

p33ING1b und p29ING4
Tumorsuppressorproteine beim Nierenzellkarzinom:
Analyse T-Zell-vermittelter Tumormimmunantworten

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians Universität Würzburg

vorgelegt von
Ekaterina Nichiporuk

geboren in Tschita,
Russische Föderation

Würzburg 2007

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin J. Müller

Gutachter: Prof. Dr. Ana-Maria Waaga-Gasser

Gutachter: Prof. Dr. Manfred Scharl

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Meiner Mutter

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Prof. h.c. Arnuld Tiede, dem Direktor der Chirurgischen Klinik I, danke ich dafür, dass er mir die Durchführung des praktischen Teils dieser Arbeit ermöglichte.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Ana-Maria Waaga-Gasser für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas sowie für die hervorragenden Arbeitsbedingungen. Sie hat durch ihre fachliche Unterstützung, zahlreiche wertvolle Anregungen und große menschliche Wärme wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ihr stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und ihre ansteckende Begeisterung lieferten mir immer wieder neuen Ansporn.

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Riedmiller und Herrn Dr. F. Hillig für das zur Verfügung gestellte humane Tumormaterial und die Bereitstellung klinischer Daten.

Weiterhin gilt mein ganz besonderer Dank Herrn PD Dr. Martin Gasser für die engagierte Betreuung, seinen fachkundigen Rat und seine permanente Diskussionsbereitschaft.

Ich danke ganz herzlich Herrn Dr. Martin Grimm für die Hilfe bei der Immunhistologie. Ich danke Frau Ulrike Faber für die Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit. Mein Dank gilt Frau Andrea Trumpfheller für die wertvollen Ratschläge und ihre Hilfsbereitschaft. Frau Sabine Müller danke ich für die Betreuung bei den molekularbiologischen Techniken. Ebenso möchte ich Frau Mariola Dragan für die engagierte Unterstützung bei praktischen Aufgaben danken.

Allen Mitdoktoranden und Mitdoktorandinnen möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit danken.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt unterstützt.

Zusammenfassung

Die Tumorsuppressorproteine p33ING1b und p29ING4 (*Inhibitor of Growth*, ING) verhindern normalerweise die Entwicklung bestimmter Tumorarten, indem sie einen Transkriptionskomplex mit dem Tumorsuppressorgen p53 bilden. Dieser ist für die Aktivierung p53-abhängiger Gene erforderlich und vermittelt Wachstumsstillstand, replikative Seneszenz, Apoptose und DNA-Reparatur. Es wurde gezeigt, dass die Aktivität von p53 durch Überexpression von p29ING4 über Aktivierung von p21/waf1 Promotoren moduliert wird. Die Assoziation von ING mit p53 und die ING-vermittelte Acetylierung von p53 stellen dabei verschiedene Mechanismen dar, durch die ING Proteine p53 stabilisieren und die p53-zellulären Antworten auf genschädigenden Stress und apoptotische Stimuli verstärken.

Die ING1b und ING4 Gene sind nach der Demonstration hoher Expressionswerte in verschiedenen Tumoren in den Mittelpunkt der Tumorforschung gerückt. Zudem hat die Immunogenität des p33ING1b Proteins in Patientinnen mit einem Mammakarzinom ihre potentielle Bedeutung für die Diagnose und eine auf dem Prinzip der Vakzinierung basierende Behandlung demonstriert.

Das Nierenzellkarzinom ist das dritthäufigste urologische Malignom und macht ca. 3% aller bösartigen Tumoren aus. Die einzige kurative Therapie des Nierenzellkarzinoms ist die frühzeitige Diagnose und Entfernung des Primärtumors. Bislang gibt es keine wirkungsvolle Chemotherapie für diese Tumorart. Sämtliche chemotherapeutischen Ansätze, die *in vitro* eine abtötende Wirkung auf das Tumorzellwachstum zeigten, führten *in vivo* zu keinem längerfristigen Effekt eines verbesserten tumorrelevanten Überlebens der Patienten.

Häufig wird das Nierenzellkarzinom von einer großen Anzahl mononukleärer Zellen einschließlich T-Lymphozyten, NK-Zellen und Makrophagen infiltriert. Dabei wurde für frühe Tumorstadien in der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Serumkonzentration an IL-2 und dessen Rezeptor (IL-2R) gezeigt, die auf eine erhöhte T-Zellproliferation und Aktivierung der Immunantwort im Tumorpatienten hindeutet. Eine verstärkte Expression von Zytokinen wie IFN- γ und TNF- α neben IL-2 im Serum weist, wie nachgewiesen, auf eine verstärkte Aktivierung von Th1 und zytotoxischen Tc1 Zellen im Tumorpatienten hin.

Im Tumorgewebe selber akkumulieren T-Zellen in den Anfangsstadien des Nierenzellkarzinoms. Dies lässt eine lokale Tumorimmunantwort vermuten. Im peripheren Blut von Patienten später Stadien weisen die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch auf eine stadienabhängige Abschwächung der gegen den Tumor gerichteten Th1-Antwort und eine Stärkung der Th2/Treg-Antwort mit supprimierender Auswirkung auf die Tumor-Immunabwehr hin. In fortgeschrittenen Tumorstadien bedeutet dies eine zunehmend inaktive Tumorimmunantwort. Intratumoral überwogen sowohl IL-10 positive CD4+ und CD8+ als auch IL-2 positive CD8+ T-Zellen, von denen immunsuppressive Effekte auf die Tumorimmunantwort vermutet werden. Möglicherweise entsteht durch eine Verschiebung im Zellverhältnis von zytotoxischen und T-Helferzellen gegenüber supprimierenden und regulatorischen Zellen ein Selektionsvorteil für das weitere Tumorwachstum. So wäre eine zytotoxische Immunantwort gegen den Tumor zunehmend ineffektiv.

Parallel zu einer erhöhten Konzentration an TNF- α zeigte sich im Serum der Tumorpatienten eine erhöhte Expression der Rezeptoren TNFR I und TNFR II. Zusammen mit den Ergebnissen aus dem TUNEL-Assay wies dies bei Tumorprogression auf eine zunehmende Anzahl apoptotischer T-Zellen hin. Interessanterweise zeigten nicht alle TNFR I-positiven PBLs ein positives TUNEL-Ergebnis. Verglichen mit den PBLs wiesen Lymphozyten im Tumor eine erhöhte Anzahl TNFR I- und TUNEL-positiver CD4+ und CD8+ Zellen auf, was auf ein apoptotisches Mikromilieu für T-Zellen im Tumor hindeutet.

Immunologische Therapieansätze stellen wegen der Möglichkeit eines selektiven Angriffs auf Tumorzellen ein attraktives Konzept dar. Diese Arbeit zeigt, dass etwa 40% der untersuchten Patienten früher wie auch später Stadien eine signifikante Überexpression des ING1b Gens und über 30% eine signifikante Überexpression des ING4 Gens aufwiesen. Anschaulich wurde dazu die Präsentation beider Proteine über MHC Klasse I und II Komplexe im Tumorgewebe bei fehlender Nachweisbarkeit im normalen Nierenparenchym morphologisch demonstriert. Eine zytotoxische CD8+ sowie CD4+ T-Zell-Tumorimmunantwort gegen diese im Tumor selektiv überexprimierten Proteine könnte sich somit als ein attraktives Therapieziel erweisen.

Zur Charakterisierung typischer HLA-Klasse I und -II Expressionsmuster der Tumorpatienten bedarf es aus epidemiologischen Gründen großer Patientenkollektive und eines Vergleichs mit der Normalbevölkerung. In der in begrenztem Umfang, da nicht thematischer

Schwerpunkt der Arbeit, durchgeführten HLA-Analyse zeigte sich für die untersuchten HLA-A, -B und -C sowie HLA-DRA und -DRB Antigene im untersuchten Patientenkollektiv eine heterogene Genexpression.

Der für verschiedenen Tumoren beschriebene Verlust von HLA Klasse I Molekülen auf der Tumorzelloberfläche stellt offensichtlich keine Allgemeingültigkeit dar. Beim Nierenzellkarzinom ist diese Beobachtung nach der eigenen Datenlage nicht unbedingt mit einem oft diskutierten *Escape*-Mechanismus gleichzusetzen. Eine Überexpression von HLA Klasse I Molekülen sowie eine Expression von HLA Klasse II Molekülen im Nierentumor, wie in der vorliegenden Arbeit molekulargenetisch aufgezeigt, könnte die Präsentation von Tumorantigenen im Tumor selbst vorstellbar erscheinen lassen und zu einer wirkungsvollen Immunantwort beitragen. Bei der durchgeführten Real-Time PCR-Analyse konnte allerdings nur die Expression von HLA-Molekülen auf Tumorzellen und infiltrierenden Immunzellen im Tumorbett analysiert werden. Parallele immunhistologische Untersuchungen weisen jedoch auf eine MHC-Expression auf Tumorzellen auch in fortgeschrittenen Tumorstadien hin. Dagegen zeigten sämtliche Patienten früher Stadien und 75% fortgeschrittener Tumoren eine signifikant herabregulierte HLA-G Expression auf. Die Bedeutung des HLA-Genmoleküls für das Nierenzellkarzinom bleibt unklar, für andere Tumorentitäten wird es derzeit kontrovers diskutiert. Dessen Überexpression könnte sich als ein Selektionsvorteil für den Tumor herausstellen.

Die Tatsache, dass sowohl im Tumor als auch im peripheren Blut p29ING4-positive T-Zellen nachweisbar sind, und dass diese Zellen in fortgeschrittenen Tumorstadien abnehmen, wurde in dieser Arbeit eindrücklich gezeigt. Dabei war der Anteil p29ING4-positiver CD4+ T-Zellen in frühen Tumoren größer als der spezifischer CD8+ T-Zellen. Dabei könnte es sich vermutlich um CD4+ T-Helferzellen und CD8+ zytotoxische T-Zellen handeln. Die Sequenz p29ING4 aa 149-158 bewirkte eine IL-2-Antwort and war für eine verstärkte Expression des IFN- γ in PBLs von Patienten früher Stadien bedeutsam. Sie löste dazu nur eine geringe IL-10-Antwort aus. Dies deutet auf eine stimulierende Rolle dieses p29ING4 Epitops für die Induktion einer zytotoxischen Tc1- aber auch einer Th1-vermittelten T-Zellantwort in den PBLs der Tumorpatienten hin.

Schlussfolgernd wäre die therapeutische Effizienz des identifizierten p29ING4 Epitops für eine Immuntherapie klinisch zu überprüfen. Möglicherweise stellt eine auf p29ING4-basierte

Immuntherapie in Kombination mit CTLs, die durch eine begleitende Zytokintherapie (z.B. INF- α und IL-2) aktiviert werden, bei Patienten mit p29ING4-überexprimierenden Nierentumoren ein wirksames immunologisches Therapiekonzept für die Zukunft dar.

Summary

The tumor suppressor proteins p33ING1b and p29ING4 (Inhibitor of Growth, ING) were originally identified as negative cell growth regulators *due to* the formation of a transcriptional complex with the tumor suppressor p53 that is required for the activation of p53-responsive genes and mediates growth arrest, replicative senescence, apoptosis and DNA repair. It has also been demonstrated that p29ING4 overexpression modulates p53 activity through activation of p21/waf1 promoters. The association of ING with p53 and ING-mediated acetylation of p53 present diverse mechanisms through which ING proteins may stabilize p53 and enhance the p53 cellular responses to genotoxic stress and apoptotic stimuli. ING1b and ING4 genes has been of interest in cancer research after the demonstration of high expression levels in various tumors. In addition, p33ING1b immunogenicity in patients with breast cancer has raised the potential value of p33ING1b in diagnosis and vaccine based treatment.

Renal cell carcinoma (RCC) is the third most common neoplasm of the urogenitary tract and counts for 3% of all malignancies. The incidence of the disease is increasing yearly. There is no internationally standardized treatment regimen for advanced tumor stages and the only curative option for localized tumors is to diagnose and to perform a radical nephrectomy in an early stage of the disease as the RCC is known to be highly chemo-/radioresistant. Some chemotherapeutical procedures show cytotoxic effects on tumor cells *in vitro* but no significant impact in regard of prolonged tumor related survival.

Recent data show that the RCC is often infiltrated by a variable amount of cellular infiltrates composed of T cells, NK cells and macrophages. An increased expression of cytokines like IL-2 and its receptor IL-2R in the serum of the patients as demonstrated in this thesis points to an enhanced level of immunological activation during early stages of the tumor development. A significant increase in the expression of further cytokines like IFN- γ and TNF- α together with IL-2 may support this hypothesis of early activation of T cells like T helper 1 (Th1) and cytotoxic Tc1 cells at early stages of the tumor development.

As demonstrated in this thesis an increasing amount of tumor infiltrating T cells in early stages show significant *in vitro* reactivity against tumor antigen indicating a peripheral tumor immune response. However, conclusive data also show that in advanced tumor stages the

type-1 response, indicative for tumor destruction, decreased whereas the type-2 response, indicative for regulatory or suppressive immune responses, increased. This suggests an increasingly ineffective tumor immune response during later stages of the disease. Indeed, the data presented in this thesis show a further diminished tumor immune response in RCC patients in advanced stages. CD4+ and CD8+ tumor-infiltrating cells, double positive for IL-10, as well as IL-2 expressing CD8+ T cells increased in later stages. This may be indicative for a shift from infiltrating cytotoxic and T helper cells in early stages to an increasing population of suppressive CD8+ T cells infiltrating the tumor in later stages. The change in the proportion of cytotoxic and helper T cells towards suppressive and/or regulatory T cells in the tumor may be responsible for the polarization from a Th1- to a Th2 type response. This may contribute to tumor growth and thus resemble an increasingly ineffective cytotoxic tumor immune response.

Corresponding with significant serum levels of TNF- α the receptors TNFR I and -II were found to be highly expressed in patients with RCC. In accordance with this finding an enhanced number of apoptotic peripheral blood T cells with emphasis more on TUNEL-positive CD4+ and CD8+ cells during tumor progression was demonstrated. Interestingly, not all TNFR I positive PBLs exhibited positive TUNEL staining. Among tumor-infiltrating lymphocytes like in PBLs TNFR I- and TUNEL positive CD4+ and CD8+ cells were found, suggestive for an apoptotic microenvironment within the tumor.

T cell approaches enable a selective attack of tumor cells and thus represent an attractive therapeutical concept against tumors. Identification of immunogenic molecules overexpressed or solely expressed in the RCC is therefore a priority in order to develop such T cell-mediated strategies against solid tumors. The data presented in this thesis demonstrate for the first time heterogenic expression of the tumor suppressor genes ING1b and ING4 in patients at different stages of the RCC. Approximately 40% of renal cancers showed significant overexpression of the ING1b gene and more than 30% overexpressed the ING4 gene. Furthermore, presentation of these two proteins in the context of MHC class I and II complexes on the surface of the tumor cells was shown in the RCC but not in normal renal parenchyma. Thus, a CD4+ and CD8+ T cell mediated tumor immune response against defined proteins may be an attractive therapeutical strategy.

To characterize a common pattern of HLA class I and II gene expression for epidemiological reason it requires a significant population of tumor patients to compare with healthy subjects. The limited patient study group, which was investigated, demonstrated heterogenic HLA-A, -B, -C, -DRA and -DRB gene expression.

The loss of HLA class I molecule expression on the surface of the tumor cell does not exhibit a common abnormality for the RCC and does not display an obligatory tumor escape mechanism. In contrast, overexpressed HLA class I as well as class II molecule expression as demonstrated for the RCC in this thesis could enable the presentation of tumor antigens by the tumor cell itself and contribute to an effective tumor immune response. In addition, all patients in early stages and 75% of patients in advanced stages showed significant overexpression of the HLA-G gene. The specific role of the HLA-G molecule in the RCC as controversially also discussed for other malignancies, seems to be unknown and could turn out to be beneficial for tumor growth.

This thesis demonstrates for the first time significant numbers of p29ING1b specific T cells in tumor-infiltrating lymphocytes and in PBLs. However, TILs show a decreased ratio of p29ING1b specific T cells in later stages of the RCC. Interestingly, in early stages there were more p29ING4 positive CD4+ lymphocytes than such CD8+ T cells within the tumor tissue. Moreover the p29ING4 sequence aa 149-158 was shown to induce a significant IFN- γ response but only a low IL-10 response in PBLs from RCC patients in early stages but not from healthy controls. The sequence p29ING4 aa 149-158 exclusively induced a significant IL-2 response. These data indicate a stimulating role of the sequence p29ING4 aa 149-158 for inducing a cytotoxic Tc1 and Th1 T cell mediated immune response in PBLs from RCC patients.

In conclusion, the therapeutic efficiency of the epitope p29ING4 aa 149-158 should be further examined in *in vivo* studies. The results of this study may provide the basis for a combined immunotherapeutical strategy in particular with actually clinical relevant protocols with lymphocyte - (CTL) activating cytokines such as IFN- α and IL-2 in patients with upregulated ING4 expression within their tumor.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	17
1.1.	Klinische und morphologische Aspekte zum Nierenzellkarzinom	17
1.1.1.	Epidemiologie und Ätiologie	17
1.1.2.	Histologie.....	18
1.1.2.1.	Zytomorphologische Typisierung.....	18
1.1.2.2.	Zytogenetische Typisierung.....	20
1.1.2.3.	Grading	20
1.1.2.4.	Staging.....	21
1.1.3.	Therapie.....	23
1.1.4.	Prognose	24
1.2.	Tumorsuppressorgene.....	25
1.2.1.	p53 Tumorsuppressorgen.....	25
1.2.2.	ING-Tumorsuppressorfamilie.....	28
1.2.2.1.	Zellzyklusregulation.....	30
1.2.2.2.	Apoptose.....	31
1.2.2.3.	DNA-Reparatur.....	32
1.2.2.4.	Transkription.....	33
1.2.2.5.	Biologische Aktionen der ING-Proteine	34
1.2.2.6.	Abhängigkeit der p53-Antwort.....	35
1.2.2.7.	Bedeutung der ING-Gene in humanen Malignomen	35
1.3.	Das Immunsystem.....	38
1.3.1.	T-Zell-vermittelte Immunität.....	39
1.3.2.	Antigenerkennung von T-Zellen	40
1.3.3.	Primäre Aktivierung von T-Zellen	41
1.3.4.	Die Memory T-Zellen	42
1.3.5.	Tumor-Immuninteraktionen	42
1.4.	Ziel der vorliegenden Arbeit.....	43
2.	Material und Methoden	48
2.1.	Material.....	48
2.1.1.	Chemikalien.....	48
2.1.2.	Geräte.....	48

2.1.3.	Verbrauchsmaterialien.....	49
2.1.4.	Medien und Reagenzien für Zellkultur.....	49
2.1.5.	Reagenzien für Immunhistologie, Immunfluoreszenz und FACS.....	50
2.1.6.	Reagenzien für ELISPOT	52
2.1.7.	Synthetische p33ING1b und p29ING4 Peptide.....	52
2.1.8.	Reagenzien für PCR.....	55
2.1.9.	Sonstiges Material.....	56
2.2.	Methoden.....	57
2.2.1.	Gewebeproben.....	57
2.2.1.1.	Herkunft, Aufarbeitung und Lagerung der Gewebeproben und Patienteninformationen.....	57
2.2.1.2.	Isolierung von Serum und mononukleären Zellen aus dem Patientenblut.....	57
2.2.2.	Zellkultur.....	58
2.2.2.1.	Zellzahlbestimmung.....	58
2.2.2.2.	Kryokonservierung.....	58
2.2.2.3.	Auftauvorgang.....	58
2.2.2.4.	Cytospins.....	59
2.2.2.5.	Negativ-Isolierung von CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen mittels Dynabeads.....	59
2.2.3.	Immunfluoreszenz und Immunhistologie.....	59
2.2.3.1.	Indirekte Immunfluoreszenz.....	59
2.2.3.2.	Immunhistologische Einzelfärbung.....	60
2.2.3.3.	Immunhistologische Doppelfärbung.....	61
2.2.4.	ELISPOT	61
2.2.5.	Luminex.....	63
2.2.6.	Genexpressionsanalyse.....	64
2.2.6.1.	RNA Extraktion.....	64
2.2.6.2.	Herstellung der cDNA (<i>reverse</i> Transkription).....	65
2.2.6.3.	Real Time PCR.....	65
2.2.6.4.	Agarosegelelektrophorese.....	66
2.2.7.	Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting, FACS).....	67
2.2.8.	Statistische Analysen.....	68

3.	Ergebnisse	69
3.1.	Untersuchung peripherer Blutlymphozyten.....	69
3.1.1.	Zytokin- und Chemokinkonzentration im Patientenserum.....	69
3.1.2.	Zytokinproduktion peripherer Blutlymphozyten.....	70
3.1.3.	Apoptose peripherer Blutlymphozyten.....	72
3.1.4.	FACS Analyse p33ING1b- und p29ING4-exprimierender peripherer Blutlymphozyten.....	74
3.1.5.	Analyse der Immunantwort peripherer Blutlymphozyten nach Stimulation mit p33ING1b und p29ING4 Peptiden.....	75
3.1.5.1.	Stimulation mit p33ING1b und p29ING4 Peptidpools voller Proteinlänge.....	75
3.1.5.1.1.	IFN- γ Expression.....	75
3.1.5.1.2.	IL-10 Expression.....	77
3.1.5.1.3.	IL-2 und IL-2R Expression.....	78
3.1.5.1.4.	IL-4, -5, -6, -13 und TNF- α Zytokin-Expression	80
3.1.5.2.	Stimulation mit spezifischen p33ING1b und p29ING4 Peptidpools der CD4+ bzw. CD8+ depletierten peripheren Blutlymphozyten.....	83
3.1.5.2.1.	IFN- γ Expression.....	83
3.1.5.2.2.	IL-10 Expression.....	85
3.1.5.2.3.	IL-2 und IL-2R Expression.....	86
3.1.5.2.4.	IL-4, -5, -6, -13 und Expression.....	88
3.1.5.2.5.	TNF- α , TNFR I und TNFR II Expression.....	89
3.1.5.3.	Stimulation mit einzelnen Peptiden der p33ING1b und p29ING4 Proteine.....	92
3.1.5.3.1.	IFN- γ Expression.....	92
3.1.5.3.2.	IL-10 Expression.....	93
3.1.5.3.3.	IL-2 und IL-2R Expression.....	94
3.1.5.3.4.	IL-4, -5, -6 und -13 Expression.....	95
3.1.5.3.5.	TNF- α , TNFR I und TNFR II Expression.....	97
3.2.	Untersuchung des Tumorgewebes.....	100
3.2.1.	Analyse tumor-infiltrierender Lymphozyten.....	100
3.2.1.1.	Real Time PCR Analyse der Genexpression immunologischer Marker	100
3.2.1.2.	Immunhistologische Analyse immunologischer Marker im Tumorgewebes und in tumor-infiltrierenden Lymphozyten.....	101

3.2.1.3.	Immunhistologische Analyse CD4+ Lymphozyten.....	103
3.2.1.4.	Immunhistologische Analyse CD8+ Lymphozyten.....	104
3.2.1.5.	Analyse apoptotischer tumor-infiltrierender Lymphozyten.....	105
3.2.1.6.	Immunhistologische Analyse p33ING1b und p29ING4 exprimierender Lymphozyten.....	107
3.2.2.	Untersuchung der p53, p33ING1b und p29ING4 Expression im Tumorgewebe.....	108
3.2.2.1.	Real Time PCR Analyse der p53, ING1b und ING4 Genexpression	108
3.2.2.2.	Immunhistologische Analyse der p53, p33ING1b und p29ING4 Proteine	109
3.2.3.	Untersuchung der MHC Expression.....	112
3.2.3.1.	Real Time PCR Analyse der MHC Expression im Tumorgewebe.....	112
3.2.3.2.	Real Time PCR Analyse der MHC Expression auf peripheren Blutlymphozyten.....	113
3.2.4.	Untersuchung der Präsentation der p33ING1b und p29ING4 Proteine über MHC Moleküle der Klasse I und II im Tumorgewebe.....	114
4.	Diskussion.....	116
4.1.	Immuntherapie von Tumoren.....	116
4.2.	Immunogenität des Nierenzellkarzinoms.....	117
4.2.1	Zytokinspiegel im Serum von Patienten mit einem Nierenzellkarzinom.....	117
4.2.2.	Immunreaktivität peripherer Blutlymphozyte.....	119
4.2.3.	Immunreaktivität in Tumorgewebe.....	120
4.2.3.1.	Immunreaktivität tumor-infiltrierender Lymphozyten	121
4.2.3.2.	Zytokinexpression in Tumorumgebung	125
4.3.	p33ING1b und p29ING4 Proteine als tumor-assoziierte Antigene des Nierenzellkarzinoms.....	126
4.3.1.	Expression von p33ING1b und p29ING4 Proteinen im Nierenzellkarzinom.....	126
4.3.2.	HLA Klasse I und II Expression im Tumorgewebe.....	128
4.3.3.	Tumorzellen präsentieren p33ING1b und p29ING4 Peptide durch MHC Klasse I und II Moleküle	131
4.3.4.	p33ING1b- und p29ING4 Expression auf peripheren und tumor- infiltrierenden Lymphozyten.....	132

4.4.5.	Immunreaktivität peripherer Blutlymphozyten nach Stimulation mit p33ING1b und p29ING4 Peptiden.....	133
4.3.6.	Immunmodulatorische p29ING4 Therapie.....	137
4.3.7.	Die Apoptose im Immunsystem der Tumorpatienten	138
4.3.7.1.	Untersuchung der Apoptose von T-Lymphozyten	138
4.3.7.2.	Apoptotische Wirkung von p33ING1b und p29ING4 Peptiden.....	142
4.4.	Ausblick.....	143
5.	Literaturverzeichnis.....	145
6.	Anhang.....	171
6.1.	Immunhistologie und Immunfluoreszenz.....	171
6.2.	Abkürzungen.....	186
6.3.	Lebenslauf.....	189
6.4.	Publikationen und Präsentationen.....	190
6.5.	Ehrenwörtliche Erklärung.....	195