liegt die 5-Jahresüberlebensrate zwischen 42% und 74%

(35–40). Nach zehnjährigem tumorfreien Überleben (17-25%) kann von einer Heilung ausgegangen werden (41–43).

Immunsystem

Angeborenes Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus zwei Komponenten: dem Angeborenen und dem Erworbenen. Die Zellen des angeborenen oder auch unspezifischen Immunsystems erkennen Strukturen, sogenannte pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), die von vielen Pathogenen getragen werden. Das angeborene Immunsystem kann aufgrund dieser allgemeinen Stimulationsauslöser sehr schnell auf eingedrungene Krankheitserreger reagieren. Zu den Vertretern dieses Systems gehören als Immunzellen Monozyten, Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), dendritische Zellen und Granulozyten (12).

Adaptives Immunsystem

Das adaptive bzw. erworbene oder auch spezifische Immunsystem ist durch die Immunabwehr spezifischer Antigene nach erfolgtem Erstkontakt – dem Priming – gekennzeichnet. Es wird in zwei Arme unterteilt, den zellulären und den humoralen. Das adaptive System greift die Pathogene aufgrund der Notwendigkeit des Primings erst vorzögert an. Die Effektorzellen beider Arme können jedoch durch Ausreifung in langlebige Memory Zellen ein immunologisches Gedächtnis ausbilden, so dass bei Reinfektionen mit dem gleichen Krankheitserreger die Immunreaktion prompter erfolgt. Die zellulären Vertreter dieses Systems sind die B- und T-Lymphozyten (12).

T-Zellen sind sowohl an der zellulären als auch an der humoralen Immunantwort beteiligt. Jedoch stellen sie die primären Effektorzellen bei der zellvermittelten Abwehr dar, wohingegen sie bei der humoralen nur aktivierend wirken. Bis zu 80% der im peripheren Blut vorhandenen Lymphozyten sind T-Zellen (12).

CD8⁺ T-Lymphozyten können die Lyse virusinfizierter oder fremder Zellen induzieren und bilden somit die zytotoxische Immunabwehr (12). Diese verfügt über zwei Wege, den Tod der

infizierten oder fremden Zelle herbeizuführen. Nach der Aktivierung durch Antigen präsentierender Zellen (APCs) induzieren $CD8^+$ Lymphozyten mittels Exozytose von Chemokingranula oder vermittelt durch die Interaktion zwischen CD95 und dem Fas Ligand (FasL) die Apoptose der Zielzelle (44). Kurzlebige, aktivierte zytotoxische T-Zellen (CTL) können sich zu langlebigen T-Gedächtniszellen entwickeln (45–47). Gedächtniszellen werden wiederum in Effector Memory T-Zellen (T_{EM} -Zellen) und Central Memory T-Zellen (T_{CM} -Zellen) unterschieden, wobei Effector Memory T-Zellen, die im peripheren Gewebe verweilen, für die zügige gezielte Abwehr von bekannten Erregern bei wiederholter Infektion verantwortlich sind, während Central Memory T-Zellen, die zurück in lymphatische Gewebe migrieren, die Bereitstellung ausreichender T-Lymphozyten bewirken (12).

$CD4^+$ Lymphozyten oder auch T-Helferzellen induzieren die Aktivierung verschiedener Zellreihen des Immunsystems. $CD4^+$ Zellen werden in mehrere Subpopulationen unterschieden: T_H1 -Zellen interagieren mit naiven $CD8^+$ Lymphozyten und triggern diese zur Differenzierung in Effektorzellen der $CD8^+$ Zellreihe, also in CTL (48–53); T_H2 -Zellen erfüllen diese Aufgabe bei B-Lymphozyten (50–53). Unter den weiteren Subpopulationen befinden sich regulatorische T-Zellen (Treg), die für die Inhibition des adaptiven Immunsystems verantwortlich sind und somit überschießende Abwehrreaktionen und autoimmune Prozesse verhindern (54,55).

B-Zellen machen 10-15% der Lymphozyten im peripheren Blut aus. Sie stellen die Effektorzellen der humoralen Immunantwort dar (12), sind aber auch Teil der APCs (56). Als diese produzieren sie nach zweizeitiger Aktivierung spezifische Antikörper, die sie dann sezernieren können. Die Aktivierung erfolgt zuerst durch das Antigen mittels membranständiger Immunglobuline und darauffolgend durch T_H2 -Zellen (50,57). Antigene werden anhand der ausgeschütteten Immunglobuline erkannt und die Antigen-tragenden Pathogene auf einem der folgenden Wege neutralisiert. Antikörper können durch bloße Bindung Pathogene in ihrer Funktionsweise beeinträchtigen, dienen aber auch zur Opsonierung und leiten damit die Phagozytose ein, aktivieren das Komplementsystem oder vermitteln die antikörperabhängige Zytotoxizität. Als Effektorzellen der B-Lymphozyten fungieren die Plasmazellen. Es werden analog zu den T-Lymphozyten Gedächtniszellen ausgebildet (50,58).

Antitumorale Effekte

Neoplastische Zellen besitzen diverse Methoden, sich einer Immunantwort zu entziehen. Zu diesen Strategien gehören, dass sich der Tumor oberflächlich nur minimal von den physiologischen Zellen unterscheidet, er sich mittels Herunterregulierung der MHC-Antigene vor den T-Lymphozyten tarnen kann (59), er den Kontakt zum Immunsystem minimiert, indem er sich mit einer Kapsel umgibt und/ oder ein Milieu generiert, das die Effektorzellen direkt oder indirekt beeinträchtigt (12,60–62).

Die zelluläre Immunantwort gegen Malignome konnte anhand allogener Knochenmarkstransplantationen beobachtet werden. Hier erkennen die Spenderlymphozyten die entarteten Zellen als fremd und entfalten eine antitumorale Wirkung (12), den sogenannten graft-versus-host Effekt. Um autologe T-Lymphozyten dahingehend zu manipulieren, dass diese auch gegen Tumorzellen wirksam sind, werden zwei Ansätze verfolgt. Einerseits soll durch Tumoringpfungen die T-Zellimmunität gesteigert werden, indem intrazelluläre, mutierte Onkogene den Lymphozyten präsentiert werden, zum anderen werden T-Zellen nach in vitro Bearbeitung und Stimulation wieder reimplantiert, so dass die Tumor induzierte T-Zellmanipulation umgangen wird (12,63,64).

Körpereigene – im Gegensatz zu medikamentösen – Antikörper spielen bei der Bekämpfung von Malignomen keine signifikante Rolle. Da Neoplasien dazu neigen, das Immunsystem von einer zellulären zu einer humoralen Antwort zu lenken (65), liegt der Schluss nahe, dass sich Tumore besser gegen Antikörper schützen können. Auch wird die Progression der Erkrankung nicht durch spezifische Antikörper beeinflusst (12).

Unter den Zytokinen befinden sich auch antitumoral wirksame Vertreter. Da erst wenige Zytokine auf ihren Effekt auf die Progression von Krebserkrankungen getestet wurden, ist noch nicht geklärt, wie viele tatsächlich zu dieser Gruppe gehören. IFN α und IL2 werden therapeutisch eingesetzt, aber auch TNF kann suppressiv auf entartete Gewebe wirken (12).

Perforin und Granzym B wirken zudem antikanzerogen (66), indem Granzym B mittels Perforin in die Zielzelle gelangt und dort die Apoptose induziert (67,68). Perforin ist eine notwendige Komponente für den zytotoxischen Effekt der Granzyme (69), wobei Granzym B von diesen Effektormolekülen der CD8⁺ T-Zellen am effektivsten zytotoxisch agiert (70). Somit dienen beide Moleküle als Maß der antikanzerogenen Wirkung der CTLs.

Ein weiteres Zytokin, das mitunter antitumoröse Effekte entfalten kann, ist $\text{INF}\gamma$. Dieses wirkt zum einen immunstimulierend als auch direkt antikanzerogen (71,72). Jedoch ist die Funktion nicht ausschließlich antitumorös. $\text{INF}\gamma$ induziert zudem auch die PD-L1-Expression von Tumorzellen und fördert somit die Immunflucht von Karzinomen (73). Zusätzlich entwickeln Karzinome zur Immunevasion eine Hyposensitivität gegenüber $\text{INF}\gamma$, sodass der antikanzerogene Effekt vermindert wird (71).

Schlussendlich ist die Wirkung von $\text{INF}\gamma$ dosisabhängig. Zu beachten gilt hier, dass der Effekt glockenförmig in Abhängigkeit der Konzentration verläuft. Wird die Dosis des maximalen Effekts überstiegen, so ist eine Wirkungsabnahme zu beobachten. Dies wurde in Studien mit extern zugeführtem $\text{INF}\gamma$ gezeigt (74,75).

Cancer Immunoediting

Gemäß der Cancer Immunoediting Hypothese ist die Interaktion zwischen Immunsystem und Tumor durch drei Phasen geprägt: elimination, equilibrium und escape, zu Deutsch also Unterdrückung, Gleichgewicht und Entkommen (76).

Während der Unterdrückungsphase werden durch Entzündungsreaktionen Immunzellen rekrutiert (76). $\gamma\delta\text{T}$ - und NK-Zellen produzieren $\text{INF}\gamma$ (77) und führen dadurch sowohl zum Tumorzelltod als auch zur gegenseitigen Stimulation und der Ausschüttung weiterer Chemokine. Diese wirken wiederum negativ auf die Angiogeneese und somit zusätzlich antitumoral (78,79). Im weiteren Verlauf werden CD4^+ $\text{T}_\text{H}1$ und CD8^+ Zellen geprimed, so dass sie zu einer spezifischen Immunantwort gegen das neoplastische Gewebe führen. Somit spielen sie die Hauptrolle in der immunologischen Tumorbekämpfung (60).

Im Stadium des Gleichgewichts üben Lymphozyten einen hohen Selektionsdruck auf die entarteten Zellen aus, indem das Immunsystem den Tumor zwar unter Kontrolle halten, aber nicht vernichten kann. Es kommt zu Mutationen der genetisch instabilen neoplastischen Zellen und einem Überleben des malignen Gewebes, das sich so einer Immunantwort entziehen kann (76).

Schlussendlich folgt das Entkommen. Dies beschreibt den Vorgang der unkontrollierten Proliferation entarteter Zellen, die aufgrund des Selektionsdrucks in der vorangegangenen Phase die Merkmale zur Identifizierung durch das Immunsystem verloren haben und somit

nicht mehr dessen Kontrolle unterliegen. Das ungehemmte Tumorwachstum führt zur Krankheitsprogression und zur klinischen Manifestation der Neoplasie (76).

Die Rolle CD8⁺ Lymphozyten in der Immunosurveillance

Tumor infiltrierende T-Lymphozyten, vor allem aber CD8⁺ T_{EM}-Zellen, führen zu einer geringeren Rate an Metastasierungsfürhzeichen wie vaskuläre Emboli oder Tumorinvasion in Lymphbahnen oder Perineuralscheiden (80). Werden CTL und T-Memory-Zellen im Tumorresektat nachgewiesen, nimmt die Wahrscheinlichkeit auf ein Rezidiv des kolorektalen Karzinoms ab (81) und somit besitzen diese einen prognostisch positiven Effekt auf das Patientenüberleben (82,83). Im Gegensatz zu den Ergebnissen beim Primärtumor stellt die Infiltration von CD4⁺, CD8⁺ oder CD45RO⁺ Lymphozyten in den Tumor bei kolorektalen Metastasen keinen prognostisch günstigen Faktor dar. Akkumulieren jedoch diese Zellen um die Metastase im Infiltrationsrand, so überleben die Patienten signifikant länger (84).

Dies wird auch dadurch gefördert, dass Tumor-spezifische T-Zellen langfristig ohne Antigenpräsentation überleben und sich bei erneutem Antigenkontakt aus CD8⁺ T-Memory-Zellen in CD8⁺ T-Effektorzellen differenzieren (85). Die Bedeutung der zytotoxischen Immunantwort wird auch dadurch gestützt, dass das Vorhandensein von CD4⁺ T_H1-Zellen in CRC das tumorfreie Überleben nach primärer Resektion verlängert (86). Somit spielt das adaptive Immunsystem trotz Immunoeditings auch nach der klinischen Manifestation eines Malignoms eine Rolle bei der Tumorkontrolle (81).

Glukosetransporter

Glukosetransporter (GLUT) sind transmembranöse Transportproteine, die die Überführung von Monosacchariden, Polyolen und kleinen Kohlenstoffverbindungen in und aus der Zelle vermitteln (87). Der Transport verläuft mittels erleichterter Diffusion (88,89) entlang des Konzentrationsgefälles.

Die Familie der Glukosetransporter umfasst 14 verschiedene Moleküle. Diese werden in drei Subklassen unterteilt (90) und kommen in eukaryotischen Organismen vor (91). Ihre Gemeinsamkeit besteht im Aufbau der Transporter (92); die einzelnen Vertreter unterscheiden

sich jedoch in den zu befördernden Molekülen, der Lokalisation und/ oder der Affinität zu den Substraten (91). Aufgrund der Bedeutung von Zucker und der Glykolyse für die Energiegewinnung eukaryoter Zellen, wird mindestens ein Subtyp der GLUT-Familie auf jeder menschlichen Zelle exprimiert (91).

GLUT1

GLUT1 ist der Vertreter der GLUT-Familie, der als erstes identifiziert wurde (93) und am besten untersucht ist (91). Er unterstützt nicht nur die Diffusion von Glukose sondern auch von Galaktose und Dehydroascorbinsäure, dem Vorläufermolekül von Vitamin C (89,94,95). Sein Vorkommen ist ubiquitär und sowohl auf Zelloberflächen als auch – wenn auch selten – intrazellulär nachgewiesen (96). Vornehmlich ist der Transporter aber auf Erythrozytenmembranen zu finden (97). Eine wichtige Rolle spielt GLUT1 bei der Energieversorgung des Gehirns (88,98), indem die Blut-Hirn-Schranke durch dieses Transportmolekül überbrückt wird (99). Ihm wird zusammen mit GLUT3 die Aufgabe der basalen Zuckerversorgung zugeschrieben (100).

Die Regulation erfolgt nicht insulinabhängig (100), ist aber durch Insulin beeinflussbar. So führt Insulin zu einer bis zu 2,7-fachen Steigerung der GLUT1-Expression (101,102). Auch Stress, Wachstumshormone (95), Hypoxie (103) und Hypoglykämie (104) gehören zu den Stimuli, die die Aktivität des Transporters beeinflussen.

GLUT1-Expression im Immunsystem

Um eine Immunantwort infolge einer Antigenstimulation zu generieren, benötigen T-Lymphozyten Energie. So ist Adenosintriphosphat (ATP) aus der Glykolyse zur Proliferation und für Effektorfunktionen erforderlich (105). Den limitierenden Schritt dieses Stoffwechselvorgangs stellt dabei der Zuckertransport in das intrazelluläre Kompartiment dar. Deshalb wird die Expression von GLUT1, dem Hauptvertreter der GLUT-Familie auf T-Lymphozyten (106–108), deutlich gesteigert, nachdem die Immunzelle stimuliert wurde (109,110). Eine Hochregulation der Glykolyse – und damit übereinstimmend auch eine erhöhte GLUT1-Expression – resultieren in einer verbesserten Funktion der Effektorzelle und einer erhöhten IFN γ -Sekretion (108). Die GLUT1-Expression nimmt langsam nach einem Peak an

Tag zwei nach Antigenstimulation wieder ab (111). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen sind auch stark GLUT1⁺ T-Lymphozyten identifiziert, die terminal ausdifferenziert sind und eine reduzierte Effektorfunktion zeigen. Diese Zellen neigen zu einer kurzen Überlebensdauer und bilden keine Memory-Zellen, wohingegen bei inhibierter Glykolyse vermehrt T Memory-Zellen entstehen und sich ein antitumoraler Effekt zeigt (112). Diese unterschiedlichen Funde können auf die verschiedenen Zeitpunkte der GLUT1-Positivität nach der Stimulation zurückgeführt werden (108).

GLUT1 bei neoplastischen Geschehen

Maligne Tumore besitzen aufgrund des rapiden Wachstums und der Proliferation einen erhöhten Nährstoffbedarf und Energieumsatz. Um an die erforderlichen Substrate zu gelangen, werden die Angiogenese und die vermehrte Expression von spezifischen Transportmolekülen induziert. GLUT1 kann hierbei den transmembranösen Transport von Zucker für die Glykolyse katalysieren (113).

Die GLUT1-Expression bei neoplastischen Geschehen wurde in mehreren Studien untersucht. Hierbei wurde jedoch zumeist auf die Hochregulation des Glukosetransporters in den entarteten Zellen geachtet. So haben maligne Tumore wie das Pankreaskarzinom, Kolonkarzinom und das Ösophaguskarzinom eine vermehrte Anzahl von GLUT1 auf ihrer Zellmembran exprimiert (114). Bei nicht-kleinzelligen (NSCC) Bronchialkarzinomen und kolorektalen Karzinomen ist das erhöhte Vorkommen von GLUT1 mit einer verminderten Überlebensrate assoziiert (115–118). Dies wird darauf zurückgeführt, dass aggressive Tumore einen höheren Bedarf an Energie haben und somit an Zucker; so ist die GLUT1-Positivität vor allem bei gering differenzierten Tumoren zu beobachten (113). Bei CRC korreliert der Anteil der GLUT1⁺-Zellen an der Tumormasse mit der Aggressivität und der Wahrscheinlichkeit, Lymphknotenmetastasen zu entwickeln (119).

Zielsetzung der Studie

Aufgrund der Fähigkeit des Immunsystems eine antitumorale Wirkung zu erzielen und der Möglichkeit, dass die Expression von GLUT1 durch vermehrte Bereitstellung von Energiesubstraten auf eine erhöhte Aktivität der Zellen schließen lässt, wurde die These formuliert, dass GLUT1⁺ Lymphozyten das Überleben von Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen beeinflussen und dass die GLUT1-Positivität auf die Funktionalität der exprimierenden Zelle einen Effekt ausübt.

Formulierte Ziele der Studie:

- I. Bestimmung des Einflusses der GLUT1 Expression von Tumorumgebung-infiltrierenden Immunzellen auf das Überleben von Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen
- II. Identifizierung und Charakterisierung der GLUT1⁺ Tumorumgebung-infiltrierenden Zellpopulationen
- III. Ermittlung des Einflusses von GLUT1 auf die Funktionalität der Tumorumgebung-infiltrierenden Immunzellen

Material und Methoden

Material

Geräte

BD FACS Canto II	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, U.S.A.
Dampfgerar DGS 800	ROMMELSBACHER Elektrohausgeräte GmbH, Dinkelsbühl
Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Heraeus Multifuge 1S-R	Kendro Laboratory Products GmbH, Osterode
MACS Multi Stand	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MACSmix™ Tube Rotator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Microcentrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg
Milli-Q® Wasseraufbereitungssystem	Merck KGaA, Darmstadt
Neolab Färbekammer	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Research Pipetten; 10, 20, 100, 200, 1000µl	Eppendorf AG, Hamburg
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, U.S.A.
Zählkammer Neubauer improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen

Verbrauchsmaterial

5ml-Röhrchen Flow Cytometry	Sarstedt AG & Co, Nurnbrecht
Cell Culture Cluster; 6 Well, 96 Well	Corning Inc, Corning, U.S.A.
Cellstar Tubes 15ml/50ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Deckgläser 24x24mm, 24x48mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Disposable Scalpel Standard 11	FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5ml, 2ml	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon® Cell Strainer 40µm, 70µm	Corning Inc, Corning, U.S.A.
LS Columns	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Serologische Pipetten 2-50ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Sprizen Discardit II 2ml, 5ml, 10ml	Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, U.S.A.
Universal Fit Pipette Tips 20-1000µl	Corning Inc., Corning, U.S.A.

Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Co. LLC., St. Louis, U.S.A.
ACK Lysing Buffer	Life Technologies GmbH, Darmstadt
A. dest.	Milli-Q® Wasseraufbereitungssystem
Aquatex®	Merck KGaA, Darmstadt
Biocoll Separating Solution	Biochrom GmbH, Berlin

Biotinylated Goat anti Rabbit IgG	abcam® plc, Cambridge, Großbritannien
BSA: Rinderserumalbumin	Sigma Aldrich Co. LLC., St. Louis, U.S.A.
Cell Stimulating Cocktail	eBioscience, Inc., San Diego, U.S.A.
DAB Chromogen	Zytomed Systems, Berlin
DAB Substrate Buffer	Zytomed Systems, Berlin
Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich Co. LLC., St. Louis, U.S.A.
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
FACS Buffer	PBS + 3% FCS
FACS-Zellmedium:	500ml RPMI 1640 Medium + 500µl 2-Mercaptoethanol + 50ml FCS + 5ml P/S
FCS: Fötales Kälberserum	Biochrom GmbH, Berlin
Fixable Viability Dye eFluor™ 506	eBioscience, Inc., San Diego, U.S.A.
Fixation/Permeabilization Concentrate	eBioscience, Inc., San Diego, U.S.A.
Fixation/Permeabilization Diluent	eBioscience, Inc., San Diego, U.S.A.
Flow Cytometry Fixation Buffer	R&D Systems, Inc., Minneapolis, U.S.A.
Flow Cytometry Permeabilization Wash Buffer	R&D Systems, Inc., Minneapolis, U.S.A.
Fluorescence Mounting Medium	Dako Deutschland GmbH, Hambur
HBSS: Hank's balanced Salt Solution	Life Technologies GmbH, Darmstadt
HIER Citrat Buffer pH 6,0 (10X)	Zytomed Systems GmbH, Berlin
HIER T-EDTA pH 9,0 (10X)	Zytomed Systems GmbH, Berlin
Kiovig	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim

MACS-Buffer (10X):	0,37g EDTA + 2,5g BSA + 500ml PBS
NucBlue® Fixed Cell Stain Ready Probes reagent	Life Technologies Corporation, Eugene, U.S.A.
P/S	Life Technologies GmbH, Darmstadt
PBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma Aldrich Co. LLC., St. Louis, U.S.A.
Percoll: Percoll™	GE Healthcare Life Science, Marlborough, U.S.A.
Permeabilization Buffer (10X)	eBioscience, Inc., San Diego, U.S.A.
Roti®-Histol	Carl Roth GmbH + Co. K.G., Karlsruhe
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Streptavidin peroxidase ready to use	abcam® plc, Cambridge, Großbritannien
TBS (10X):	80g NaCl + 24,4g Tris Base + 800ml A. Dest.
Trypanblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
T-TBS	100ml TBS (10X) + 900ml A. Dest. + 1ml TWEEN® 20
TRIS-EDTA	Zytomed Systems, Berlin
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, U.S.A.
VE-H ₂ O	Universitätsklinikum Regensburg
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Weigert's iron hematoxylin solution	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, U.S.A.
XVivo™ 20	Lonza Group AG, Basel, Schweiz

Ziegenserum

Sigma Aldrich Co. LLC., St. Louis,
U.S.A.

Antikörper

Antigen	Konjugat	Verwendung	Hersteller	Nummer
GLUT1	APC	FACS	R&D Systems, Inc., Minneapolis, U.S.A.	FAB1418A
GLUT1	PE	FACS, Catch Assay, MACS	R&D Systems, Inc., Minneapolis, U.S.A.	FAB1418P
CD3	PerCP Cy5.5	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-097- 582
CD4	PacBlue	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-094- 153
CD4	PerCP	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-094- 963
CD8	APC Vio770	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-096- 561
CD11b	APC Vio770	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-096- 834
CD11c	PacBlue	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-099- 716
CD14	PacBlue	FACS	eBioscience, Inc., San Diego, U.S.A.	48-0149-41

Antigen	Konjugat	Verwendung	Hersteller	Nummer
CD16	APC Vio770	FACS	eBioscience, Inc., San Diego, U.S.A.	47-0168-41
CD19	APC Vio770	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-098- 073
CD19	PE Cy7	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-098- 071
CD24	PacBlue	FACS	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, U.S.A	562789
CD25	APC Vio770	FACS	eBioscience, Inc., San Diego, U.S.A.	47-0259-41
CD27	FITC	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-104- 891
CD28	APC	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-099- 191
CD38	APC	FACS	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, U.S.A	560980
CD45	VioGreen	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-096- 906
CD45RA	PE Cy7	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-098- 189
CD45RA	PerCP Cy5.5	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-097- 693

Antigen	Konjugat	Verwendung	Hersteller	Nummer
CD45RO	APC	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-099-395
CD56	APC	FACS	Beckman Coulter, Brea, U.S.A.	IM2474
CD57	PE Cy7	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-104-223
CD62L	FITC	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-091-757
CD64	FITC	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-097-069
CD107A	PacBlue	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-095-520
CD123	FITC	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-098-886
CD127	PE Cy7	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-099-761
IgM	PerCP Cy5.5	FACS	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, U.S.A	561285
IgD	PE Cy7	FACS	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, U.S.A	561314
HLADR	FITC	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-098-176

Antigen	Konjugat	Verwendung	Hersteller	Nummer
HLADR	PerCP Cy5.5	FACS	eBioscience, Inc., San Diego, U.S.A.	46-9952-41
TCR ab	FITC	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-098- 690
TCR $\gamma\delta$	APC	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-099- 393
BDCA2	PE Cy7	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-106- 392
Lineage: CD3, CD14, CD19, CD20, CD56	APC	FACS	eBioscience, Inc., San Diego, U.S.A.	22-7776-72
IFN γ	PE Cy7	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-096- 752
Ganzyme B	APC	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-101- 349
Perforin	APC	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-096- 569
IL-33	APC	FACS	R&D Systems, Inc., Minneapolis, U.S.A.	IC3625A
FasL	APC	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-099- 738
Foxp3	APC	FACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-098- 121

Antigen	Konjugat	Verwendung	Hersteller	Nummer
GLUT1		Immunhistologie	abcam® plc, Cambridge, Großbritannien	ab115730
CD8		Immunhistologie	abcam® plc, Cambridge, Großbritannien	ab17147
KI67		Immunhistologie	abcam® plc, Cambridge, Großbritannien	ab16667
Goat anti rabbit	Cy3	IH Doppelfärbung	Dianova GmbH, Hamburg	111-165- 045
Goat anti mouse	Cy2	IH Doppelfärbung	Dianova GmbH, Hamburg	115-225- 146
TNF-α Secretion Assay - Detection Kit	APC	Catch Assay	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-091- 267
CD3	APC H7	Catch Assay	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, U.S.A	560176
CD4	PerCP Cy5.5	Catch Assay	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, U.S.A	560650
CD8	v450	Catch Assay	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, U.S.A	560347
CD8 ⁺ T Cell Isolation Kit, human		MACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-096- 495

Anti-PE Microbeads		MACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach	130-048- 801
-----------------------	--	------	---	-----------------

Tabelle 1: verwendete Antikörper

Software

Citavi v5 und v6	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
FlowJoV 10.0	TreeStar Inc., Ashland, U.S.A.
GraphPad Prism 7	GraphPad Software, La Jolla, U.S.A.
IBM SPSS Statistics v24, v29	IBM Corp., Armonk, U.S.A.
Image J v1.50	National Institutes of Health, Bethesda, U.S.A.
Microsoft Office 2007	Microsoft Corp., Redmond, U.S.A.

Methoden

Humane Gewebeproben und Datensammlung

Um anhand der histologischen Untersuchungen eine relevante Aussage treffen zu können, wurde auf einen Patientenpool des Universitätsklinikums Regensburg (UKR) mit der Diagnose kolorektale Lebermetastasen zurückgegriffen. Die mit kurativer Intention durchgeführten Metastasenresektionen fanden zwischen Januar 2004 und Februar 2011 am UKR statt, die Diagnose wurde postoperativ durch die Pathologie des UKR gesichert. Es wurden auf GLUT1 immunhistochemisch (IHC) gefärbte Präparate ausgewertet und auf Materialblöcke derselben Patienten für weitere IHC Färbungen zurückgegriffen. So konnten 194 Patienten in die Studie eingeschlossen werden. Überlebensdaten standen durch die klinikinterne Patientendatenbank ergänzt durch Daten aus dem Tumorzentrum Ostbayern zur Verfügung.

Für die Experimente mit frischen Gewebeproben wurde Operationsmaterial von Metastasenresektionen – sowohl atypischer als auch Leberteil- und Majorresektionen – gewonnen. Die Patienten willigten hierzu schriftlich ein, nachdem sie mindestens 24 Stunden vor Operationsbeginn durch einen Viszeralchirurgen des UKR aufgeklärt worden waren. Dies wurde von der Ethikkommission der Universität Regensburg genehmigt (12-101-0009). Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Resektate in das pathologische Institut gebracht. Hier wurden Proben aus Tumor (Tu), gesundem Lebergewebe (Sd) und direkt an den Tumor angrenzendem Lebergewebe (Im) durch einen Pathologen geschnitten. Diese Gewebestücke wurden auf Eis in das chirurgische Labor transportiert und direkt im Anschluss separat bearbeitet. So konnte Material von 25 Metastasenresektionen gewonnen werden. Auf die Aufarbeitung und den genauen Experimentenablauf wird im Abschnitt der Methodik eingegangen.

Lymphozytengewinnung

Die frische Gewebeprobe des OP-Resektats wurde mit Hilfe eines Spritzenstempels einer 5 ml-Spritze durch einen Cell Strainer mit einer Porengröße von 70 µm in einen 50 ml Falcon gedrückt. Intermittierend wurde mit 10 ml HBSS gespült. Die Suspension wurde dann bei 4 °C fünfminütig bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Die Erythrozyten wurden mittels 1 ml ACK Lysing Buffer lysiert. Der Lysevorgang wurde nach 1,5 Minuten mit

9 ml HBSS gestoppt und die Suspension wie zuvor zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 10 ml HBSS überführt und durch einen Falconfilter mit einer Porengröße von 40 µm pipettiert. Nach erneutem Zentrifugieren für fünf Minuten bei 4 °C und 1500 rpm und Abschütten des Überstandes wurde das Pellet in 10 ml 40%-igen Percoll bestehend aus Percoll und Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) resuspendiert und langsam auf 5 ml 100%-igen Percoll in einen 15 ml Falcon pipettiert, so dass es zu keiner Phasenvermischung kam. Nach zwanzigminütigem Zentrifugieren bei Raumtemperatur und 2400 rpm ohne Bremse konnten die Lymphozyten aus der Interphase abpipettiert werden.

Färbung für das Fluorescence-Activated Cell Scanning

Extrazelluläre Färbung für das Fluorescence-Activated Cell Scanning

Da die Lymphozytenzahl in vorangegangenen Experimenten die Werte von 10^7 nicht übertraf, wurde auf das Ermitteln der Zellzahl vor der Färbung verzichtet. Die Angaben zur Durchführung der Färbung für das Fluorescence-Activated Cell Scanning (FACS-Färbung) gelten für eine Zellzahl bis 10^7 .

Die gewonnenen Lymphozyten wurden gemäß der Anzahl der Färbepanels auf FACS-Röhrchen aufgeteilt. Die Lösungen wurden bei 4 °C und 1500 rpm für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Die Zellen wurden mit 1 ml MACS Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Hierauf folgte die extrazelluläre Färbung der Zellen, indem ein Mastermix aus den zu verwendenden Antikörpern hergestellt wurde und dann dieser auf den Boden der FACS-Röhrchen pipettiert wurde. Die Lymphozyten wurden mit den Antikörpern 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Danach erfolgte ein erneuter Waschgang wie zuvor mit anschließendem Zentrifugieren und Wegkippen des Überstands. Die Fixation wurde durch Zugabe von 1 ml Flow Cytometry Fixation Buffer und einer Inkubation von zehn Minuten bei Raumtemperatur erreicht. Hiernach wurde ein weiterer Waschgang mit MACS Puffer jedoch mit 0,5 ml pro Tube mit darauffolgendem Zentrifugieren und Abgießen des Überstands durchgeführt. Der Rückstand konnte dann innerhalb von sieben Tagen am FACS Canto II analysiert werden.

Intrazelluläre FACS-Färbung

Bei Panels mit intrazellulären Färbungen wurden eingefrorene Zellen verwendet. Diese wurden bei 37 °C in einem Wasserbad aufgetaut und dann stimuliert. Hierzu wurden in ein Well einer 6-Well-Platte 6 ml Primärzellmedium und 12 µl Cell Stimulating Cocktail zusammen mit den Zellen gegeben. Die Inkubationszeit belief sich auf drei bis vier Stunden bei 37 °C. Die Zellen konnten mittels Spatel vorsichtig vom Boden gelöst und in FACS-Tubes überführt werden. Diese wurden zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, 4 °C) und anschließend der Überstand verworfen. Nach einem Waschgang mit MACS Puffer erfolgte die extrazelluläre Färbung wie oben beschrieben. Die Zellen wurden wie bei der extrazellulären Färbung fixiert – ausgenommen der Panels mit Foxp3-Färbung, bei denen das Fixieren mit 1 ml eines Gemischs aus $\frac{3}{4}$ Fixation/ Permeabilization Diluent und $\frac{1}{4}$ Fixation/ Permeabilization Concentrate durchgeführt wurde. Nach dem Fixieren, dem anschließenden Zentrifugieren (1500 rpm, 5 min, 4 °C) und dem Wegkippen des Überstands wurden die Zellen mit 1,5 ml Flow Cytometry Permeabilization Wash Buffer bzw. mit einer Lösung aus 1/10 Permeabilization Buffer (10X) + 9/10 A. dest. bei Färbungen mit Foxp3-Antikörpern gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugieren und Abgießen des Überstands erfolgte die intrazelluläre Färbung mit den jeweiligen Antikörpern, die auf den Boden des FACS-Röhrchens pipettiert wurden. Die Inkubationszeit bei 4 °C betrug 20 Minuten. Hiernach erfolgte wie bei der extrazellulären FACS-Färbung ein letzter Waschgang. Der Rückstand, der nach dem Pelletieren (1500 rpm, 5 min, 4 °C) und Verwerfen des Überstands übrigblieb, konnte innerhalb von sieben Tagen am FACS Canto II analysiert werden.

	FACS 2				FACS 3				FACS 4			
	Tube I	Tube II	Tube III	Tube IV	Tube V	Tube VI	Tube VII	Tube VIII	Tube I	Tube II	Tube III	Tube IV
CD3	x	x	x	x	x	x			x	x		
CD4		x	x	x	x	x						
CD8		x	x	x	x							
CD11b								x				x
CD11c								x				
CD14	x											
CD16	x											
CD19	x											
CD24												
CD25						x						
CD27			x									
CD28			x									
CD38												
CD45	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x
CD45RA				x	x				x	x		
CD45RO				x					x			
CD56												
CD57	x		x									
CD62L					x	x			x	x		x
CD64	x											
CD107a									x	x		x
CD123								x				
CD127						x			x	x		
GLUT1	x	x	x	x	x	x		x	x	x		x
IgM												
IgD							x					
HLADR				x			x					
TCR αβ		x										
TCR γδ		x										
B220												
Lineage:												
CD3, CD14,								x				
CD19, CD20,												
CD56												
INFγ									x	x		
Granzyme B									x			
Perforin												
IL33										x		
FasL												
Foxp3						x						x

Tabelle 2: Übersicht der FACS-Panels mit extrazellulären und intrazellulären Antikörpern (getrennt durch die waagrechte Linie)

Catch-Assay

Die Lymphozyten wurden hierfür mittels Biocoll anstatt Percoll isoliert, weswegen auch kein ACK Lysing Buffer eingesetzt wurde. Ansonsten wurde die Zellisolation nach dem Protokoll wie oben beschrieben durchgeführt.

Die isolierten Lymphozyten wurden auf zwei 15 ml-Falcons aufgeteilt, Falcon 1 für das Catch Assay, Falcon 2 für die FMO TNF α / Isotypenkontrolle. In die 15 ml-Röhrchen wurde jeweils 1 ml X-Vivo Medium zugegeben. Anschließend wurde die Suspension für fünf Minuten bei 1500 rpm und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden mit jeweils 100 μ l pro Falcon einer Lösung aus 1200 μ l MACS Puffer und 20 μ l Kiovig blockiert. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten bei Raumtemperatur wurde 1 ml MACS Puffer zugegeben, bevor ein weiterer Zentrifugenzyklus durchgeführt und der Überstand wieder weggekippt wurde. Die FMO TNF α / Isotypenkontrolle wurde in 100 μ l MACS Puffer resuspendiert und auf 4 °C gekühlt zur Seite gestellt. Die Zellen für das Catch Assay wurden mit 90 μ l/ 10⁶ Zellen X-Vivo Medium, das auf 4 °C gekühlt war, und 10 μ l/ 10⁶ Zellen TNF α Catch Reagent versetzt. Die Inkubation erfolgte für fünf Minuten auf Eis. Hiernach wurden 900 μ l/ 10⁶ Zellen X-Vivo Medium, das auf 37 °C erwärmt worden war, zugegeben und die Suspension für 45 Minuten bei 37 °C mit Rotation inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 1 ml MACS Puffer versetzt und zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, 4 °C). Nach Abschütten des Überstandes wurden zu den Lymphozyten 90 μ l/ 10⁶ Zellen MACS Puffer und 10 μ l/ 10⁶ Zellen TNF α Detection Antikörper pipettiert und die Suspension für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Es wurde erneut abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 100 μ l MACS Puffer in ein Well einer 96-Well-Platte überführt. In ein zweites Well wurde die FMO TNF α / Isotypenkontrolle pipettiert. Ein erneuter Zentrifugenzyklus (400 g, 5 min) als auch das Verwerfen des Überstandes wurden durchgeführt. Es wurden 500 μ l der 1:1000 in PBS verdünnten Fixable Viability Dye zugegeben. Nach fünfzehnminütiger Inkubation bei 4 °C erfolgten zwei Waschgänge mit 1 ml MACS Puffer, wobei der Überstand jeweils nach dem Zentrifugieren (400 g, 5 min) verworfen wurde. Nun erfolgte die Zellfärbung mittels Mastermix bestehend aus 300 μ l FACS Puffer und jeweils 12 μ l der Antikörper Anti-CD4 PerCP Cy 5.5, Anti-CD8 V450 und Anti-CD3 APC H7, von dem 100 μ l pro Well zugegeben wurde. Zusätzlich wurde die Probe 1 für das Catch Assay mit 10 μ l Anti-GLUT1 PE-Antikörper und die Probe 2 für die FMO TNF α / Isotypenkontrolle mit 10 μ l Isotypen-Kontrolle IgG versetzt. Nach fünfzehnminütiger Inkubation auf Eis wurden in beide Wells 100 μ l MACS Puffer zugegeben, die Suspensionen abzentrifugiert, der

Überstand weggekippt und die Pellets in MACS Puffer aufgenommen und in FACS Röhrchen überführt. Die Analyse mittels FACS Canto II erfolgte direkt im Anschluss.

Bestimmung der Zellzahl

Zur Ermittlung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gemischt, sodass der Verdünnungsfaktor 2 entsprach. 10 µl dieser Lösung wurden auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen und die Zellen der vier Eckquadrate ausgezählt.

Die Zellzahl wurde anhand folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{gezählte Zellen}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbung

Die Entparaffinierung der Gewebeschnitte erfolgte durch das zweimalige zehnminütige Bad in Roti®-Histol. Daraufhin wurden Bäder in einer absteigenden Alkoholreihe durchgeführt mit jeweils zwei fünfminütigen Bädern in 99%-igen Ethanol (EtOH) sowie in 96%-igen Ethanol und jeweils einem Bad für die gleiche Dauer in 90%-igen und in 70%-igen EtOH. Die Schnitte wurden mit vollentionisiertem Wasser (VE-H₂O) für fünf Minuten gewaschen. Die Antigendemaskierung wurde mittels HIER Citrat 1X, welches zehn Minuten im Garer ohne Objektträger, danach 20 Minuten mit Objektträger gekocht wurde, erreicht. Nach dreißigminütigem Abkühlen wurden die Schnitte erst mit Aqua destillata (A. dest.) für fünf Minuten gewaschen. Anschließend wurde die endogene Peroxidase durch 0,3%-iges Wasserstoffperoxid mit A. dest. als Verdünnungslösung für zehn Minuten blockiert. Darauf folgten Waschgänge mit A. dest. und PBS für jeweils fünf Minuten. Die folgenden Schritte wurden in einer Feuchtkammer vollzogen. Zur Blockierung wurde fünfprozentiges Goatserum mit PBS als Verdünnungslösung auf die Gewebeflächen pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurde die Blockierung abgeklopft und der Primärantikörper gegen KI67 in einer Verdünnung von 1:100 aufgetragen, wobei einprozentiges Goatserum als Verdünnungslösung diente. Die Gewebeschnitte wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen für je fünf Minuten in PBS.

Hiernach wurde der Sekundärantikörper Biotinylated Goat anti Rabbit IgG in einer Feuchtkammer aufpipettiert und die Schnitte für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Erneute, dreimalige Waschgänge für je fünf Minuten mit PBS wurden durchgeführt und anschließend der Tertiärantikörper Streptavidin peroxidase aufgetragen. Die Inkubation und das darauffolgende Waschen erfolgten analog zum Sekundärantikörper. Zur eigentlichen Färbung wurde eine Lösung aus 50 µl DAB Chromogen und 1 ml DAB Substrate Buffer hergestellt, von der jeweils 150 µl auf einen Objektträger pipettiert wurden. Je nach Färbungsintensität wurde die Reaktion mit Leitungswasser nach spätestens sieben Minuten gestoppt. Hierauf folgte das Gegenfärben mit Hämalaun für zehn Sekunden, das Abspülen mit VE-H₂O und das zehnminütige Bad in Leitungswasser. Zum Schluss wurden die Gewebeschnitte mit Aquatex und Deckgläsern eingedeckelt.

Doppelimmunfluoreszenzfärbung CD8/ GLUT1

Die Entparaffinierung, die absteigende Alkoholreihe und das Waschen mit VE-H₂O wurden wie bei der immunhistochemischen Färbung durchgeführt. Die Antigendemaskierung erfolgte mittels TRIS-EDTA, welches 30 Minuten im Garer ohne Objektträger, danach 20 Minuten mit Objektträger gekocht wurde. Nach dreißigminütigem Auskühlen wurden die Schnitte mit A. dest. und danach mit Tris(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid, das mit TWEEN® versetzt wurde, (T-TBS) für fünf Minuten gewaschen. Die Gewebeflächen wurden auf den Objektträgern mit einem ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen umrandet. Die folgenden Schritte wurden in einer Feuchtkammer vollzogen. Zur Blockierung wurde fünfprozentiges Goatserum auf die Gewebeflächen pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurde die Blockierung abgeklopft und der Primärantikörper gegen GLUT1 in einer Verdünnung von 1:750 aufgetragen, wobei einprozentiges Goatserum als Verdünnungslösung diente. Die Gewebeschnitte wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Es erfolgte ein dreimaliges Waschen mit T-TBS für jeweils fünf Minuten. Alle folgenden Schritte wurden soweit möglich im Dunkeln durchgeführt. Der Sekundärantikörper Goat-anti-rabbit Cy3 wurde in einer Verdünnung von 1:200 auf das Gewebe in einer Feuchtkammer aufgetragen und die Schnitte daraufhin für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden erneut drei Waschgänge mit T-TBS für jeweils fünf Minuten durchgeführt. Hiernach folgte das Applizieren des zweiten Primärantikörpers gegen CD8 in einer Verdünnung von 1:50 wiederum in einer Feuchtkammer. Die Inkubationsdauer war erneut über Nacht und bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen in T-TBS für jeweils fünf Minuten wurde der Sekundärantikörper Goat-anti-mouse

Cy2 aufgetragen und die Gewebeschnitte bei Raumtemperatur eine Stunde lang inkubiert. Wiederum folgten drei Waschgänge für jeweils fünf Minuten in T-TBS. Mit DAPI (2Trpf/ 1ml PBS) wurden die Zellkerne gefärbt. Dafür wurde das verdünnte DAPI auf die Schnitte pipettiert und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde ein Waschgang für fünf Minuten in VE-H₂O vollzogen. Die Gewebeschnitte wurden mit Dako Fluorescent Mounting Medium und Deckgläsern eingedeckelt und für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4 °C im Dunkeln. Bilder wurden am Fluoreszenzmikroskop in einer 40-fachen Vergrößerung mit entsprechenden Fluoreszenzfiltern angefertigt. Die Zellkerne fluoreszierten blau, CD8 grün und GLUT1 orange.

Ergebnisse

Patientenkollektivdaten

In die Studie konnten im Zeitraum von Januar 2004 bis Februar 2011 194 Patienten – davon 81 (41,8%) Frauen und 113 (58,2%) Männer – eingeschlossen werden. Das mittlere Alter zum Operationszeitpunkt betrug 60 ± 11 Jahre. Bei elf (5,7%) Studienteilnehmern wurden mehr als eine Metastasenresektion durchgeführt. Der Primarius war in 117 (60,3%) Fällen ein Kolonkarzinom, in 77 (39,7%) ein Rektumkarzinom. 86 (44,3%) Mal wurden synchrone Lebermetastasen festgestellt, 108 (55,7%) Mal metachrone. Die Leberabsiedlungen waren bei 76 (39,2%) Patienten singular und bei 118 (60,8%) Patienten multipel. Ein Rezidiv zeigte sich in 53 Fällen (27,3%). 81 (41,8%) Patienten erhielten eine Chemotherapie. Das mediane Überleben belief sich postoperativ auf 48 ± 6 Monate.

GLUT1 Positivität als Einflussfaktor auf das Patientenüberleben

Von allen 194 Patienten aus der Datenbank wurden Schnitte auf GLUT1 gefärbt. Es zeigten sich unterschiedliche Expressionsintensitäten für den Tumor (Tu), den Infiltrationsrand (Im) und das Lebergewebe (Sd).

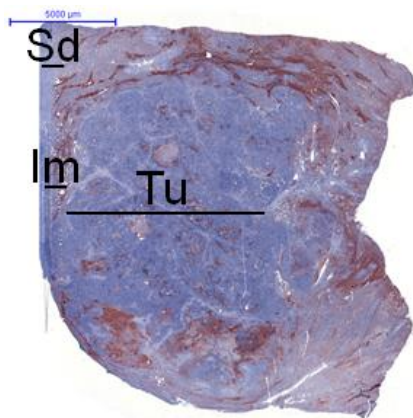


Abbildung 1: Darstellung der Resektatabschnitte Tumor (Tu), Infiltrationsrand (Im) und Lebergewebe (Sd)

Die Expressionsintensität der drei verschiedenen Gebiete wurde semiquantitativ den Kategorien „high“ und „low“ zugeordnet. Im Tumor wurde in 49,5% der Fälle GLUT1 stark und in 50,5% der Fälle schwach exprimiert, im Infiltrationsrand lag der Anteil der hohen

Expressionsintensität bei 60,8% und die niedrige bei 39,1% und im Lebergewebe lag die Verteilung hoch zu niedrig bei 51,1% zu 48,9%.

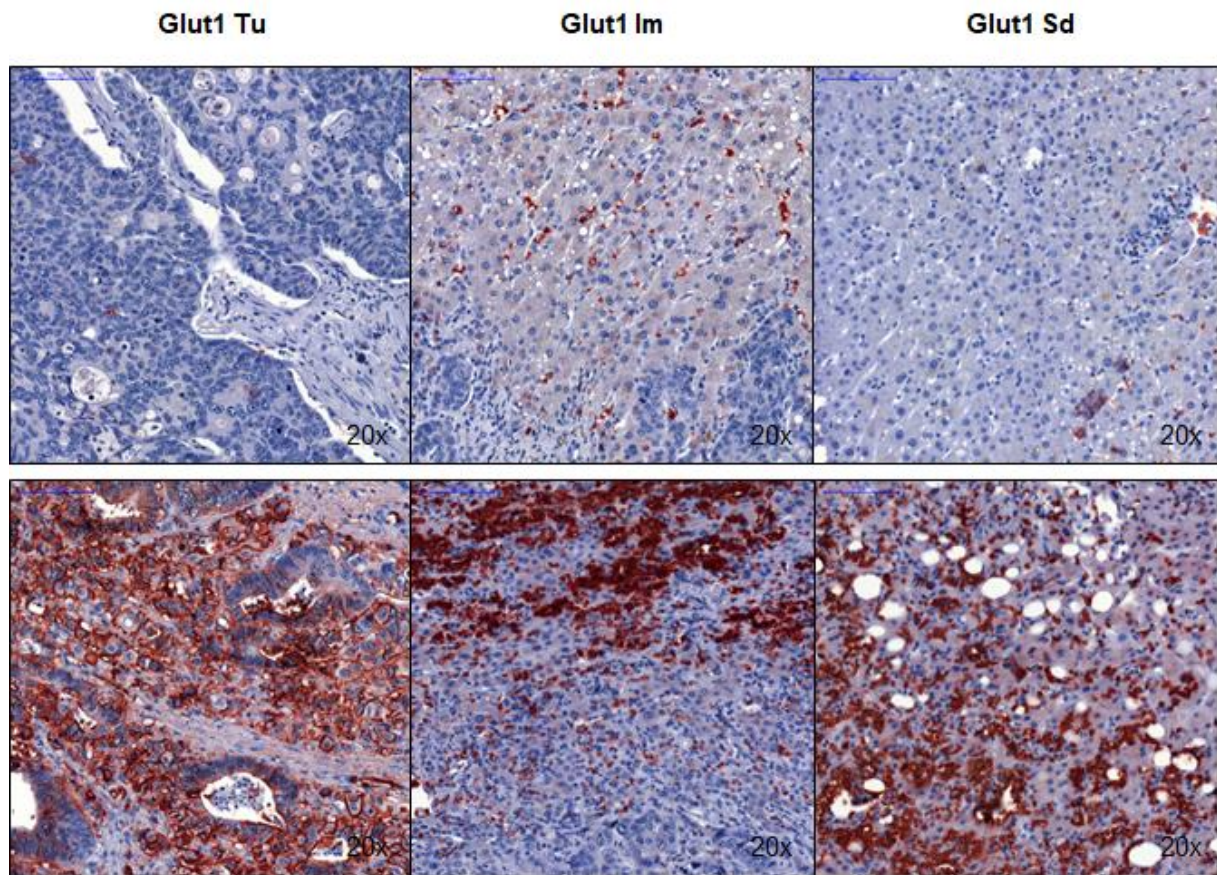


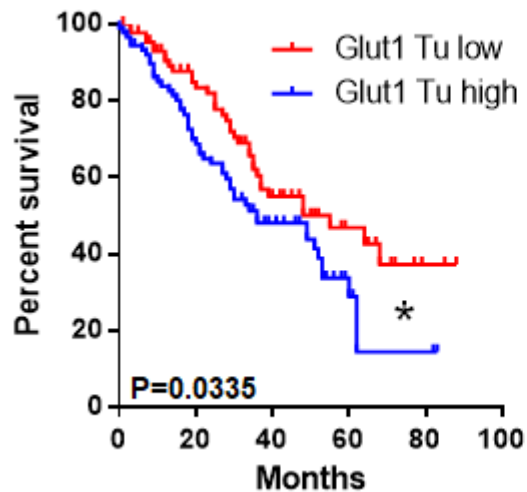
Abbildung 2: Immunhistochemische Färbung der GLUT1 positiven Zellen (20x Vergrößerung); oben: GLUT1 low, unten: GLUT1 high

Wird das Patientenüberleben in Abhängigkeit der GLUT1-Positivität der verschiedenen Gewebelokalisationen betrachtet, so ergibt sich ein signifikanter Überlebensvorteil für die Gruppen des GLUT1⁻ Tumorgewebes (GLUT1 Tu low) gegenüber der des GLUT1⁺ Tumorgewebes ($p = 0.0335$) und des stark GLUT1⁺ Infiltrationsrands (GLUT1 Im high) gegenüber der des GLUT1⁻ Infiltrationsrands ($p = 0.0105$).

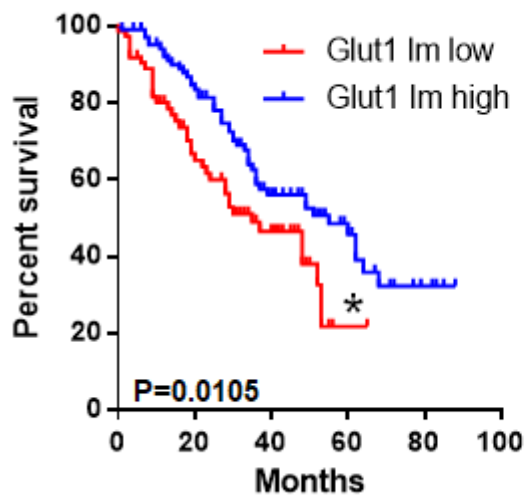
In den Subgruppenpopulationen, die eine adjuvante Chemotherapie respektive keine Chemotherapie durchliefen, wirkte sich die tumorale GLUT1-Expression nur bei Patienten ohne adjuvante Behandlung signifikant auf das Überleben aus. In der Patientengruppe, der keine Chemotherapie zuteil wurde, wies die Population mit geringer GLUT1-Expression im Tumorgewebe ein längeres mittleres Überleben auf als die Population mit hoher tumoraler GLUT1-Expression ($p = 0.0234$). In der Patientengruppe, die eine adjuvante Chemotherapie

durchliefen, konnte kein Überlebensunterschied in Abhängigkeit der GLUT1-Expression der Lebermetastasen festgestellt werden.

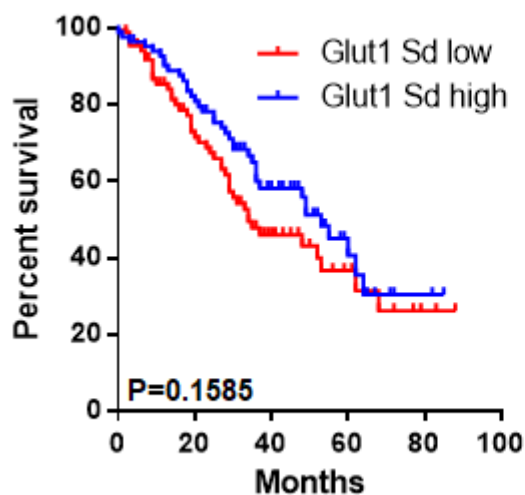
Im Infiltrationsrand stellte eine starke GLUT1-Expression bei singulären Metastasen einen Überlebensvorteil dar ($p = 0.0007$). Hierbei verlängerte sich das mittlere Überleben der GLUT1⁺ Gruppe gegenüber der GLUT1⁻ Gruppe um 34 ± 1 Monate. Bei multiplen Metastasen konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden.



	Median Survival $\pm$ SEM (months)
Glut1 Tu low	55 ± 13
Glut1 Tu high	36 ± 9
Total Survival	48 ± 6

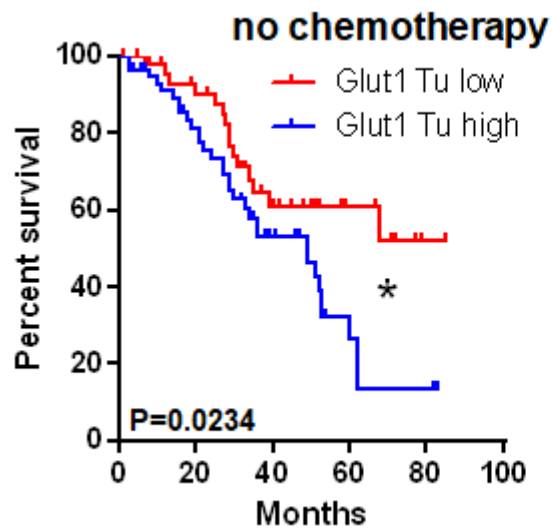


	Median Survival $\pm$ SEM (months)
Glut1 Im low	35 ± 7
Glut1 Im high	55 ± 8
Total Survival	48 ± 6



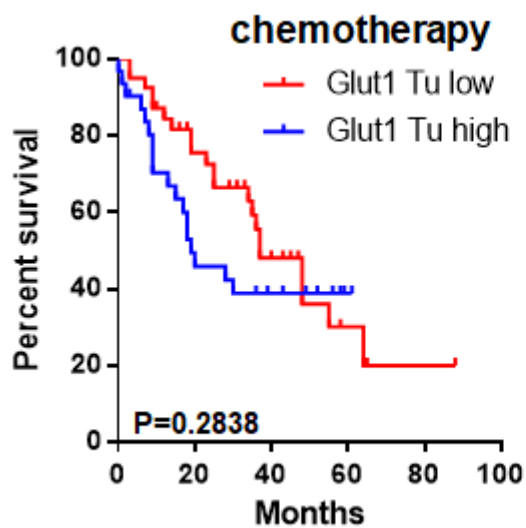
	Median Survival $\pm$ SEM (months)
Glut1 Sd low	34 ± 8
Glut1 Sd high	53 ± 5
Total Survival	48 ± 6

Abbildung 3: Kaplan-Meier-Kurven und mittleres Überleben in Monaten in Abhängigkeit der Expressionsintensität von GLUT1 im Tumorgewebe (oben), Infiltrationsrand (Mitte) und Lebergewebe (unten). Die rote Kurve stellt das mittlere Überleben der Patienten mit niedriger GLUT1 Expressionsintensität, die blaue Kurve jenes der Patienten mit hoher GLUT1 Expressionsintensität dar.



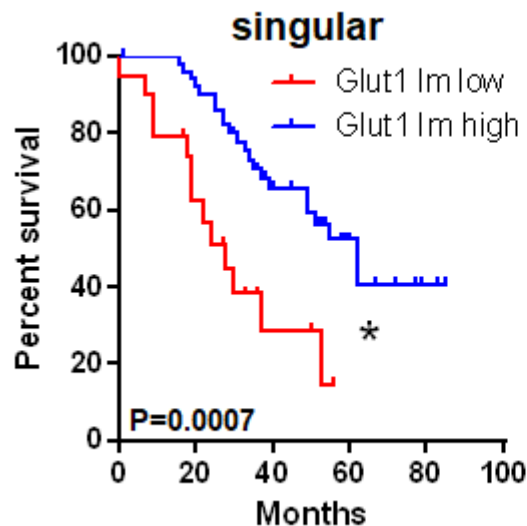
	Median Survival $\pm$ SEM (months)
Glut1 Tu low	undefined
Glut1 Tu high	49 ± 9
Total Survival	52 ± 7

Abbildung 4: Kaplan-Meier-Kurve und Mittleres Überleben in der Subgruppe der Patienten ohne Chemotherapie in Abhängigkeit der GLUT1-Expression im Tumorgewebe



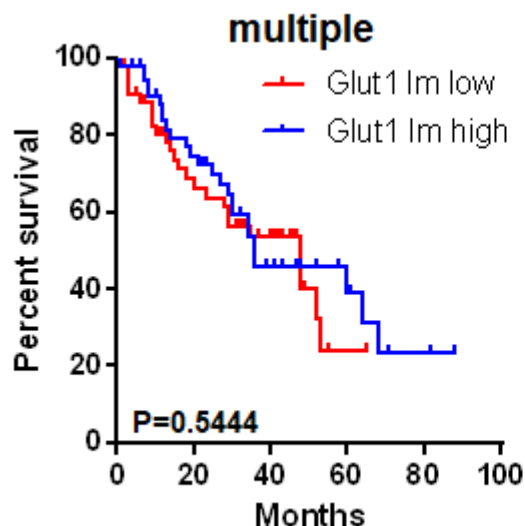
	Median Survival $\pm$ SEM (months)
Glut1 Tu low	37 ± 6
Glut1 Tu high	19 ± 6
Total Survival	36 ± 7

Abbildung 5: Kaplan-Meier-Kurve und Mittleres Überleben in der Subgruppe der Patienten mit adjuvanter Chemotherapie in Abhängigkeit der GLUT1-Expression im Tumorgewebe



	Median Survival $\pm$ SEM (months)
Glut1 Im low	28 ± 6
Glut1 Im high	62 ± 7
Total Survival	51 ± 8

Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurve und Mittleres Überleben in der Subgruppe der Patienten mit singulären Metastasen in Abhängigkeit der GLUT1-Expression im Infiltrationsrand



	Median Survival $\pm$ SEM (months)
Glut1 Im low	48 ± 12
Glut1 Im high	36 ± 12
Total Survival	36 ± 7

Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve und Mittleres Überleben in der Subgruppe der Patienten mit multiplen Metastasen in Abhängigkeit der GLUT1-Expression im Infiltrationsrand

KI67 und GLUT1-Expression

Von 93 Patienten aus dem Patientenkollektiv wurden immunhistologische Färbungen auf KI67 als Proliferationsmarker angefertigt. Hiervon waren 38 (40,9%) Patienten weiblich, 55 (59,1%) männlich. Das mittlere Alter betrug 60 Jahre zum Operationszeitpunkt. Die Neoplasie stammte ursprünglich 55 (59,1%) Mal aus dem Kolon, 38 (40,9%) Mal aus dem Rektum. Bei 44 (47,3%) Patienten wurden synchrone, bei 49 (52,7%) metachrone Metastasen gefunden. Die Leberfiliae

waren in 34 (36,6%) Fällen singularär und in 59 (63,4%) Fällen multipel. Ein Rezidiv wurde 24 (25,8%) Mal festgestellt. 39 (41,9%) Patienten wurde eine adjuvante Therapie mittels Chemotherapie zuteil. Somit waren die aufgrund der aufgeführten Merkmale definierten Subpopulationen in der KI67-Gruppe vergleichbar vertreten wie in dem GLUT1-Kollektiv.

Die KI67⁺ Zellen wurden bei zwanzigfacher Vergrößerung ausgezählt. Dies wurde gesondert für den Tumor und das Stroma durchgeführt. Die Proben wurden dann semiquantitativ in KI67 high bzw. in KI67 low klassifiziert. Diese Kennzeichen wurden mit der GLUT1 Positivität abgeglichen und es ergab sich eine signifikante positive Korrelation zwischen der KI67- und der GLUT1-Positivität im Tumor ($p = 0.003$). Im Infiltrationsrand (Im; $p = 0,886$) und im peripheren Lebergewebe (Sd; $p = 0,131$) konnte kein statistischer Zusammenhang nachgewiesen werden

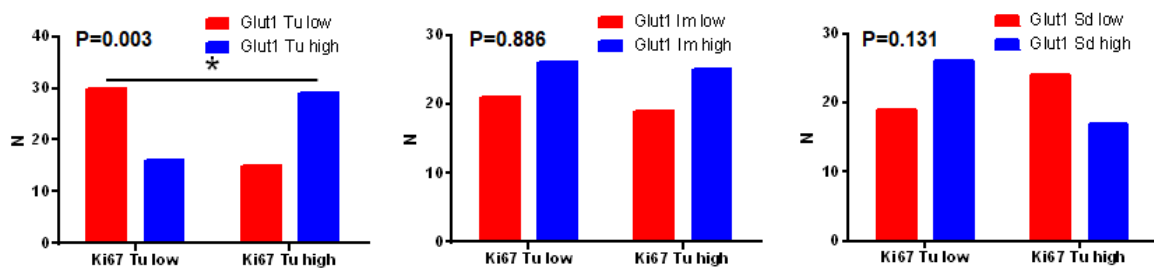


Abbildung 8: Anzahl der Patienten mit KI67 low (KI67⁺ Zellen pro Gesichtsfeld bei 20x Vergrößerung unterhalb des Medians) respektive KI67 high (KI67⁺ Zellen pro Gesichtsfeld bei 20x Vergrößerung oberhalb des Medians), die eine hohe GLUT1 Expressivität (blau: GLUT1 high) bzw eine niedrige GLUT1 Expressivität (rot: GLUT1 low) aufweisen. Links: Tumorgewebe, Mitte: Übergangsgewebe, Rechts: Lebergewebe

GLUT1⁺ Zellen im Übergangsgewebe entsprechen eingewanderten Lymphozyten

Fluoreszierende Doppelfärbung

Es wurde beispielhaft ein Schnitt auf CD8 und GLUT1 gefärbt, um zu zeigen, dass die GLUT1⁺ Zellen im Übergangs- und Lebergewebe Lymphozyten sind.

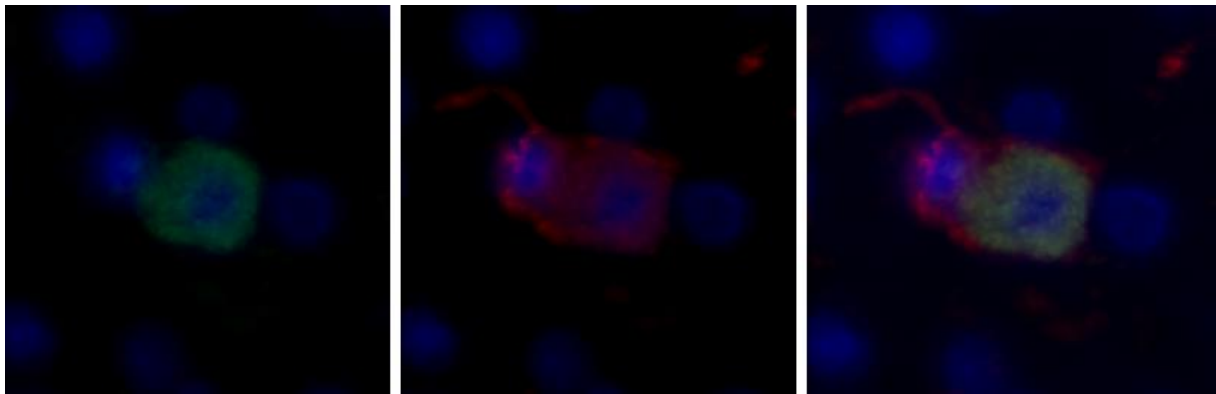


Abbildung 9: Immunfluoreszierende immunhistochemische Doppelfärbung; CD8 (grün, links), GLUT1 (rot, Mitte), CD8/ GLUT1 (rechts)

FACS Analyse FACS1

Es wurden 19 frische Gewebeproben von Metastasenresektionen gesammelt. Mittels FACS-Färbung und -Analyse konnte gezeigt werden, dass Lymphozyten im Übergangsgewebe GLUT1 exprimieren. $27,8\% \pm 9,6\%$ der eingewanderten Leukozyten entsprachen $CD4^+$ T-Zellen, die zu $16,6\% \pm 11,4\%$ $GLUT1^+$ waren. Unter den $CD45^+$ Zellen konnten $47,6\% \pm 8,9\%$ $CD8^+$ -Lymphozyten identifiziert werden, deren $GLUT1^+$ Subpopulation $27,0\% \pm 18,0\%$ ausmachte.

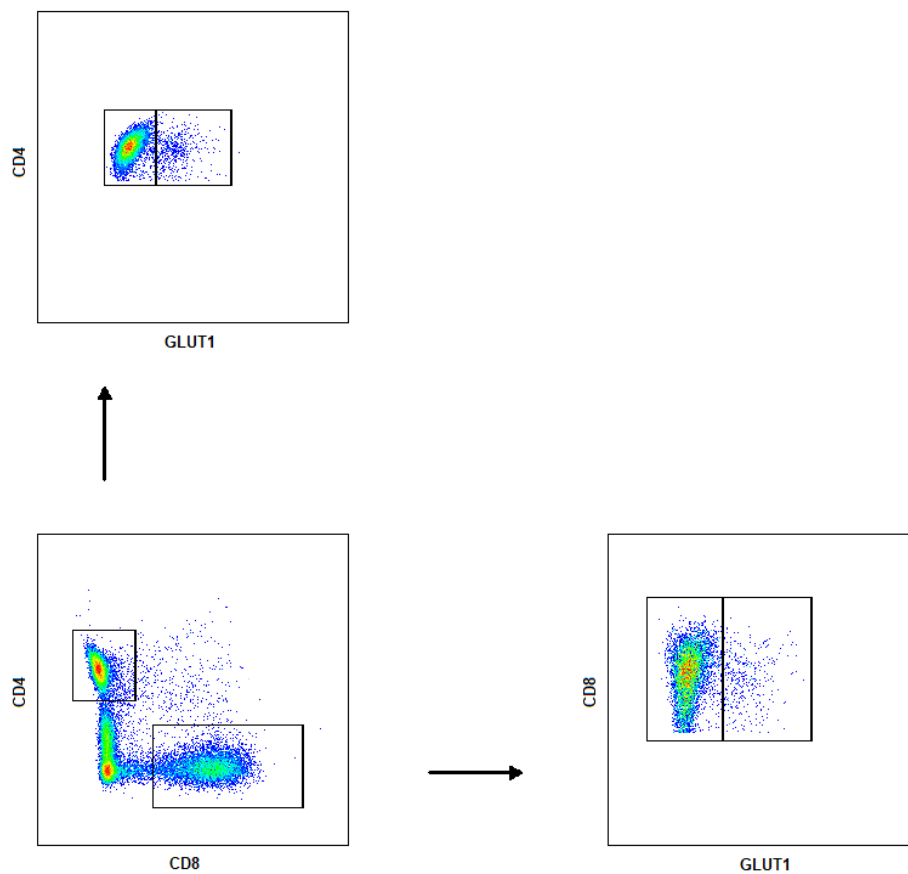


Abbildung 10: Differenzierung der eingewanderten Leukozyten in $CD4^+$ und $CD8^+$ Lymphozyten bzw $GLUT1^+$ und $GLUT1^- CD4^+$ bzw $CD8^+$ Lymphozyten (FACS 2)

Immunzellendifferenzierung

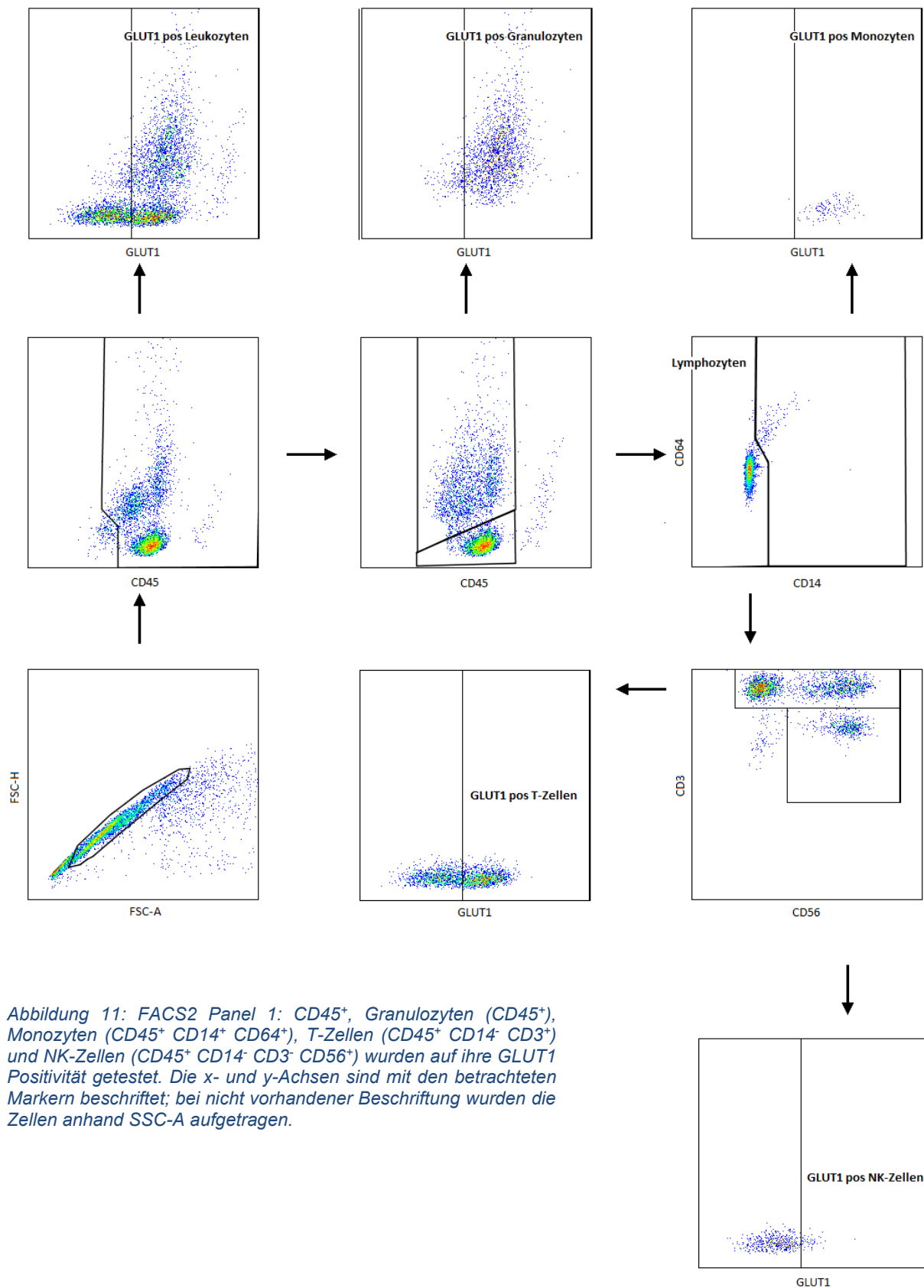
Um die GLUT1⁺ Immunzellen zu differenzieren, wurden fünf Proben mit Leukozyten des Übergangsgewebes der resezierten kolorektalen Lebermetastasen für FACS Analysen gefärbt (Facs2, Tabelle 2). Die Auswertung erfolgte gemäß den unten aufgeführten Schemata (Abb. 10-15). Für die Errechnung der Leukozyten und der T-Zellen sowie für die Betrachtung der GLUT1-Expression dieser Zellpopulationen wurden die Panels 1, 2, 4, 5 und 6 der einzelnen Proben gepoolt, für die CD4⁺ und CD8⁺ Zellen und deren GLUT1-Positivität die Panels 2, 4 und 5. 92,3% ($\sigma = 8,6\%$) der einzelnen Zellen wurden als Leukozyten (CD45⁺) identifiziert, wovon 37,4% ($\sigma = 9,2\%$) der Zellen GLUT1⁺ waren. Die Leukozyten ließen sich in Granulozyten (Mittelwert: 31,0%, $\sigma = 6,7\%$), Monozyten (Mittelwert: 0,9%, $\sigma = 0,8\%$) und Lymphozyten (Mittelwert: 67,2%, $\sigma = 7,8\%$) unterscheiden. Granulozyten waren hierbei zu $68,0\% \pm 17,0\%$ und Monozyten zu $81,5\% \pm 14,8\%$ GLUT1⁺. Die Lymphozyten wurden indes in T-Zellen (Mittelwert: 80,6%, $\sigma = 10,1\%$) und Natürliche Killer-Zellen (Mittelwert: 17,4%, $\sigma = 10,2\%$) differenziert. T-Zellen exprimierten in $43,3\% \pm 7,9\%$ (ungepoolt) der Fälle, NK-Zellen in $6,5\% \pm 6,1\%$ der Fälle GLUT1. B-Lymphozyten kamen zu $7,3\% \pm 3,5\%$ vor (Abb. 16 und Abb. 17).

Die T-Lymphozyten wurden weiterhin unterschieden in CD4⁺ (Mittelwert: 32,4%, $\sigma = 12,9\%$) und CD8⁺ (Mittelwert: 59,9%, $\sigma = 9,7\%$) Zellen, auf denen zu $8,9\% \pm 3,7\%$ respektive $19,6\% \pm 5,3\%$ GLUT1 nachgewiesen werden konnte.

Die T-Helferzellen wurden in CD45RO⁺ und CD45RA⁺ Zellen unterteilt (Mittelwert: 88,6%, $\sigma = 3,3\%$; GLUT1-Expression: Mittelwert: 4,5%, $\sigma = 3,6\%$ bzw. Mittelwert: 4,8%, $\sigma = 2,6\%$; GLUT1-Expression: Mittelwert: 23,2%, $\sigma = 9,3\%$). Diese Zellpopulationen wurden in Naive und TEMRA T-Zellen (Mittelwert: 4,4%, $\sigma = 2,4\%$; GLUT1-Expression: Mittelwert: 19,9%, $\sigma = 10,6\%$) und Gedächtniszellen (Mittelwert: 7,0%, $\sigma = 4,2\%$; GLUT1-Expression: Mittelwert: 14,2%, $\sigma = 6,4\%$) sowie CD4⁺ Zellen in Central Memory-Zellen (Mittelwert: 2,8%, $\sigma = 2,4\%$), Effector Memory-Zellen (Mittelwert: 89,1%, $\sigma = 2,3\%$; GLUT1-Expression: Mittelwert: 5,3%, $\sigma = 3,4\%$), Naive CD4⁺ Zellen (Mittelwert: 0,4%, $\sigma = 0,2\%$), TEMRA-Zellen (Mittelwert: 7,7%, $\sigma = 3,5\%$; GLUT1-Expression: Mittelwert: 31,9%, $\sigma = 6,9\%$) und regulatorische T-Zellen (Mittelwert: 7,6%, $\sigma = 3,4\%$; GLUT1-Expression: Mittelwert: 27,9%, $\sigma = 9,8\%$) differenziert (Abb. 20-23).

Auch die Zytotoxischen T-Zellen wurden in CD45RO⁺ (Mittelwert: 53,3%, σ = 15,3%; GLUT1-Expression: Mittelwert: 7,3%, σ = 4,7%) und CD45RA⁺ (Mittelwert: 33,3%, σ = 12,0%; GLUT1-Expression: Mittelwert: 40,0%, σ = 8,6%) unterteilt. Diese Zellpopulationen wurden in Naive und TEMRA T-Zellen (Mittelwert: 31,4%, σ = 11,7%; GLUT1-Expression: Mittelwert: 38,7%, σ = 9,6%), und Gedächtniszellen (Mittelwert: 5,6%, σ = 3,2%; GLUT1-Expression: Mittelwert: 23,6%, σ = 12,8%), sowie die CD8⁺ T-Zellen in Central Memory-Zellen (Mittelwert: 0,5%, σ = 0,5%), Effector Memory-Zellen (Mittelwert: 61,6%, σ = 8,9%; GLUT1-Expression: Mittelwert: 11,5%, σ = 7,5%), Naive CD8⁺ Zellen (Mittelwert: 1,1%, σ = 0,6%) und TEMRA-Zellen (Mittelwert: 36,8%, σ = 9,1%; GLUT1-Expression: Mittelwert: 40,4%, σ = 5,0%) unterschieden (Abb. 18, 19).

Es wurden sowohl die TCR $\alpha\beta$ ⁺ Zellen (Mittelwert: 93,9%, σ = 3,2%; GLUT1-Expression: Mittelwert: 15,7%, σ = 9,0%) – unterteilt in CD4⁺ (Mittelwert: 33,3%, σ = 10,6%; GLUT1-Expression: Mittelwert: 9,8%, σ = 5,2%) und CD8⁺ (Mittelwert: 59,6%, σ = 11,2%; GLUT1-Expression: Mittelwert: 17,0%, σ = 9,7%) –, als auch die TCR $\gamma\delta$ ⁺ Zellen (Mittelwert: 6,0%, σ = 3,2%; GLUT1-Expression: Mittelwert: 12,1%, σ = 7,7%) aus der Gruppe der CD3⁺ Zellen identifiziert (Abb. 22, 23).



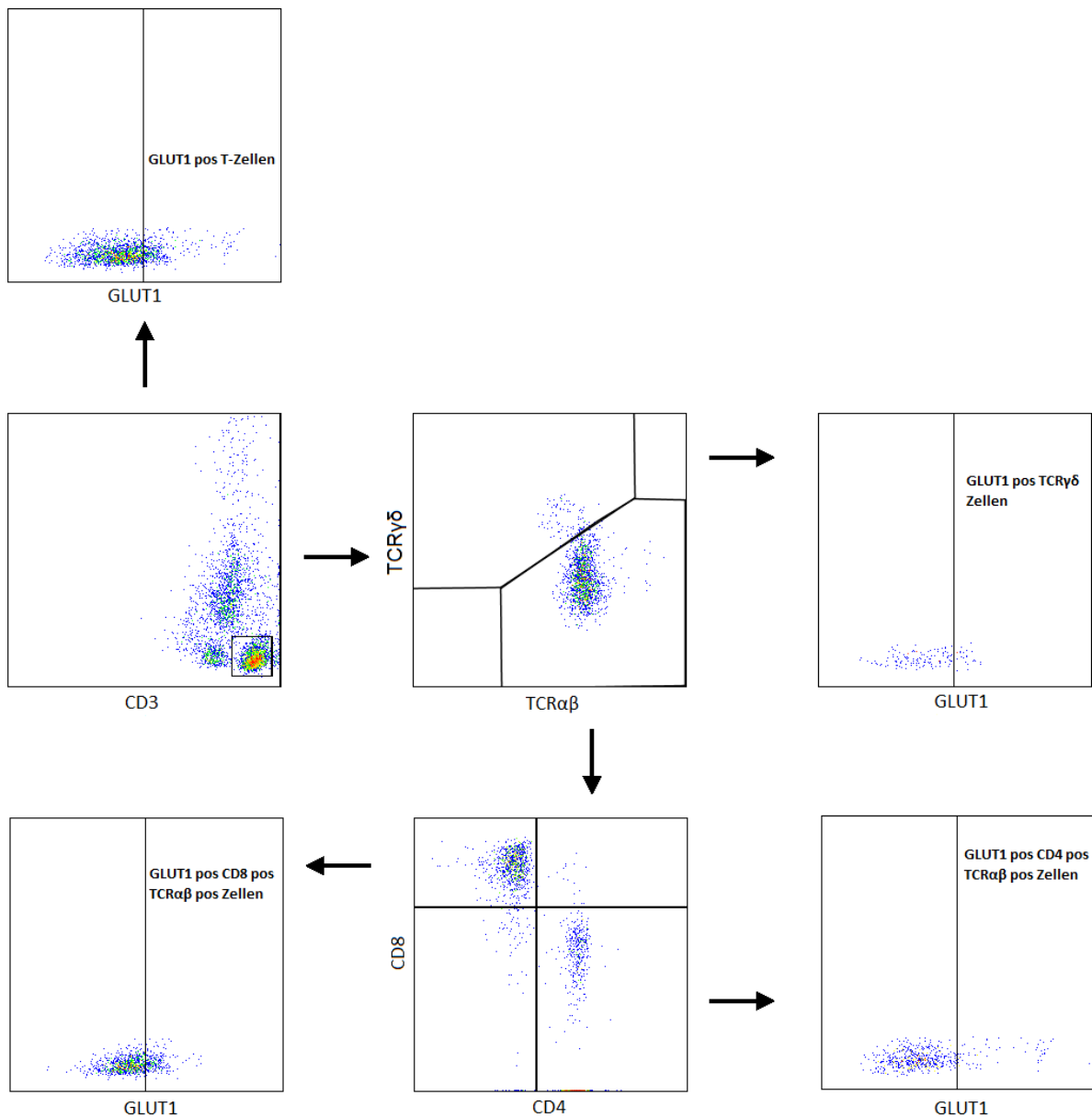


Abbildung 12: FACS2 Panel 2: Differenzierung der T-Zellen. Aus der $CD45^+$ Population (gegated wie in Panel 1) wurden T-Zellen ($CD45^+ CD3^+$), $TCR\gamma\delta^+$ T-Zellen ($CD3^+ TCR\gamma\delta^+$), $TCR\alpha\beta^+$ zytotoxische T-Zellen ($CD3^+ TCR\alpha\beta^+ CD8^+$) und $TCR\alpha\beta^+$ T-Helferzellen ($CD3^+ TCR\alpha\beta^+ CD4^+$) identifiziert und auf ihre GLUT1 Positivität getestet. Die x- und y-Achsen sind mit den betrachteten Markern beschriftet; bei nicht vorhandener Beschriftung wurden die Zellen anhand SSC-A aufgetragen.

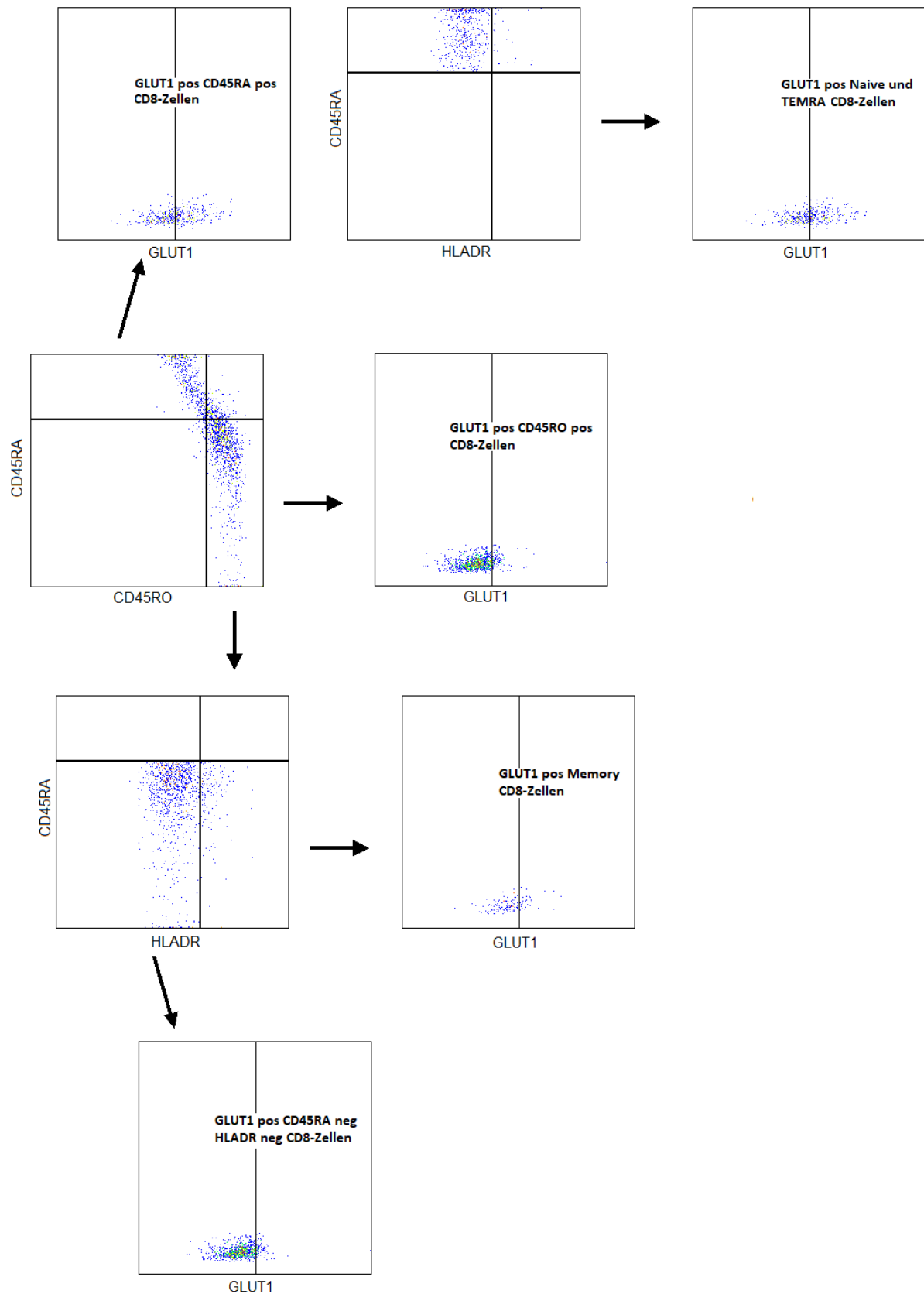


Abbildung 13: FACS2 Panel 4: Differenzierung der CD4⁺ T-Zellen in CD45RA⁺ CD45RO⁻ und CD45RO⁺ CD45RA⁻ Zellen sowie in Memory (CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺ CD45RO⁺ CD45RA⁻ HLADR⁺) und Naive und TEMRA T-Zellen (CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺ CD45RA⁺ CD45RO⁻ HLADR⁺); alle Populationen wurden auf ihre GLUT1 Positivität geprüft. Die x- und y-Achsen sind mit den betrachteten Markern beschriftet; bei nicht vorhandener Beschriftung wurden die Zellen anhand SSC-A aufgetragen

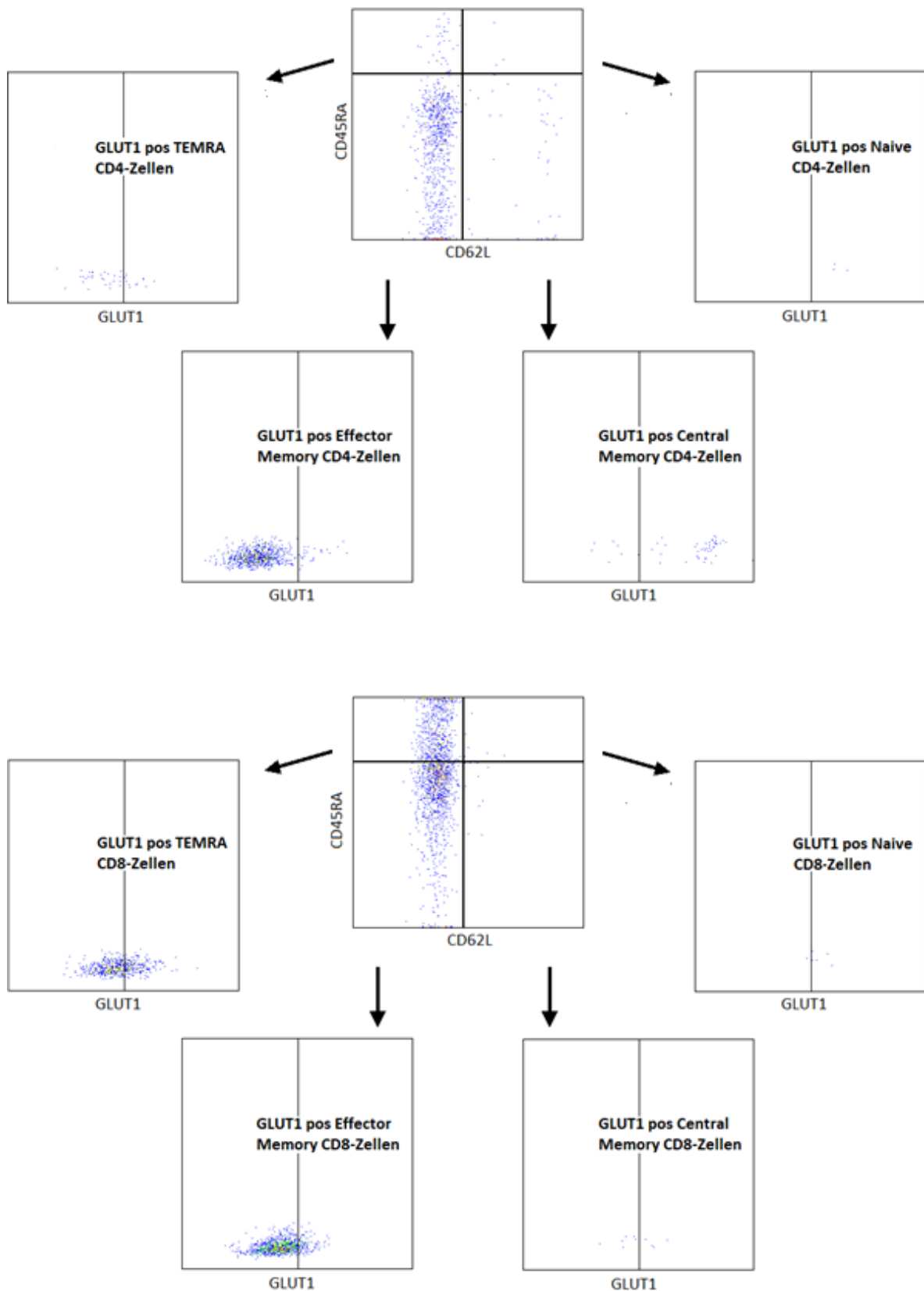


Abbildung 14: FACS2 Panel 5: Differenzierung der T-Helfer (CD45⁺ CD3⁺ CD4⁺) und Zytotoxischen (CD45⁺ CD3⁺ CD8⁺) Zellen in Central (CD45RA⁻ CD62L⁺) und Effector (CD45RA⁻ CD62L⁻) Memory T-Zellen, Naive T-Zellen (CD45RA⁺ CD62L⁺) und TEMRA (CD45RA⁺ CD62L⁻) Zellen. Diese Subpopulationen wurden auf ihre GLUT1 Positivität getestet. Die x- und y-Achsen sind mit den betrachteten Markern beschriftet; bei nicht vorhandener Beschriftung wurden die Zellen anhand SSC-A aufgetragen.

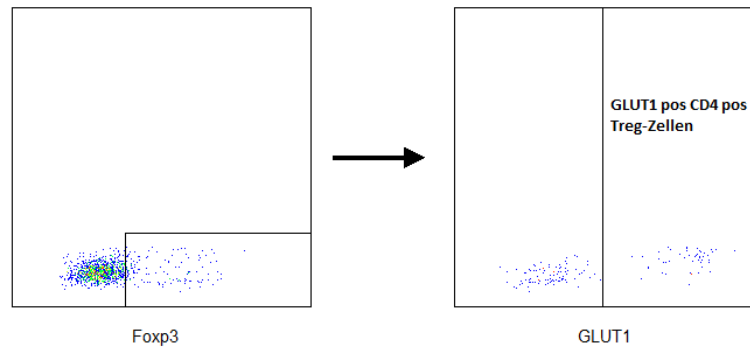


Abbildung 15: FACS2 Panel 6: $CD45^+$ Zellen wurden in Treg Zellen ($CD45^+ CD4^+ Foxp3^+$) differenziert. Die Population der regulatorischen T-Zellen wurde auf ihre GLUT1 Positivität getestet. Die x- und y-Achsen sind mit den betrachteten Markern beschriftet; bei nicht vorhandener Beschriftung wurden die Zellen anhand SSC-A aufgetragen.

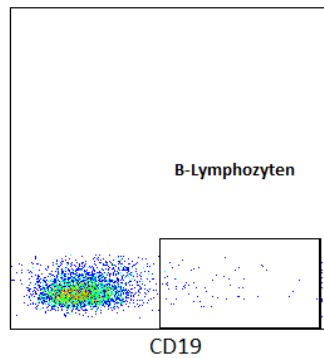


Abbildung 16: FACS2 Panel 7: Identifizierung der B-Zellen ($CD45^+ CD19^+$). Die Eruiierung der $CD45^+$ Zellen erfolgte wie in Panel 1. Die x- und y-Achsen sind mit den betrachteten Markern beschriftet; bei nicht vorhandener Beschriftung wurden die Zellen anhand SSC-A aufgetragen.

Zellen	Phenotyp	übergeordnete Zellpopulation	Anteil an der übergeordneter Zellpopulation	GLUT1-Expression
Leukozyten	CD45+	Single Cell	92,3% +/- 8,6%	37,4% +/- 9,2%
Granulozyten	CD45+ SS high	Leukozyten	31,0% +/- 6,7%	68,0% +/- 17,0%
Monozyten	CD14+	Leukozyten	0,9% +/- 0,8%	81,5% +/- 14,8%
Lymphozyten	CD45 + SS low	Leukozyten	67,2% +/- 7,8%	
NK-Zellen	CD3- CD56+	Lymphozyten	17,4% +/- 10,2%	6,5% +/- 6,1%
T-Zellen	CD3+	Leukozyten	52,1% +/- 8,9%	24,9% +/- 6,6%
T-Zellen	CD3+	Lymphozyten	80,6% +/- 10,1%	
CD4-Zellen	CD3+ CD4+	T-Zellen	32,4% +/- 12,9%	8,9% +/- 3,7%
CD4-Zellen CD45RO+ CD45RA-	CD3+ CD4+ CD45RO+	CD4-Zellen	88,6% +/- 3,3%	4,5% +/- 3,6%
CD4- Gedächtniszellen	CD3+ CD4+ CD45RO+ CD45RA- HLADR+	CD4-Zellen	7,0% +/- 4,2%	14,2% +/- 6,4%
CD4-Zellen CD45RA+ CD45RO-	CD3+ CD4+ CD45RA+ CD45RO-	CD4-Zellen	4,8% +/- 2,6	23,2% +/- 9,3%
Naive sowie TEMRA CD4-Zellen	CD3+ CD4+ CD45RA+ HLADR-	CD4-Zellen	4,4% +/- 2,4%	19,9% +/- 10,6%
Central Memory CD4-Zellen	CD3+ CD4+ CD45RA- CD62L+	CD4-Zellen	2,8% +/- 2,4%	
Effector Memory CD4-Zellen	CD3+ CD4+ CD45RA- CD62L-	CD4-Zellen	89,1% +/- 2,3%	5,3% +/- 3,4%

Naive CD4-Zellen	CD3+ CD4+ CD45RA+ CD62L+	CD4-Zellen	0,4% +/- 0,2%	
TEMRA CD4-Zellen	CD3+ CD4+ CD45RA+ CD62L-	CD4-Zellen	7,7% +/- 3,5%	31,9% +/- 6,9%
Regulatorische T-Zellen	CD3+ CD4+ Foxp3+	CD4-Zellen	7,6% +/- 3,4%	27,9% +/- 9,8%
CD8-Zellen	CD3+ CD8+	T-Zellen	59,9% +/- 9,7%	19,6% +/- 5,3%
CD8-Zellen CD45RO+ CD45RA-	CD3+ CD8+ CD45RO+	CD8-Zellen	53,3% +/- 15,3%	7,3% +/- 4,7%
CD8- Gedächtniszellen	CD3+ CD8+ CD45RO+ CD45RA- HLADR+	CD8-Zellen	5,6% +/- 3,2	23,6% +/- 12,8%
CD8-Zellen CD45RA+ CD45RO-	CD3+ CD8+ CD45RA+ CD45RO-	CD8-Zellen	33,3% +/- 12,0%	40,0% +/- 8,6%
Naive sowie TEMRA CD8-Zellen	CD3+ CD8+ CD45RA+ HLADR+	CD8-Zellen	31,4% +/- 11,7%	38,7% +/- 9,6%
Central Memory CD8-Zellen	CD3+ CD8+ CD45RA- CD62L+	CD8-Zellen	0,5% +/- 0,5%	
Effector Memory CD8-Zellen	CD3+ CD8+ CD45RA- CD62L-	CD8-Zellen	61,6% +/- 8,9%	11,5% +/- 7,5%
Naive CD8-Zellen	CD3+ CD8+ CD45RA+ CD62L+	CD8-Zellen	1,1% +/- 0,6%	
TEMRA CD8-Zellen	CD3+ CD8+ CD45RA+ CD62L-	CD8-Zellen	36,8% +/- 9,1%	40,4% +/- 5,0%
TCR-αβ T-Zellen	CD3+ TCR-αβ+	T-Zellen	93,9% +/- 3,2%	15,7% +/- 9,0%
TCR-αβ CD4-Zellen	CD3+ CD4+ TCR-αβ+	TCR-αβ T-Zellen	33,3% +/- 10,6%	9,8% +/- 5,2%
TCR-αβ CD8-Zellen	CD3+ CD8+ TCR-αβ+	TCR-αβ T-Zellen	59,6% +/- 11,2%	17,0% +/- 9,7%

TCR-$\gamma\delta$ T-Zellen	CD3+ TCR- $\gamma\delta$ +	T-Zellen	6,0% +/- 3,2%	12,1% +/- 7,7%
B-Zellen	CD19+	Lymphozyten	7,3% +/- 3,5%	

Tabelle 3: Differenzierung der Leukozyten in ihre Subpopulationen mit anteilmäßiger GLUT1-Expression

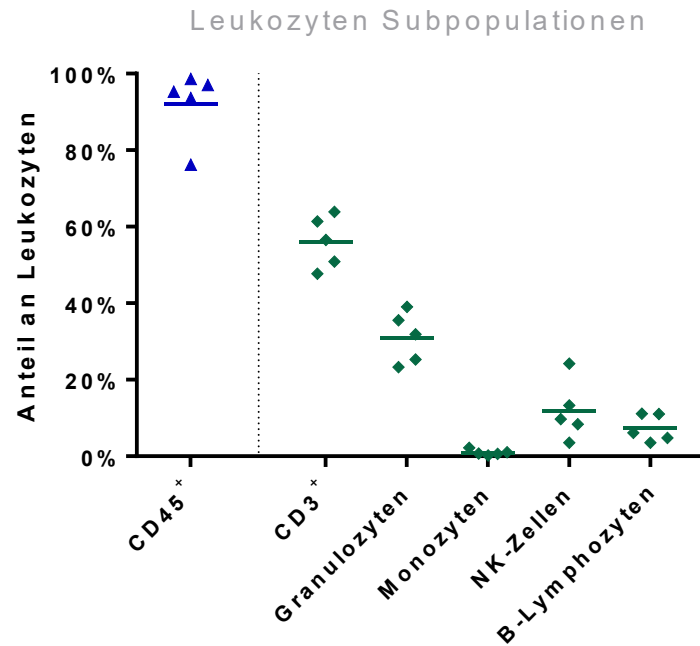


Abbildung 17: Differenzierung der Leukozyten in ihre Subpopulationen anhand FACS-Analysen (FACS2, Panel 1, 7) und Auftragung der Häufigkeit in Bezug auf die CD45⁺-Zellen. Die CD45⁺ Zellen sind anteilig an den Single Cells angegeben. Jeder Punkt repräsentiert eine Probe; der Balken stellt den Mittelwert dar

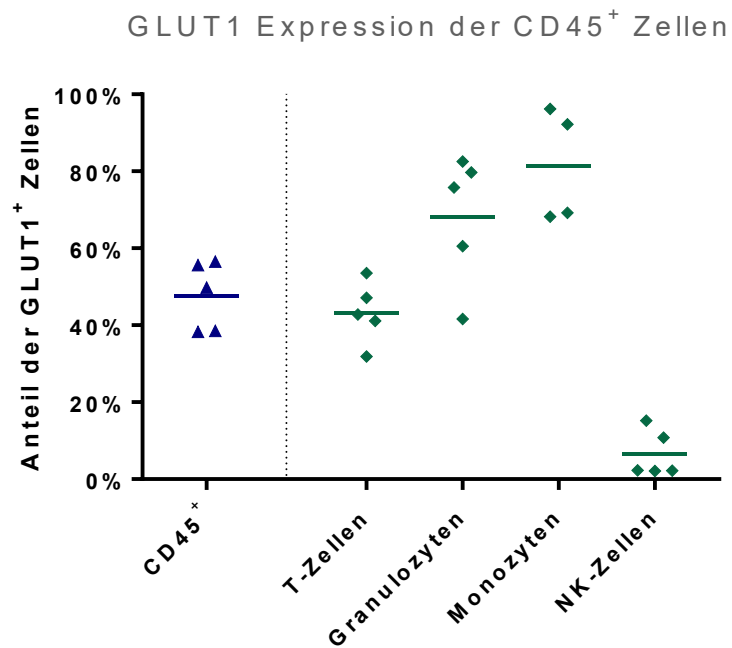


Abbildung 18: Darstellung der GLUT1-Positivität der Leukozyten und ihrer Subpopulationen anhand FACS-Analyse (FACS2, Panel 1) und Auftragung der Häufigkeit. Jeder Punkt repräsentiert eine Probe; der Balken stellt den Mittelwert dar

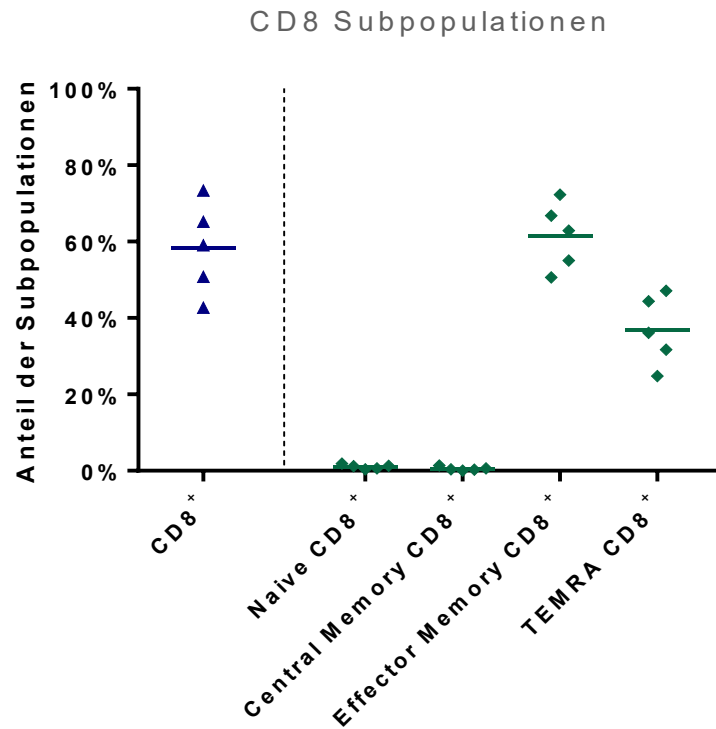


Abbildung 19: Differenzierung der Zytotoxischen T-Zellen in ihre Subpopulationen anhand FACS-Analyse (FACS2, Panel 5) und Auftragung der Häufigkeit in Bezug auf CD8⁺ Zellen. Jeder Punkt repräsentiert eine Probe; der Balken stellt den Mittelwert dar.

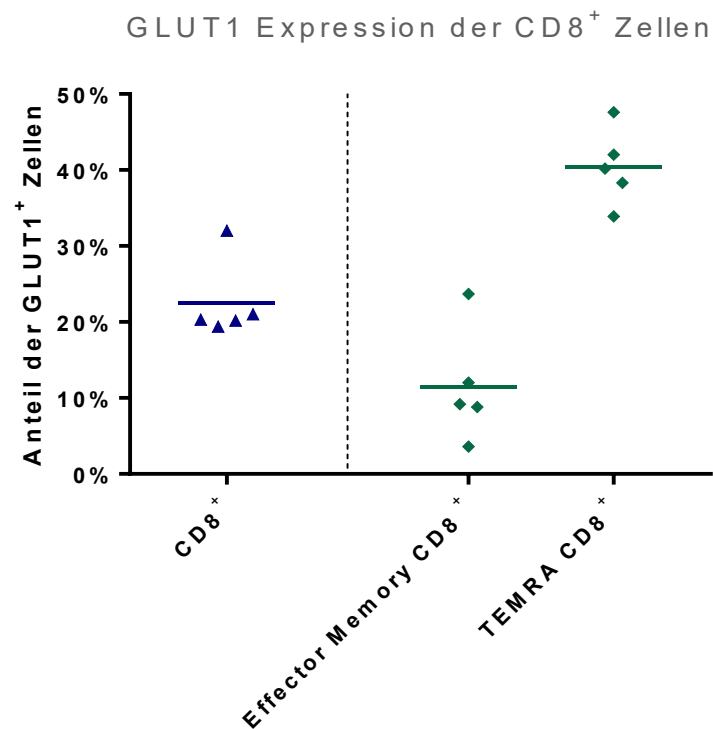
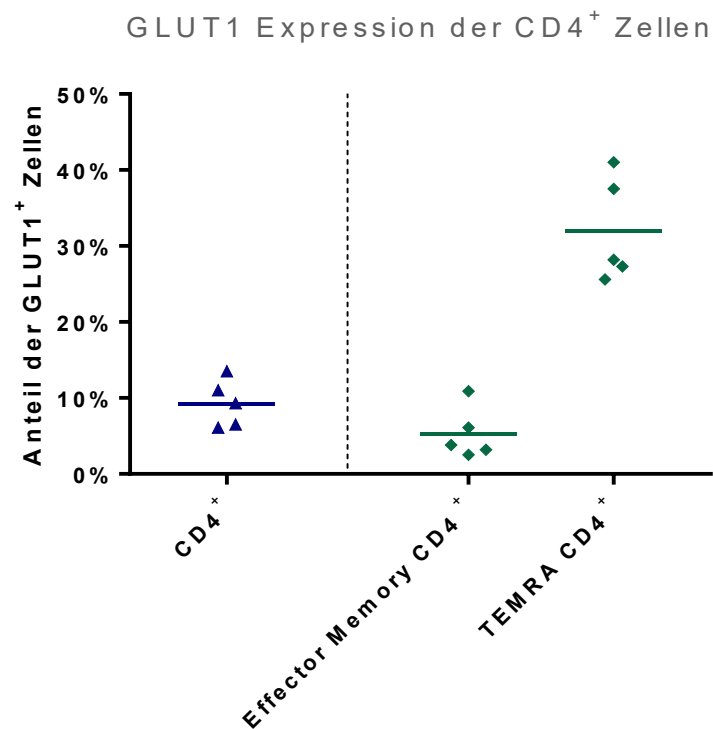
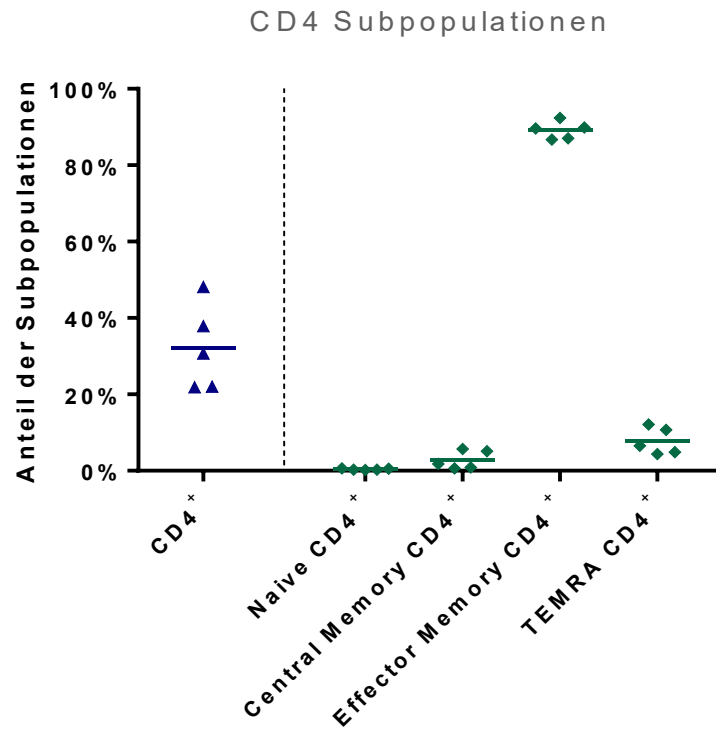


Abbildung 20: Darstellung der GLUT1-Positivität der zytotoxischen T-Zellen und ihrer Subpopulationen anhand FACS-Analyse (FACS2, Panel 5) und Auftragung der Häufigkeit. Jeder Punkt repräsentiert eine Probe; der Balken stellt den Mittelwert dar.



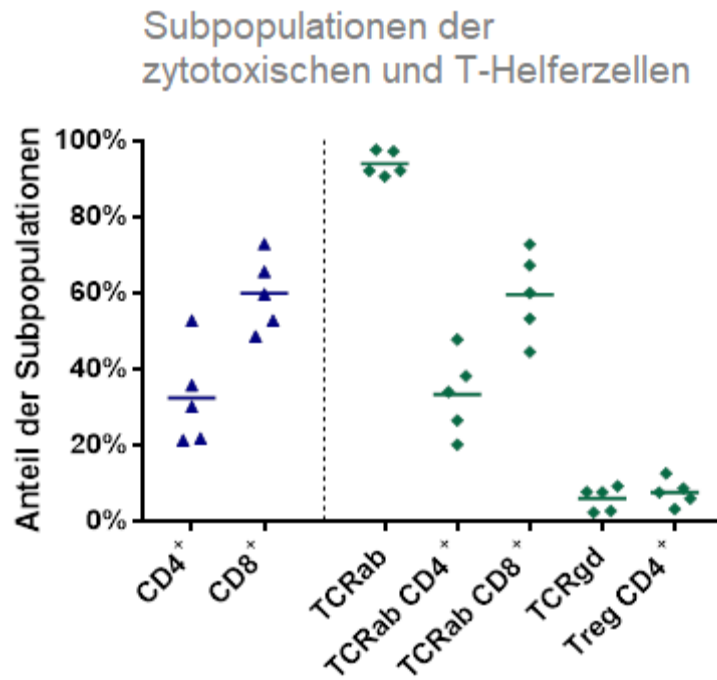


Abbildung 23: Differenzierung der zytotoxischen und T-Helferzellen in ihre Subpopulationen anhand FACS-Analyse (FACS2, Panel 2, 6) und Auftragung der Häufigkeit in Bezug auf CD4⁺ respektive CD8⁺ Zellen. Jeder Punkt repräsentiert eine Probe; der Balken stellt den Mittelwert dar.

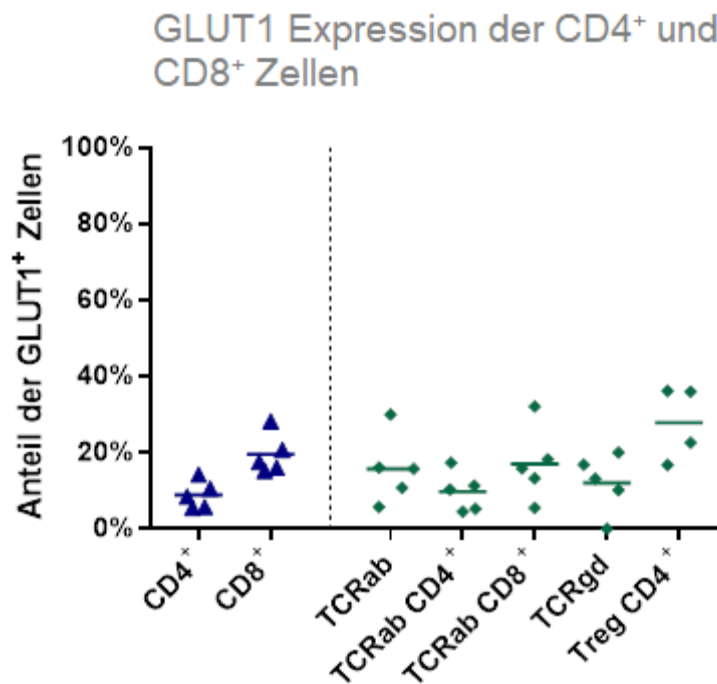


Abbildung 24: Prüfung der zytotoxischen und der T-Helferzellen sowie ihrer Subpopulationen auf die GLUT1 Expression anhand FACS-Analyse (FACS2, Panel 2, 6) und Auftragung der Häufigkeit. Jeder Punkt repräsentiert eine Probe; der Balken stellt den Mittelwert dar.

Zytotoxizität der TEMRA-Zellen

Um nach der Differenzierung der GLUT1⁺ Zellpopulationen den Effekt von GLUT1 auf die Funktionalität der CD8⁺ TEMRA-Zellen zu klären, wurde die Zytotoxizität dieser Zellpopulationen mittels FACS (Facs3, Tabelle 2) an fünf Proben der resezierten kolorektalen Lebermetastasen ermittelt. Als Indikator für die zytotoxische Aktivität wurden Granzym B, Perforin (67,120) und Fas-Ligand gewählt (121), die die Apoptose der Zielzelle induzieren. Zusätzlich wurden als Degranulationsmarker CD107a (122) und als Marker für die Immunstimulation Interleukin-33 (123) und Interferon γ (124) betrachtet.

Die Analyse erfolgte anhand des unten dargestellten Schemas (Abb. 25). Ausgewertet wurden hier die Zellen des Übergangsgewebes. Bei einer geringen Anzahl von Zellen wurden die Ergebnisse der Panels 1-4 der einzelnen Proben gepoolt. Dies galt für die Analyse von TEMRA-Zellen und deren Subpopulationen GLUT1⁺, GLUT1⁻, CD107a⁺ und IFN γ ⁺. Subpopulationen wurden nicht weiter betrachtet bei Zellzahlen < 10 der übergeordneten Zellgruppe. Zur Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen wurden zur Vergleichbarkeit dieselben Proben für die einzelnen Subpopulationen herangezogen. So wurden die Proben 2 und 4 für TEMRA Zellen (Panel 1-4 gepoolt), CD107a⁺ TEMRA-Zellen (Panel 1-4 gepoolt), IFN γ ⁺ (Panels 1-4 gepoolt), Granzym B⁺ und Perforin⁺ Populationen die Proben 2 und 4 betrachtet (Tabelle 4).

Die Analyse der IL-33- und FasL-Expression der TEMRA-Zellen in den Panels 3 und 4 war aufgrund fehlender nachvollziehbarer Auftrennung der Populationen nicht möglich.

Beim Vergleich der GLUT1⁺ und GLUT1⁻ CD8⁺ TEMRA Zellen zeigte sich eine deutliche Tendenz zu einer erhöhten Granzym B Expression der GLUT1⁺ Subpopulation, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte ($p=0,0620$). In der Expression von CD107a, INF γ und Perforin ergab sich kein Unterschied (Abb. 24).

Zytotoxizität

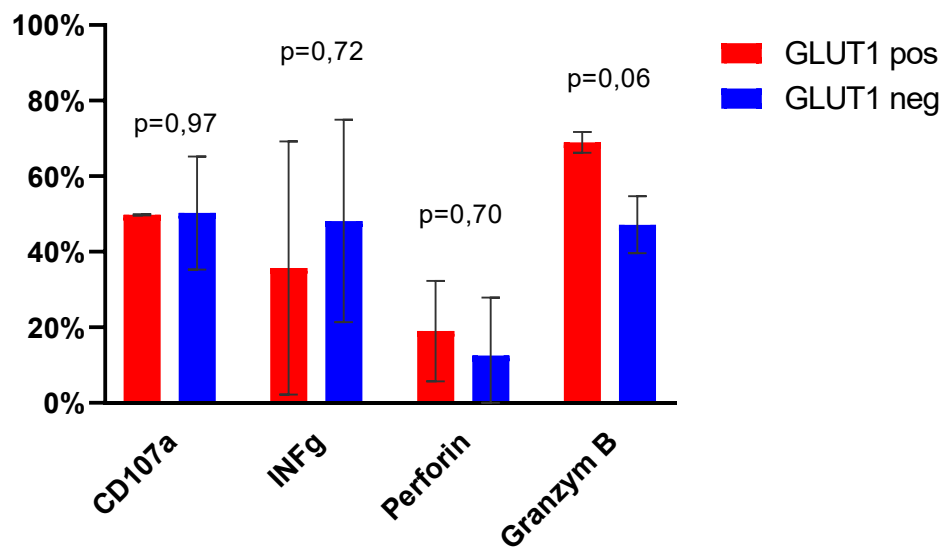


Abbildung 25: Darstellung des IFN γ -, Perforin- bzw Granzym B-positiven Anteils der CD8⁺ TEMRA Zellen in Abhängigkeit der GLUT1-Positivität.

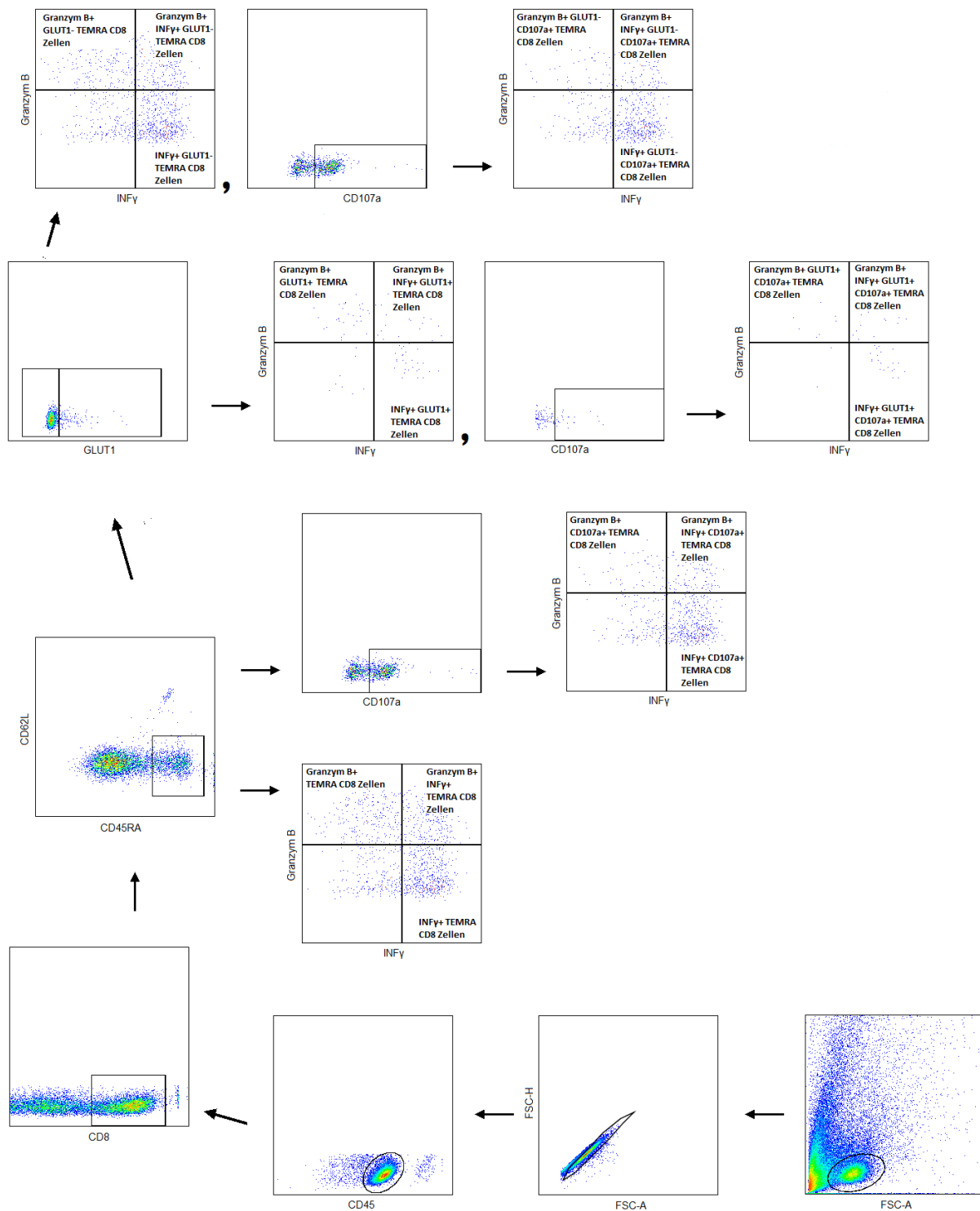


Abbildung 26: FACS3 Panel 1: Differenzierung der TEMRA-Zellen ($CD45^+ CD8^+ CD45RA^+ CD62L^-$) in $GLUT1^+$ und $GLUT1^-$ sowie $CD107a^+$ Zellpopulationen und Testung auf $IFN\gamma$ - sowie Granzyme B-Expression. Die x- und y-Achsen sind mit den betrachteten Markern beschriftet; bei nicht vorhandener Beschriftung wurden die Zellen anhand SSC-A aufgetragen. Die Analyse der Panels 2-4 erfolgte anhand desselben Schemas bei schlussendlicher Auftragung von Perforin, IL-33 bzw. FasL anstatt Granzyme B gegenüber $IFN\gamma$.

	übergeordnete Zellpopulation	Anteil an der übergeordneten Zellpopulation		übergeordnete Zellpopulation	Anteil an der übergeordneten Zellpopulation		übergeordnete Zellpopulation	Anteil an der übergeordneten Zellpopulation
TEMRA-Zellen	CD8-Zellen	33,4% +/- 16,6%	GLUT1-	TEMRA-Zellen	88,2% +/- 4,8%	GLUT1+	TEMRA-Zellen	12,5% +/- 5,7%
IFN γ +	TEMRA-Zellen	47,1% +/- 27,4%	IFN γ +	GLUT1- TEMRA-Zellen	48,2% +/- 26,8%	IFN γ +	GLUT1+ TEMRA-Zellen	35,7% +/- 33,5%
Granzym B+	TEMRA-Zellen	50,0% +/- 8,3%	Granzym B+	GLUT1- TEMRA-Zellen	47,2% +/- 7,6%	Granzym B+	GLUT1+ TEMRA-Zellen	69,0% +/- 2,8%
Perforin+	TEMRA-Zellen	14,2% +/- 13,6%	Perforin+	GLUT1- TEMRA-Zellen	12,5% +/- 15,4%	Perforin+	GLUT1+ TEMRA-Zellen	19,0% +/- 13,3%
CD107a	TEMRA-Zellen	50,7% +/- 13,1%	CD107a	GLUT1- TEMRA-Zellen	50,3% +/- 14,9%	CD107a	GLUT1+ TEMRA-Zellen	49,8% +/- 0,1%
IFN γ +	CD107a+ TEMRA-Zellen	58,1% +/- 25,5%	IFN γ +	CD107a+ GLUT1- TEMRA-Zellen	61,3% +/- 20,6%	IFN γ +	CD107a+ GLUT1+ TEMRA-Zellen	45,9% +/- 46,7%
Granzym B+	CD107a+ TEMRA-Zellen	39,3% +/- 21,6%	Granzym B+	CD107a+ GLUT1- TEMRA-Zellen	35,4% +/- 18,7%	Granzym B+	CD107a+ GLUT1+ TEMRA-Zellen	64,3% +/- 20,2%
Perforin+	CD107a+ TEMRA-Zellen	6,8% +/- 4,9%	Perforin+	CD107a+ GLUT1- TEMRA-Zellen	6,8% +/- 3,3%	Perforin+	CD107a+ GLUT1+ TEMRA-Zellen	21,8% +/- 12,5%

Tabelle 4: Übersicht der ermittelten Zellpopulationen des Versuchs zur Zytotoxizität der TEMRA Zellen (FACS3). Für die Berechnung der Populationen (TEMRA, INF γ , Granzym B, Perforin, CD107a) wurden die Proben 2 und 4 zur Vergleichbarkeit herangezogen.

Diskussion

Aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung (125) und der damit verbundenen steigenden Prävalenz von Tumorerkrankungen (126) gewinnt die Karzinomforschung – auch auf molekularbiologischer Ebene – an Relevanz. Eine besondere Rolle nimmt hier das Kolonkarzinom ein, da es in Inzidenz und Mortalität zu den häufigsten Neoplasien zählt (1,2). Um für Krebsleiden eine nebenwirkungsarme Therapie zu finden, werden die bei Tumorerkrankungen ablaufenden Mechanismen des Immunsystems, dessen Aufgabe es ist pathologisch veränderte Zellen zu eliminieren und die gesunden körpereigenen Zellen nicht zu beschädigen (12), mehr und mehr ergründet.

GLUT1 exprimierende entartete Zellen lassen auf einen gering differenzierten Tumor mit hoher Stoffwechselaktivität schließen, der im Vergleich zu stärker differenzierteren Karzinomen eine ungünstigere Prognose hat (113,127,128). Für die ausgeprägte Zellteilung undifferenzierter Tumorzellen benötigt das neoplastische Gewebe Energieträger – also Glukose –, die über Glukosetransporter wie GLUT1 bereitgestellt werden (113).

Die von uns durchgeführte Studie mit 194 Teilnehmern untersuchte den Einfluss der GLUT1-Expression im Tumorgewebe kolorektaler Lebermetastasen, in deren Infiltrationsrand und im umliegenden gesunden Lebergewebe auf das Patientenüberleben. Hierfür wurde die immunhistologische GLUT1-Intensität mit dem Überleben korreliert. In einer Substudie mit 93 Patienten wurde zudem der Zusammenhang zwischen KI67- und GLUT1-Expression betrachtet.

Im Gegensatz zu früheren Studien wurde in dieser Arbeit nicht ausschließlich die GLUT1 Expression im Tumorgewebe untersucht, sondern das Hauptaugenmerk auf die Auswirkung des Vorhandenseins des Glukosetransporters im Übergangsgewebe gelegt, der hier von eingewanderten Immunzellen exprimiert wird.

Im Einklang mit früheren Arbeiten, die gezeigt hatten, dass die GLUT1-Expression der entarteten Zellen bei primären CRCs zu einem reduzierten mittleren Patientenüberleben führt (115,116), wiesen wir nach, dass eine hohe GLUT1-Positivität der neoplastischen Zellen der kolorektalen Lebermetastasen mit einem verminderten mittleren Überleben einhergeht. Dies lässt sich auf eine erhöhte Zytokinese und daraus resultierendem aggressiveren Tumorwachstum zurückführen, was durch die positive Korrelation zwischen KI67, einem

Proliferationsmarker (129), dessen Expression in CRCs zudem mit einem verminderten Gesamtüberleben assoziiert ist (130), und GLUT1 im Tumorgewebe untermauert wird.

In einer Subgruppenanalyse der Patienten, denen eine adjuvante Chemotherapie zuteilwurde, konnte dieser Effekt auf das Überleben abhängig von der GLUT1-Expression nicht nachgewiesen werden. Es liegt nahe, dass aufgrund des verbesserten Therapieansprechen bei hohen Proliferationsraten des Karzinoms der prognostisch negative Effekt von GLUT1 nivelliert wird. Die GLUT1-Expression kann somit als indirekter Indikator für die Zellteilung und somit für das Ansprechen auf eine Chemotherapie gewertet werden, was sich auch mit der Tatsache deckt, dass ein relevanter Teil der kolorektalen Lebermetastasen nach Chemotherapie eine reduzierte oder ganz fehlende Positivität in FDG-PET-Computertomogrammen zeigen (131,132). Zudem wird dies von der Studie von Mulyawan et al. gestützt, in der die KI67-Expression in CRCs nur in der Population mit adjuvanter Chemotherapie mit einem positiven Effekt einhergeht (133).

In dieser Studie konzentrierten wir uns vor allem darauf, dass im Gegensatz zu einer erhöhten Expression des Glukose-1-Transporters im Tumorgewebe eine vermehrte GLUT1-Intensität im Übergangsgewebe positiv mit einem prognostisch günstigen Verlauf korrelierte.

Da die Expression des Glukosetransporters aufgrund des fehlenden Zusammenhangs zwischen dem Vorhandensein von KI67 im Tumorgewebe und der GLUT1-Positivität im Infiltrationsrand als unabhängig von der Aggressivität der Neoplasie anzusehen ist, deutet das verlängerte Patientenüberleben bei GLUT1⁺ Infiltrationsmargin auf eine erhöhte Aktivität der Tumor-infiltrierenden Immunzellen und somit einer verbesserten körpereigenen antitumoralen Antwort hin.

Daher untersuchten wir in einem zweiten Versuchsaufbau die Leukozyten aus frischen Leberresektaten mittels FACS Analyse. Hierbei zeigten sich unter den vermehrt repräsentierten Zellen vor allem Granulozyten und CD8⁺ TEMRA-Zellen gehäuft GLUT1⁺. Beide Zelltypen gehören zu den Effektorzellen des jeweiligen Immunsystems – Granulozyten zu denen des angeborenen Immunsystems, TEMRA-Zellen zu denen des adaptiven (12).

Aufgrund der Rolle der Lymphozyten bei der Immunosurveillance von Tumoren (134) stellten wir die Hypothese auf, dass das verlängerte mittlere Überleben der Patienten mit einer erhöhten GLUT1-Expression im Übergangsgewebe auf eine verstärkte Immunaktivität der GLUT1⁺ Lymphozyten zurückzuführen sei. Daher isolierten wir CD8⁺ TEMRA Zellen und testeten diese

abhängig ihres GLUT1-Status auf ihre exozytotische Aktivität anhand CD107a (122) sowie ihre Zytotoxizität exemplarisch anhand der IFN γ -, Perforin- und Granzym B-Expression (67,120,124).

Die annähernd gleiche Expression von CD107a sowohl in der GLUT1⁺ sowie in der GLUT1⁻ Population deutet auf eine von GLUT1 unbeeinflusste exozytotische Aktivität hin. Ein Unterschied in der Zytotoxizität ist somit nicht auf eine rein quantitativ erhöhte Ausschüttung von Zytokinen zurückzuführen

Die Zytotoxizitätstestung zeigte jedoch eine deutliche Tendenz zu einer vermehrten intrazellulären Granzym B-Expression in den GLUT1⁺ CD8⁺ TEMRA-Zellen im Vergleich zur GLUT1⁻ Population.

Die Studie stützt daher aufgrund des erhöhten Vorkommens von Granzym B in GLUT1⁺ CD8⁺ TEMRA-Zellen, die antikanzerogen wirken (66), die These der erhöhten Zytotoxizität dieser Zellpopulation verglichen mit der GLUT1⁻.

In Zusammenschau der Ergebnisse wiesen die GLUT1⁺ CD8⁺ TEMRA-Zellen in unseren Versuchen weder eine erhöhte IFN γ -Produktion noch eine reduzierte immunologische Aktivität auf und verhielten sich somit anders als die Gesamtpopulation der CD8⁺ Lymphozyten in den Arbeiten von Cretenet et al. beziehungsweise Sukumar et al. (108,112). Cretenet et al. wiesen in ihrer Arbeit eine erhöhte IFN γ Produktion und somit eine gesteigerte Zytotoxizität GLUT1⁺ Lymphozyten nach (108), wohingegen in der Publikation von Sukumar et al. terminal differenzierte, funktionsreduzierte GLUT1⁺ Lymphozyten beschrieben wurden (112). In unseren Versuchen ergaben sich trotz mangelnder erhöhter IFN γ -Produktion Hinweise auf ein erhöhtes zytotoxisches Potenzial, was einen möglichen Erklärungsansatz für die Ergebnisse unserer Statistiken zu den Überlebensdaten darstellt.

Konträr zum Gesamtkollektiv und der Subgruppe der Patienten mit einer singulären Lebermetastase, in der die Diskrepanz des mittleren Überlebens zugunsten der Gruppe mit GLUT1⁺ Infiltrationsrand noch zunahm, hatte die GLUT1 Expression im Infiltrationsrand in der Patientensubpopulation mit multiplen Absiedlungen keine Auswirkung auf das Überleben. Eine Vielzahl von Leberläsionen ist – verglichen mit einem kolorektalen Karzinom mit singulärer hepatischer Filiae – als fortgeschritteneres Krankheitsgeschehen einzustufen.

Hierbei ist ein möglicher Erklärungsansatz, dass sich das Immunoediting, das sich bei neoplastischen Geschehen vollzieht, in einer späteren Phase der Immunflucht befindet, so dass

sich die entarteten Zellen der Immunantwort bereits entziehen (76). Dies könnte dazu führen, dass selbst aktivere Lymphozyten keinen Einfluss mehr auf den Krankheitsverlauf ausüben und somit kein Überlebensvorteil entsteht.

Ein zweiter Ansatz berücksichtigt die unterschiedlichen Beobachtungen der Studien von Cretenet et al. und Sukumar et. al. (108,112). Diese Arbeit stützt mit ihren Ergebnissen beide Thesen, wenn man die Vermutung zugrunde legt, dass sich das Immunsystem in frühen Krankheitsstadien aktiv an der Bekämpfung des Karzinoms beteiligt, bei Progression die Lymphozyten jedoch „ausgebrannt“ sind und somit keine Auswirkung auf das weitere Krankheitsgeschehen mehr besitzen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit – insbesondere in Zusammenschau mit den Überlebensdaten – die Bedeutung des eigenen Immunsystems insbesondere der Lymphozyten in Abhängigkeit des Aktivitätsstatus und zytotoxischen Potentials auf das Überleben bei kolorektalen Lebermetastasen gezeigt werden, sodass weitere Untersuchungen der GLUT1-abhängigen bzw. durch GLUT1-verstärkten Mechanismen der Immunantwort innerhalb größerer Versuchsreihen vielversprechend erscheinen, um weitere wirkungsvolle, körpereigene antikanzerogene Effekte nachzuvollziehen und gegebenenfalls therapeutisch nutzen zu können.

Zusammenfassung

Glucose-1-Transporter (GLUT1) spielen eine wichtige Rolle bei der Energieversorgung von Zellen. Zahlreiche Studien konnten nachweisen, dass Malignome – unter anderem das Kolorektale Karzinom – mit einer schlechteren Prognose einhergehen, wenn die Tumorzellen eine erhöhte GLUT1-Expression aufweisen. Da jedoch die Auswirkung einer erhöhten GLUT1-Expression von Immunzellen auf ihre antitumorale Wirkung bisher nicht betrachtet wurde, konzentrierte sich diese Arbeit auf den Einfluss GLUT1-positiver Immunzellen im Infiltrationsrand kolorektaler Lebermetastasen auf das Patientenüberleben. In einer anschließenden Analyse wurden die Unterschiede zwischen GLUT1-positiven und GLUT1-negativen CD8⁺ TEMRA-Zellen betrachtet, die unserer Hypothese nach ausschlaggebend für die verbesserte Prognose sind.

Hierfür wurden zunächst immunhistochemische Färbungen von Gewebeproben von kolorektalen Lebermetastasen auf GLUT1 angefertigt und die GLUT1-Expression mit Hilfe der Patientendatenbank mit dem Patientenüberleben korreliert. Zudem wurden Leukozyten, die aus dem Infiltrationsrand resezierter kolorektaler Lebermetastasen isoliert wurden, mittels Durchflusszytometrie differenziert und die Toxizität CD8⁺ TEMRA-Zellen abhängig von ihrer GLUT1-Expression untersucht.

Eine hohe GLUT1-Expression im Infiltrationsrand war unabhängig von der Proliferationsrate des Tumors mit einem verlängerten Patientenüberleben ($p=0,011$) assoziiert. Eine Verstärkung dieses Effekts konnte in einer Subgruppenanalyse bei Patienten mit singulären Lebermetastasen gezeigt werden. In der Durchflusszytometrie fand sich eine hohe Rate an CD8⁺ TEMRA-Zellen, die eine Tendenz zu einer erhöhten Granzyme B-Konzentration im Vergleich zu den GLUT1-negativen CD8⁺ TEMRA-Zellen aufwiesen. Dies erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ($p=0,06$).

Somit konnte gezeigt werden, dass die GLUT1-Expression der Immunzellen an der immunologischen Barriere zwischen Tumor und Körper positive Effekte auf die körpereigene immunvermittelte Karzinombekämpfung hat, was möglicherweise auf eine stärkere Zytotoxizität der CD8⁺TEMRA-Zellen zurückzuführen ist.

Abkürzungsverzeichnis

*	statistisch signifikant mit $p < 0,05$
μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
A. dest.	Reinstwasser
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen präsentierende Zelle (antigen presenting cell)
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
bzw.	Beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
cm	Zentimeter
CRC	Kolorektales Karzinom (colorectal carcinoma)
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten (cytotoxic T lymphocytes)
Cy2	Carbocyanin
Cy3	Indocarbocyanin
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAPI	4',6-Diamidin-2-phyllindol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence-Activated Cell Scanning = Durchflusszytometrie
FITC	Fluoresceinisothiocyanate
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FSC	Vorwärtslichtstreuung (forward light scatter)
g	Gramm
g	relative Zentrifugalkraft
	$g = 1,118 \times 10^{-5} \text{ rs}^2$, r: Radius in cm, s: Geschwindigkeit in rpm
GLUT	Glucosetransporter
GS	Ziegenserum (goat serum)
h	Stunde
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
Im	Infiltrationsrand (Infiltrative margin)
l	Liter
M	Mittelwert
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)
min	Minute
ml	Milliliter

NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NSCC	nicht kleinzelliges Karzinom (Non Small Cell Carcinoma)
OP	Operation
PAMP	pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular pattern)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PD-L1	Progressed death ligand 1
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
P/S	Penicillin/Streptomycin
RCI	Regensburger Centrum für Interventionelle Immunologie
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
Sd	Stroma distant
SSC	Seitwärtslichtsteuerung (side light scatter)
T _{EM} -Zellen	T Effector Memory Zellen
T _{CM} -Zellen	T Central Memory Zellen
T-TBS	mit TWEEN® versetztes TBS
TBS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid
TEMRA-Zellen	T Effector Memory RA positive Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zellen
TRIS-EDTA	Tris(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid mit EDTA

Tu	Tumor
TWEEN®	Poly(oxy-1,2-ethandiyl)-monododekansäure-sorbitylester
UKR	Universitätsklinikum Regensburg
U.S.A.	Vereinigte Staaten von Amerika (United States of America)
VE-H ₂ O	vollentionisiertes Wasser

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Resektatabschnitte Tumor, Infiltrationsrand und Lebergewebe	31
Abbildung 2: Immunhistochemische Färbung der GLUT1 positiven Zellen	32
Abbildung 3: Kaplan-Meier-Kurven und mittleres Überleben in Monaten in Abhängigkeit der Expressionsintensität von GLUT1 im Tumorgewebe, Infiltrationsrand und Lebergewebe	34
Abbildung 4: Kaplan-Meier-Kurve und Mittleres Überleben in der Subgruppe der Patienten ohne Chemotherapie in Abhängigkeit der GLUT1-Expression im Tumorgewebe.....	35
Abbildung 5: Kaplan-Meier-Kurve und Mittleres Überleben in der Subgruppe der Patienten mit adjuvanter Chemotherapie in Abhängigkeit der GLUT1-Expression im Tumorgewebe	35
Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurve und Mittleres Überleben in der Subgruppe der Patienten mit singulären Metastasen in Abhängigkeit der GLUT1-Expression im Infiltrationsrand	36
Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve und Mittleres Überleben in der Subgruppe der Patienten mit multiplen Metastasen in Abhängigkeit der GLUT1-Expression im Infiltrationsrand.....	36
Abbildung 8: Korrelation zwischen GLUT1- und KI67-Expression	37
Abbildung 9: Immunfluoreszierende immunhistochemische Doppelfärbung CD8/ GLUT1	38
Abbildung 10: Differenzierung der CD4+ und CD8+ Lymphozyten bzw GLUT1+ und GLUT1- CD4+ bzw CD8+ Lymphozyten mittels FACS (FACS2)	39
Abbildung 11: Differenzierungsschema FACS2 Panel 1	42
Abbildung 12: Differenzierungsschema FACS2 Panel 2	43
Abbildung 13: Differenzierungsschema FACS2 Panel 4	44
Abbildung 14: Differenzierungsschema FACS2 Panel 5.	45
Abbildung 15: Differenzierungsschema FACS2 Panel 6	46
Abbildung 16: Differenzierungsschema FACS2 Panel 7	46
Abbildung 17: Differenzierung der Leukozyten in ihre Subpopulationen (FACS2, Panel 1, 7).....	50
Abbildung 18: GLUT1-Positivität der Leukozyten und ihrer Subpopulationen (FACS2, Panel 1).....	50
Abbildung 19: Differenzierung der Zytotoxischen T-Zellen (FACS2, Panel 5)	51
Abbildung 20: GLUT1-Positivität der zytotoxischen T-Zellen und ihrer Subpopulationen (FACS2, Panel 5).....	51
Abbildung 21: Differenzierung der T-Helferzellen in ihre Subpopulationen (FACS2, Panel 5)	52
Abbildung 22: GLUT1-Positivität der T-Helferzellen und ihrer Subpopulationen (FACS2, Panel 5).....	52
Abbildung 23: Differenzierung der zytotoxischen und T-Helferzellen in ihre Subpopulationen (FACS2, Panel 2, 6).....	53
Abbildung 24: Prüfung der zytotoxischen und der T-Helferzellen sowie ihrer Subpopulationen auf GLUT1 Expression (FACS2, Panel 2, 6).....	53
Abbildung 25: Darstellung des IFN γ -, Perforin- bzw Granzym B-positiven Anteils der CD8+ TEMRA Zellen in Abhängigkeit der GLUT1-Positivität.....	55
Abbildung 26: Differenzierung der TEMRA-Zellen (FACS3, Panel 1)	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Antikörper	22
Tabelle 2: Übersicht der FACS-Panels	26
Tabelle 3: Differenzierung der Leukozyten in ihre Subpopulationen mit anteilmäßiger GLUT1-Expression	49
Tabelle 4: Zytotoxizität der CD8 ⁺ TEMRA Zellen	57

References

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49. doi:10.3322/caac.21660 Cited in: PubMed; PMID 33538338.
2. Koch-Institut, Robert. Krebs in Deutschland für 2019/2020; 2023. de.
3. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69–90. doi:10.3322/caac.20107 Cited in: PubMed; PMID 21296855.
4. Chan AT, Giovannucci EL. Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2029–2043.e10. doi:10.1053/j.gastro.2010.01.057 Cited in: PubMed; PMID 20420944.
5. Samadder NJ, Jaspersion K, Burt RW. Hereditary and common familial colorectal cancer: Evidence for colorectal screening. *Dig Dis Sci.* 2015;60(3):734–47. doi:10.1007/s10620-014-3465-z Cited in: PubMed; PMID 25501924.
6. Willett WC. Diet and cancer: An evolving picture. *JAMA.* 2005;293(2):233–4. doi:10.1001/jama.293.2.233 Cited in: PubMed; PMID 15644551.
7. Doubeni CA, Major JM, Laiyemo AO, Schootman M, Zauber AG, Hollenbeck AR, Sinha R, Allison J. Contribution of behavioral risk factors and obesity to socioeconomic differences in colorectal cancer incidence. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104(18):1353–62. doi:10.1093/jnci/djs346 Cited in: PubMed; PMID 22952311.
8. Boyle T, Fritschi L, Tabatabaei SM, Ringwald K, Heyworth JS. Smoking, alcohol, diabetes, obesity, socioeconomic status, and the risk of colorectal cancer in a population-based case-control study. *Cancer Causes Control.* 2014;25(12):1659–68. doi:10.1007/s10552-014-0470-7 Cited in: PubMed; PMID 25301194.
9. Doubeni CA, Laiyemo AO, Major JM, Schootman M, Lian M, Park Y, Graubard BI, Hollenbeck AR, Sinha R. Socioeconomic status and the risk of colorectal cancer: An analysis of more than a half million adults in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. *Cancer.* 2012;118(14):3636–44. doi:10.1002/cncr.26677 Cited in: PubMed; PMID 22898918.
10. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010;60(5):277–300. doi:10.3322/caac.20073 Cited in: PubMed; PMID 20610543.
11. Jaspersion KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2044–58. doi:10.1053/j.gastro.2010.01.054 Cited in: PubMed; PMID 20420945.
12. Harrison TR, Longo DL, editors. *Harrison's principles of internal medicine.* New York, NY: McGraw-Hill Medical; 2012. eng.
13. Brenner H, Chang-Claude J, Seiler CM, Rickert A, Hoffmeister M. Protection from colorectal cancer after colonoscopy: a population-based, case-control study. *Ann Intern Med.* 2011;154(1):22–30. doi:10.7326/0003-4819-154-1-201101040-00004 Cited in: PubMed; PMID 21200035.
14. Robert Koch-Institut (RKI). Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016.
15. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(2):87–108. doi:10.3322/caac.21262 Cited in: PubMed; PMID 25651787.

16. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Smith RA, Brooks D, Andrews KS, Dash C, Giardiello FM, Glick S, Levin TR, Pickhardt P, Rex DK, Thorson A, Winawer SJ. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA Cancer J Clin.* 2008;58(3):130–60. doi:10.3322/CA.2007.0018 Cited in: PubMed; PMID 18322143.
17. Brenner H, Schrotz-King P, Holleczer B, Katalinic A, Hoffmeister M. Declining Bowel Cancer Incidence and Mortality in Germany. *Dtsch Arztebl Int.* 2016;113(7):101–6. doi:10.3238/arztebl.2016.0101 Cited in: PubMed; PMID 26940777.
18. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* 2008;58(2):71–96. doi:10.3322/CA.2007.0010 Cited in: PubMed; PMID 18287387.
19. Weiss L, Grundmann E, Torhorst J, Hartveit F, Moberg I, Eder M, Fenoglio-Preiser CM, Napier J, Horne CH, Lopez MJ. Haematogenous metastatic patterns in colonic carcinoma: an analysis of 1541 necropsies. *J Pathol.* 1986;150(3):195–203. doi:10.1002/path.1711500308 Cited in: PubMed; PMID 3806280.
20. Scheele J, Stangl R, Altendorf-Hofmann A. Hepatic metastases from colorectal carcinoma: Impact of surgical resection on the natural history. *Br J Surg.* 1990;77(11):1241–6. Cited in: PubMed; PMID 2253003.
21. Ruers T, Bleichrodt RP. Treatment of liver metastases, an update on the possibilities and results. *European Journal of Cancer.* 2002;38(7):1023–33. doi:10.1016/S0959-8049(02)00059-X
22. Liu L-X. Current treatment for liver metastases from colorectal cancer. *WJG.* 2003;9(2):193. doi:10.3748/wjg.v9.i2.193
23. Jeong S, Heo JS, Park JY, Choi DW, Choi SH. Surgical resection of synchronous and metachronous lung and liver metastases of colorectal cancers. *Ann Surg Treat Res.* 2017;92(2):82–9. doi:10.4174/ast.2017.92.2.82 Cited in: PubMed; PMID 28203555.
24. Chiappa A, Makuuchi M, Lygidakis NJ, Zbar AP, Chong G, Bertani E, Sitzler PJ, Biffi R, Pace U, Bianchi PP, Contino G, Misitano P, Orsi F, Travaini L, Trifirò G, Zampino MG, Fazio N, Goldhirsch A, Andreoni B. The management of colorectal liver metastases: Expanding the role of hepatic resection in the age of multimodal therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2009;72(1):65–75. doi:10.1016/j.critrevonc.2008.11.003 Cited in: PubMed; PMID 19147371.
25. Ksienski D, Woods R, Speers C, Kennecke H. Patterns of referral and resection among patients with liver-only metastatic colorectal cancer (MCRC). *Ann Surg Oncol.* 2010;17(12):3085–93. doi:10.1245/s10434-010-1304-9 Cited in: PubMed; PMID 20839067.
26. Eisele RM, Chopra SS, Kubale R, Glanemann M. Die Radiofrequenzablation in der Behandlung von kolorektalen Lebermetastasen: Was ist belegt? [Radiofrequency ablation for treatment of colorectal liver metastases: scientific evidence and clinical reality]. *Zentralbl Chir.* 2014;139(2):193–202. ger. doi:10.1055/s-0032-1328595 Cited in: PubMed; PMID 23907842.
27. van Amerongen MJ, Jenniskens SFM, van den Boezem PB, Fütterer JJ, Wilt JHW de. Radiofrequency ablation compared to surgical resection for curative treatment of patients with colorectal liver metastases - a meta-analysis. *HPB (Oxford).* 2017;19(9):749–56. doi:10.1016/j.hpb.2017.05.011 Cited in: PubMed; PMID 28687147.
28. van Cutsem E, Nordlinger B, Adam R, Köhne C-H, Pozzo C, Poston G, Ychou M, Rougier P. Towards a pan-European consensus on the treatment of patients with colorectal liver

- metastases. *Eur J Cancer*. 2006;42(14):2212–21. doi:10.1016/j.ejca.2006.04.012 Cited in: PubMed; PMID 16904315.
29. Folprecht G, Gruenberger T, Bechstein WO, Raab H-R, Lordick F, Hartmann JT, Lang H, Frilling A, Stoecklacher J, Weitz J, Konopke R, Stroszczynski C, Liersch T, Ockert D, Herrmann T, Goekkurt E, Parisi F, Köhne C-H. Tumour response and secondary resectability of colorectal liver metastases following neoadjuvant chemotherapy with cetuximab: The CELIM randomised phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2010;11(1):38–47. doi:10.1016/S1470-2045(09)70330-4
 30. Nordlinger B, van Cutsem E, Rougier P, Köhne C-H, Ychou M, Sobrero A, Adam R, Arvidsson D, Carrato A, Georgoulas V, Giulianti F, Glimelius B, Golling M, Gruenberger T, Tabernero J, Wasan H, Poston G. Does chemotherapy prior to liver resection increase the potential for cure in patients with metastatic colorectal cancer? A report from the European Colorectal Metastases Treatment Group. *Eur J Cancer*. 2007;43(14):2037–45. doi:10.1016/j.ejca.2007.07.017 Cited in: PubMed; PMID 17766104.
 31. Greef K de, Rolfo C, Russo A, Chapelle T, Bronte G, Passiglia F, Coelho A, Papadimitriou K, Peeters M. Multidisciplinary management of patients with liver metastasis from colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2016;22(32):7215–25. doi:10.3748/wjg.v22.i32.7215 Cited in: PubMed; PMID 27621569.
 32. Wang J, Liang P, Yu J, Yu M-A, Liu F, Cheng Z, Yu X. Clinical outcome of ultrasound-guided percutaneous microwave ablation on colorectal liver metastases. *Oncol Lett*. 2014;8(1):323–6. doi:10.3892/ol.2014.2106 Cited in: PubMed; PMID 24959270.
 33. van Tilborg AAJM, Meijerink MR, Sietses C, van Waesberghe JHTM, Mackintosh MO, Meijer S, van Kuijk C, van den Tol P. Long-term results of radiofrequency ablation for unresectable colorectal liver metastases: a potentially curative intervention. *Br J Radiol*. 2011;84(1002):556–65. doi:10.1259/bjr/78268814 Cited in: PubMed; PMID 21159807.
 34. Fiorentini G, Sarti D, Aliberti C, Carandina R, Mambrini A, Guadagni S. Multidisciplinary approach of colorectal cancer liver metastases. *World J Clin Oncol*. 2017;8(3):190–202. doi:10.5306/wjco.v8.i3.190 Cited in: PubMed; PMID 28638789.
 35. Are C, Gonen M, Zazzali K, Dematteo RP, Jarnagin WR, Fong Y, Blumgart LH, D'Angelica M. The impact of margins on outcome after hepatic resection for colorectal metastasis. *Ann Surg*. 2007;246(2):295–300. doi:10.1097/SLA.0b013e31811ea962 Cited in: PubMed; PMID 17667509.
 36. Memeo R, Blasi V de, Adam R, Goéré D, Piardi T, Lermite E, Turrini O, Navarro F, de'Angelis N, Cunha AS, Pessaux P. Margin Status is Still an Important Prognostic Factor in Hepatectomies for Colorectal Liver Metastases: A Propensity Score Matching Analysis. *World J Surg*. 2017. doi:10.1007/s00268-017-4229-7 Cited in: PubMed; PMID 28929341.
 37. Shah SA, Bromberg R, Coates A, Rempel E, Simunovic M, Gallinger S. Survival after liver resection for metastatic colorectal carcinoma in a large population. *J Am Coll Surg*. 2007;205(5):676–83. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2007.06.283 Cited in: PubMed; PMID 17964443.
 38. Abdalla EK, Vauthey J-N, Ellis LM, Ellis V, Pollock R, Broglio KR, Hess K, Curley SA. Recurrence and outcomes following hepatic resection, radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases. *Ann Surg*. 2004;239(6):818-25; discussion 825-7. Cited in: PubMed; PMID 15166961.

39. Cummings LC, Payes JD, Cooper GS. Survival after hepatic resection in metastatic colorectal cancer: A population-based study. *Cancer*. 2007;109(4):718–26. doi:10.1002/cncr.22448 Cited in: PubMed; PMID 17238180.
40. Morris EJA, Forman D, Thomas JD, Quirke P, Taylor EF, Fairley L, Cottier B, Poston G. Surgical management and outcomes of colorectal cancer liver metastases. *Br J Surg*. 2010;97(7):1110–8. doi:10.1002/bjs.7032 Cited in: PubMed; PMID 20632280.
41. Tomlinson JS, Jarnagin WR, Dematteo RP, Fong Y, Kornprat P, Gonen M, Kemeny N, Brennan MF, Blumgart LH, D'Angelica M. Actual 10-year survival after resection of colorectal liver metastases defines cure. *J Clin Oncol*. 2007;25(29):4575–80. doi:10.1200/JCO.2007.11.0833 Cited in: PubMed; PMID 17925551.
42. Wei AC, Greig PD, Grant D, Taylor B, Langer B, Gallinger S. Survival after hepatic resection for colorectal metastases: A 10-year experience. *Ann Surg Oncol*. 2006;13(5):668–76. doi:10.1245/ASO.2006.05.039 Cited in: PubMed; PMID 16523369.
43. Chua TC, Saxena A, Chu F, Zhao J, Morris DL. Predictors of cure after hepatic resection of colorectal liver metastases: an analysis of actual 5- and 10-year survivors. *J Surg Oncol*. 2011;103(8):796–800. doi:10.1002/jso.21864 Cited in: PubMed; PMID 21246567.
44. Henkart PA, Catalfamo M. CD8+ effector cells. *Adv Immunol*. 2004;83:233–52. doi:10.1016/S0065-2776(04)83007-4 Cited in: PubMed; PMID 15135633.
45. Bruno L, Kirberg J, Boehmer H v. On the cellular basis of immunological T cell memory. *Immunity*. 1995;2(1):37–43. Cited in: PubMed; PMID 7600301.
46. Bannard O, Kraman M, Fearon DT. Secondary replicative function of CD8+ T cells that had developed an effector phenotype. *Science*. 2009;323(5913):505–9. doi:10.1126/science.1166831 Cited in: PubMed; PMID 19164749.
47. Lefrançois L, Obar JJ. Once a killer, always a killer: From cytotoxic T cell to memory cell. *Immunol Rev*. 2010;235(1):206–18. doi:10.1111/j.0105-2896.2010.00895.x. Cited in: PubMed; PMID 20536565.
48. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: Fates, functions, and faults. *Blood*. 2008;112(5):1557–69. doi:10.1182/blood-2008-05-078154 Cited in: PubMed; PMID 18725574.
49. Williams MA, Tyznik AJ, Bevan MJ. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature*. 2006;441(7095):890–3. doi:10.1038/nature04790 Cited in: PubMed; PMID 16778891.
50. Murphy KM, Weaver C. *Janeway's immunobiology*. 9th ed. New York, London: GS Garland Science Taylor & Francis Group; 2017. 904 p. eng.
51. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996;383(6603):787–93. doi:10.1038/383787a0 Cited in: PubMed; PMID 8893001.
52. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145–73. doi:10.1146/annurev.iy.07.040189.001045 Cited in: PubMed; PMID 2523712.
53. Agrewala JN, Suvas S, Singh V, Vohra H. Delivery of antigen in allogeneic cells preferentially generates CD(4+) Th1 cells. *Clin Exp Immunol*. 2003;134(1):13–22. Cited in: PubMed; PMID 12974749.

54. Piccirillo CA, Shevach EM. Naturally-occurring CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance. *Semin Immunol.* 2004;16(2):81–8. doi:10.1016/j.smim.2003.12.003 Cited in: PubMed; PMID 15036231.
55. Fehérvári Z, Sakaguchi S. Development and function of CD25+CD4+ regulatory T cells. *Curr Opin Immunol.* 2004;16(2):203–8. doi:10.1016/j.coi.2004.01.004 Cited in: PubMed; PMID 15023414.
56. Parker DC. The functions of antigen recognition in T cell-dependent B cell activation. *Semin Immunol.* 1993;5(6):413–20. doi:10.1006/smim.1993.1047 Cited in: PubMed; PMID 8123796.
57. Baumgarth N. A two-phase model of B-cell activation. *Immunol Rev.* 2000;176:171–80. Cited in: PubMed; PMID 11043776.
58. Kaufmann SHE. *Basiswissen Immunologie.* Berlin u.a.: Springer; 2014. XI, 133 S. (Springer-Lehrbuch).
59. Rooney MS, Shukla SA, Wu CJ, Getz G, Hacohen N. Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell.* 2015;160(1-2):48–61. doi:10.1016/j.cell.2014.12.033 Cited in: PubMed; PMID 25594174.
60. Zamarron BF, Chen W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *Int J Biol Sci.* 2011;7(5):651–8. Cited in: PubMed; PMID 21647333.
61. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004;10(9):942–9. doi:10.1038/nm1093 Cited in: PubMed; PMID 15322536.
62. Guo F, Wang Y, Liu J, Mok SC, Xue F, Zhang W. CXCL12/CXCR4: A symbiotic bridge linking cancer cells and their stromal neighbors in oncogenic communication networks. *Oncogene.* 2016;35(7):816–26. doi:10.1038/onc.2015.139 Cited in: PubMed; PMID 25961926.
63. Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, Greenberg PD. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: In vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(25):16168–73. doi:10.1073/pnas.242600099 Cited in: PubMed; PMID 12427970.
64. Alexander RB, Rosenberg SA. Long-term survival of adoptively transferred tumor-infiltrating lymphocytes in mice. *J Immunol.* 1990;145(5):1615–20. Cited in: PubMed; PMID 1974569.
65. Maeda H, Shiraishi A. TGF-beta contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice. *J Immunol.* 1996;156(1):73–8. Cited in: PubMed; PMID 8598496.
66. Street SE, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood.* 2001;97(1):192–7. doi:10.1182/blood.V97.1.192 Cited in: PubMed; PMID 11133760.
67. Cullen SP, Brunet M, Martin SJ. Granzymes in cancer and immunity. *Cell Death Differ.* 2010;17(4):616–23. doi:10.1038/cdd.2009.206 Cited in: PubMed; PMID 20075940.

68. Bolitho P, Voskoboinik I, Trapani JA, Smyth MJ. Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Curr Opin Immunol.* 2007;19(3):339–47. doi:10.1016/j.coi.2007.04.007 Cited in: PubMed; PMID 17442557.
69. Kägi D, Ledermann B, Bürki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, Podack ER, Zinkernagel RM, Hengartner H. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature.* 1994;369(6475):31–7. doi:10.1038/369031a0 Cited in: PubMed; PMID 8164737.
70. Pardo J, Bosque A, Brehm R, Wallich R, Naval J, Müllbacher A, Anel A, Simon MM. Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. *J Cell Biol.* 2004;167(3):457–68. doi:10.1083/jcb.200406115 Cited in: PubMed; PMID 15534000.
71. Lin C-F, Lin C-M, Lee K-Y, Wu S-Y, Feng P-H, Chen K-Y, Chuang H-C, Chen C-L, Wang Y-C, Tseng P-C, Tsai T-T. Escape from IFN- γ -dependent immunosurveillance in tumorigenesis. *J Biomed Sci.* 2017;24(1):10. doi:10.1186/s12929-017-0317-0 Cited in: PubMed; PMID 28143527.
72. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: An overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004;75(2):163–89. doi:10.1189/jlb.0603252 Cited in: PubMed; PMID 14525967.
73. Mandai M, Hamanishi J, Abiko K, Matsumura N, Baba T, Konishi I. Dual Faces of IFN γ in Cancer Progression: A Role of PD-L1 Induction in the Determination of Pro- and Antitumor Immunity. *Clin Cancer Res.* 2016;22(10):2329–34. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0224 Cited in: PubMed; PMID 27016309.
74. Propper DJ, Chao D, Braybrooke JP, Bahl P, Thavasus P, Balkwill F, Turley H, Dobbs N, Gatter K, Talbot DC, Harris AL, Ganesan TS. Low-dose IFN-gamma induces tumor MHC expression in metastatic malignant melanoma. *Clin Cancer Res.* 2003;9(1):84–92. Cited in: PubMed; PMID 12538455.
75. Talmadge JE, Black PL, Tribble H, Pennington R, Bowersox O, Schneider M, Phillips H. Preclinical approaches to the treatment of metastatic disease: Therapeutic properties of rH TNF, rM IFN-gamma, and rH IL-2. *Drugs Exp Clin Res.* 1987;13(6):327–37. Cited in: PubMed; PMID 3115744.
76. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002;3(11):991–8. doi:10.1038/ni1102-991 Cited in: PubMed; PMID 12407406.
77. Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature.* 2001;413(6852):165–71. doi:10.1038/35093109 Cited in: PubMed; PMID 11557981.
78. Sgadari C, Angiolillo AL, Tosato G. Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. *Blood.* 1996;87(9):3877–82. Cited in: PubMed; PMID 8611715.
79. Coughlin CM, Salhany KE, Gee MS, LaTemple DC, Kotenko S, Ma X, Gri G, Wysocka M, Kim JE, Liu L, Liao F, Farber JM, Pestka S, Trinchieri G, Lee WM. Tumor cell responses to IFN γ affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis. *Immunity.* 1998;9(1):25–34. Cited in: PubMed; PMID 9697833.
80. Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc P-H, Trajanoski Z, Fridman W-H, Galon

- J. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2005;353(25):2654–66. doi:10.1056/NEJMoa051424 Cited in: PubMed; PMID 16371631.
81. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc P-H, Trajanoski Z, Fridman W-H, Pagès F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960–4. doi:10.1126/science.1129139 Cited in: PubMed; PMID 17008531.
 82. Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, Ohtani H. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998;58(16):3491–4. Cited in: PubMed; PMID 9721846.
 83. Pagès F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, Lagorce C, Wind P, Marliot F, Bruneval P, Zatloukal K, Trajanoski Z, Berger A, Fridman W-H, Galon J. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(35):5944–51. doi:10.1200/JCO.2008.19.6147 Cited in: PubMed; PMID 19858404.
 84. Brunner SM, Kesselring R, Rubner C, Martin M, Jeiter T, Boerner T, Ruemmele P, Schlitt HJ, Fichtner-Feigl S. Prognosis according to histochemical analysis of liver metastases removed at liver resection. *Br J Surg*. 2014;101(13):1681–91. doi:10.1002/bjs.9627 Cited in: PubMed; PMID 25331841.
 85. Xiang R, Lode HN, Gillies SD, Reisfeld RA. T cell memory against colon carcinoma is long-lived in the absence of antigen. *J Immunol*. 1999;163(7):3676–83. Cited in: PubMed; PMID 10490962.
 86. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, Berger A, Bruneval P, Fridman W-H, Pagès F, Galon J. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res*. 2011;71(4):1263–71. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2907 Cited in: PubMed; PMID 21303976.
 87. Augustin R. The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life*. 2010;62(5):315–33. doi:10.1002/iub.315 Cited in: PubMed; PMID 20209635.
 88. Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;298(2):E141-5. doi:10.1152/ajpendo.00712.2009 Cited in: PubMed; PMID 20009031.
 89. Carruthers A, DeZutter J, Ganguly A, Devaskar SU. Will the original glucose transporter isoform please stand up! *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297(4):E836-48. doi:10.1152/ajpendo.00496.2009 Cited in: PubMed; PMID 19690067.
 90. Joost H-G, Bell GI, Best JD, Birnbaum MJ, Charron MJ, Chen YT, Doege H, James DE, Lodish HF, Moley KH, Moley JF, Mueckler M, Rogers S, Schürmann A, Seino S, Thorens B. Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;282(4):E974-6. doi:10.1152/ajpendo.00407.2001 Cited in: PubMed; PMID 11882521.
 91. Mueckler M, Thorens B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med*. 2013;34(2-3):121–38. doi:10.1016/j.mam.2012.07.001 Cited in: PubMed; PMID 23506862.
 92. Mueckler M, Caruso C, Baldwin S, Panico M, Blench I, Morris H, Allard W, Lienhard G, Lodish H. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science*. 1985;229(4717):941–5. doi:10.1126/science.3839598

93. Kasahara M, Hinkle PC. Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes. *J Biol Chem.* 1977;252(20):7384–90. Cited in: PubMed; PMID 903365.
94. Rumsey SC, Kwon O, Xu GW, Burant CF, Simpson I, Levine M. Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. *J Biol Chem.* 1997;272(30):18982–9. Cited in: PubMed; PMID 9228080.
95. Liu Q, Vera JC, Peng H, Golde DW. The Predicted ATP-Binding Domains in the Hexose Transporter GLUT1 Critically Affect Transporter Activity †. *Biochemistry.* 2001;40(26):7874–81. doi:10.1021/bi002850x
96. Luiken, Joost J F P, Coort SLM, Koonen DPY, van der Horst, Dick J, Bonen A, Zorzano A, Glatz JFC. Regulation of cardiac long-chain fatty acid and glucose uptake by translocation of substrate transporters. *Pflugers Arch.* 2004;448(1):1–15. doi:10.1007/s00424-003-1199-4 Cited in: PubMed; PMID 14872244.
97. Gorga FR, Lienhard GE. Changes in the intrinsic fluorescence of the human erythrocyte monosaccharide transporter upon ligand binding. *Biochemistry.* 1982;21(8):1905–8. Cited in: PubMed; PMID 7200802.
98. Deng D, Xu C, Sun P, Wu J, Yan C, Hu M, Yan N. Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature.* 2014;510(7503):121–5. doi:10.1038/nature13306 Cited in: PubMed; PMID 24847886.
99. Simpson IA, Vannucci SJ, Maher F. Glucose transporters in mammalian brain. *Biochm. Soc. Trans.* 1994;22(3):671–5. doi:10.1042/bst0220671
100. Pessin JE, Bell GI. Mammalian facilitative glucose transporter family: structure and molecular regulation. *Annu Rev Physiol.* 1992;54:911–30. doi:10.1146/annurev.ph.54.030192.004403 Cited in: PubMed; PMID 1562197.
101. Egert S, Nguyen N, Schwaiger M. Myocardial glucose transporter GLUT1: translocation induced by insulin and ischemia. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31(7):1337–44. doi:10.1006/jmcc.1999.0965 Cited in: PubMed; PMID 10403751.
102. Fischer Y, Thomas J, Sevilla L, Muñoz P, Becker C, Holman G, Kozka IJ, Palacín M, Testar X, Kammermeier H, Zorzano A. Insulin-induced recruitment of glucose transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in isolated rat cardiac myocytes. Evidence of the existence of different intracellular GLUT4 vesicle populations. *J Biol Chem.* 1997;272(11):7085–92. Cited in: PubMed; PMID 9054401.
103. Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem.* 2001;276(12):9519–25. doi:10.1074/jbc.M010144200 Cited in: PubMed; PMID 11120745.
104. Simpson IA, Appel NM, Hokari M, Oki J, Holman GD, Maher F, Koehler-Stec EM, Vannucci SJ, Smith QR. Blood-Brain Barrier Glucose Transporter. *Journal of Neurochemistry.* 1999;72(1):238–47. doi:10.1046/j.1471-4159.1999.0720238.x
105. Michalek RD, Gerriets VA, Jacobs SR, Macintyre AN, MacIver NJ, Mason EF, Sullivan SA, Nichols AG, Rathmell JC. Cutting edge: Distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4⁺ T cell subsets. *J Immunol.* 2011;186(6):3299–303. doi:10.4049/jimmunol.1003613 Cited in: PubMed; PMID 21317389.

106. Frauwirth KA, Thompson CB. Regulation of T Lymphocyte Metabolism. *J Immunol.* 2004;172(8):4661–5. doi:10.4049/jimmunol.172.8.4661
107. MacIver NJ, Jacobs SR, Wieman HL, Wofford JA, Coloff JL, Rathmell JC. Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. *J Leukoc Biol.* 2008;84(4):949–57. doi:10.1189/jlb.0108024 Cited in: PubMed; PMID 18577716.
108. Cretenet G, Clerc I, Matias M, Loisel S, Craveiro M, Oburoglu L, Kinet S, Mongellaz C, Dardalhon V, Taylor N. Cell surface Glut1 levels distinguish human CD4 and CD8 T lymphocyte subsets with distinct effector functions. *Sci Rep.* 2016;624129. doi:10.1038/srep24129 Cited in: PubMed; PMID 27067254.
109. Maratou E, Dimitriadis G, Kollias A, Boutati E, Lambadiari V, Mitrou P, Raptis SA. Glucose transporter expression on the plasma membrane of resting and activated white blood cells. *Eur J Clin Invest.* 2007;37(4):282–90. doi:10.1111/j.1365-2362.2007.01786.x Cited in: PubMed; PMID 17373964.
110. Wofford JA, Wieman HL, Jacobs SR, Zhao Y, Rathmell JC. IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival. *Blood.* 2008;111(4):2101–11. doi:10.1182/blood-2007-06-096297 Cited in: PubMed; PMID 18042802.
111. Chakrabarti R, Jung CY, Lee TP, Liu H, Mookerjee BK. Changes in glucose transport and transporter isoforms during the activation of human peripheral blood lymphocytes by phytohemagglutinin. *J Immunol.* 1994;152(6):2660–8. Cited in: PubMed; PMID 8144874.
112. Sukumar M, Liu J, Ji Y, Subramanian M, Crompton JG, Yu Z, Roychoudhuri R, Palmer DC, Muranski P, Karoly ED, Mohny RP, Klebanoff CA, Lal A, Finkel T, Restifo NP, Gattinoni L. Inhibiting glycolytic metabolism enhances CD8+ T cell memory and antitumor function. *J Clin Invest.* 2013;123(10):4479–88. doi:10.1172/JCI69589 Cited in: PubMed; PMID 24091329.
113. Ganapathy V, Thangaraju M, Prasad PD. Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond. *Pharmacol Ther.* 2009;121(1):29–40. doi:10.1016/j.pharmthera.2008.09.005 Cited in: PubMed; PMID 18992769.
114. Yamamoto T, Seino Y, Fukumoto H, Koh G, Yano H, Inagaki N, Yamada Y, Inoue K, Manabe T, Imura H. Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;170(1):223–30. Cited in: PubMed; PMID 2372287.
115. Feng W, Cui G, Tang C-W, Zhang X-L, Dai C, Xu Y-Q, Gong H, Xue T, Guo H-H, Bao Y. Role of glucose metabolism related gene GLUT1 in the occurrence and prognosis of colorectal cancer. *Oncotarget.* 2017;8(34):56850–7. doi:10.18632/oncotarget.18090 Cited in: PubMed; PMID 28915636.
116. Haber RS, Rathan A, Weiser KR, Pritsker A, Itzkowitz SH, Bodian C, Slater G, Weiss A, Burstein DE. GLUT1 glucose transporter expression in colorectal carcinoma: A marker for poor prognosis. *Cancer.* 1998;83(1):34–40. doi:10.1002/(sici)1097-0142(19980701)83:1<34:aid-cncr5>3.0.co;2-e Cited in: PubMed; PMID 9655290.
117. Tan Z, Yang C, Zhang X, Zheng P, Shen W. Expression of glucose transporter 1 and prognosis in non-small cell lung cancer: A pooled analysis of 1665 patients. *Oncotarget.* 2017;8(37):60954–61. doi:10.18632/oncotarget.17604 Cited in: PubMed; PMID 28977837.
118. Furudoi A, Tanaka S, Haruma K, Yoshihara M, Sumii K, Kajiyama G, Shimamoto F. Clinical significance of human erythrocyte glucose transporter 1 expression at the deepest invasive site

- of advanced colorectal carcinoma. *Oncology*. 2001;60(2):162–9. doi:10.1159/000055314 Cited in: PubMed; PMID 11244332.
119. Younes M, Lechago LV, Lechago J. Overexpression of the human erythrocyte glucose transporter occurs as a late event in human colorectal carcinogenesis and is associated with an increased incidence of lymph node metastases. *Clin Cancer Res*. 1996;2(7):1151–4. Cited in: PubMed; PMID 9816281.
 120. Trapani JA, Sutton VR. Granzyme B: Pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions. *Curr Opin Immunol*. 2003;15(5):533–43. doi:10.1016/S0952-7915(03)00107-9
 121. Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:323–70. doi:10.1146/annurev.immunol.20.100201.131730 Cited in: PubMed; PMID 11861606.
 122. Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, Erten G, Deniz G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol*. 2009;254(2):149–54. doi:10.1016/j.cellimm.2008.08.007 Cited in: PubMed; PMID 18835598.
 123. Liew FY, Girard J-P, Turnquist HR. Interleukin-33 in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(11):676–89. doi:10.1038/nri.2016.95 Cited in: PubMed; PMID 27640624.
 124. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of Interferon- γ During Innate and Adaptive Immune Responses. In: Elsevier; 2007. p. 41–101. (Advances in Immunology; vol. 96).
 125. statistisches Bundesamt. Bevölkerung und Erwerbstätigkeit: Natürliche Bevölkerungsbewegung. 2017.
 126. Barnes B, editor. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Berlin: Robert Koch-Institut; November 2016. 269 p. ger.
 127. Barresi V, Reggiani Bonetti L, Branca G, Di Gregorio C, Ponz de Leon M, Tuccari G. Colorectal carcinoma grading by quantifying poorly differentiated cell clusters is more reproducible and provides more robust prognostic information than conventional grading. *Virchows Archiv*. 2012;461(6):621–8. doi:10.1007/s00428-012-1326-8
 128. Ryan É, Khaw YL, Creavin B, Geraghty R, Ryan EJ, Gibbons D, Hanly A, Martin ST, O'Connell PR, Winter DC, Sheahan K. Tumor Budding and PDC Grade Are Stage Independent Predictors of Clinical Outcome in Mismatch Repair Deficient Colorectal Cancer. *Am J Surg Pathol*. 2018;42(1):60–8. doi:10.1097/PAS.0000000000000931 Cited in: PubMed; PMID 29112018.
 129. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311:AID-JCP1>3.0.CO;2-9
 130. Luo Z-W, Zhu M-G, Zhang Z-Q, Ye F-J, Huang W-H, Luo X-Z. Increased expression of Ki-67 is a poor prognostic marker for colorectal cancer patients: A meta analysis. *BMC Cancer*. 2019;19(1):123. doi:10.1186/s12885-019-5324-y Cited in: PubMed; PMID 30727976.
 131. Goshen E, Davidson T, Zwas ST, Aderka D. PET/CT in the evaluation of response to treatment of liver metastases from colorectal cancer with bevacizumab and irinotecan. *Technol Cancer Res Treat*. 2006;5(1):37–43. doi:10.1177/153303460600500105 Cited in: PubMed; PMID 16417400.
 132. Tan MCB, Linehan DC, Hawkins WG, Siegel BA, Strasberg SM. Chemotherapy-induced normalization of FDG uptake by colorectal liver metastases does not usually indicate complete pathologic response. *J Gastrointest Surg*. 2007;11(9):1112–9. doi:10.1007/s11605-007-0218-8 Cited in: PubMed; PMID 17623263.

133. Mulyawan IM. Role of Ki67 protein in colorectal cancer. *Int J Res Med Sci.* 2019;7(2):644. doi:10.18203/2320-6012.ijrms20190374
134. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 2004;21(2):137–48. doi:10.1016/j.immuni.2004.07.017 Cited in: PubMed; PMID 15308095.

