

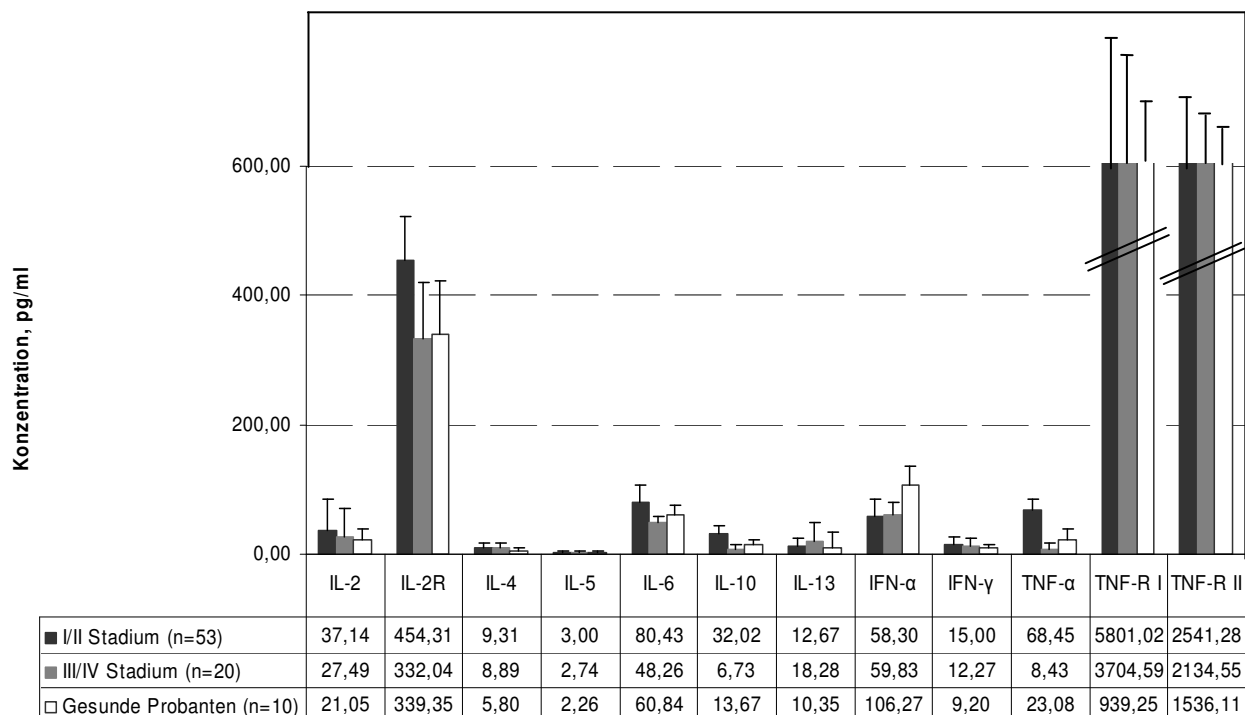
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Untersuchung peripherer Blutlymphozyten

##### 3.1.1. Zytokin- und Chemokinkonzentration im Patientenserum

Das Serum aus peripherem Blut von 73 Tumorpatienten sowie 10 gesunden Probanden wurde auf seine Zytokin- und Chemokinkonzentration hin untersucht.

Tumorpatienten wiesen im Vergleich zu gesunden Probanden eine erhöhte Expression für IL-2, IL-2R, IL-4, -5, -6, -10, -13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNFR I und TNFR II auf. Einzig IFN- $\alpha$  war dagegen in allen Tumorstadien der Patienten erniedrigt nachweisbar. Für die meisten Zytokinen (IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNFR I und II) fand sich eine deutlich schwächere Expression Konzentrationsrückgang bei Progression der Krankheit von frühen zu späten Stadien. Für IL-2R, IL-6, IL-10, IFN- $\alpha$  und TNF- $\alpha$  war die Konzentration im Serum fortgeschrittener Tumorpatienten niedriger als das Niveau gesunder Probanden (Abbildung 3.1). Dies deutet auf eine Aktivierung des gesamten Immunsystems während der Anfangsstadien der Tumorentwicklung hin. Diese Aktivierung führt aber nicht zur Tumorabwehr, stattdessen wird die Immunantwort im weiteren Verlauf der Tumorprogression herabreguliert.



**Abbildung 3.1. Zytokin- und Chemokinproduktion im Serum von Tumorpatienten.** Für IL-2, IL-2R, IL-4, -5, -6, -10, -13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNFR I und TNFR II zeigte sich eine angestiegene Konzentration im Serum der Tumorpatienten im Vergleich zu gesunden Probanden.

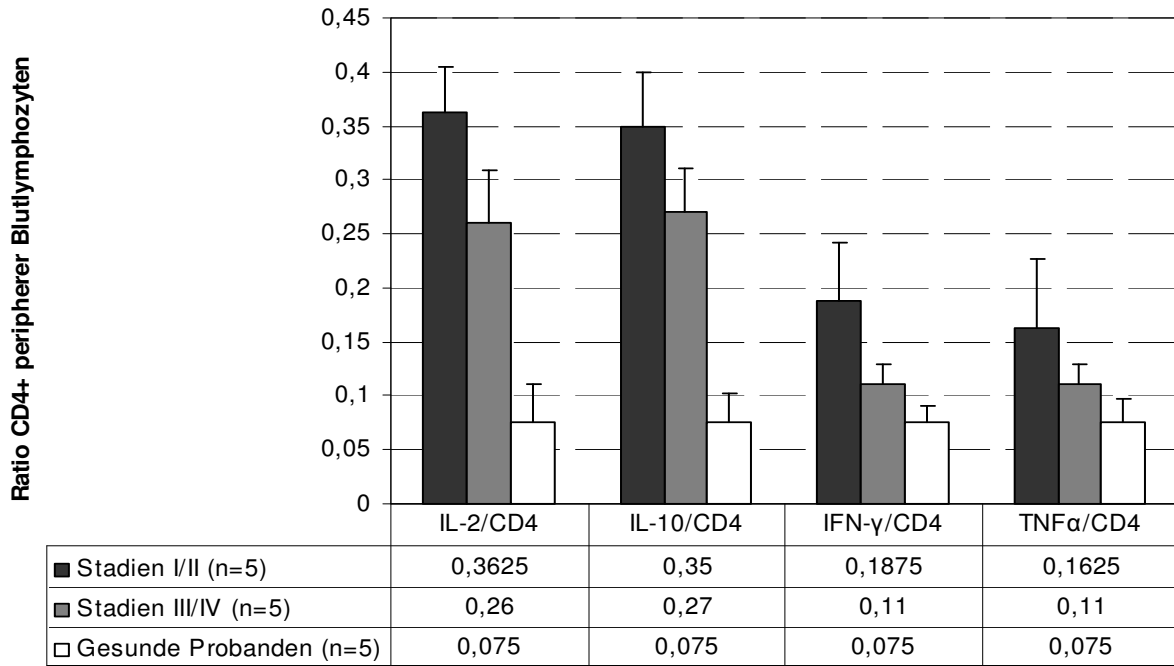
### 3.1.2. Zytokinproduktion peripherer Blutlymphozyten

Mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wurden zytokinexprimierende T-Lymphozyten untersucht. Mit Ausnahme von IL-10 und IFN- $\gamma$  positiver CD8 Zellen, deren Anteil keinen signifikanten stadienabhängigen Unterschied aufwies (Abbildung 3.3.), fand sich in fortgeschrittenen Tumoren eine deutliche Reduktion IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  positiver T-Lymphozyten im peripheren Blut (Abbildung 3.2.).

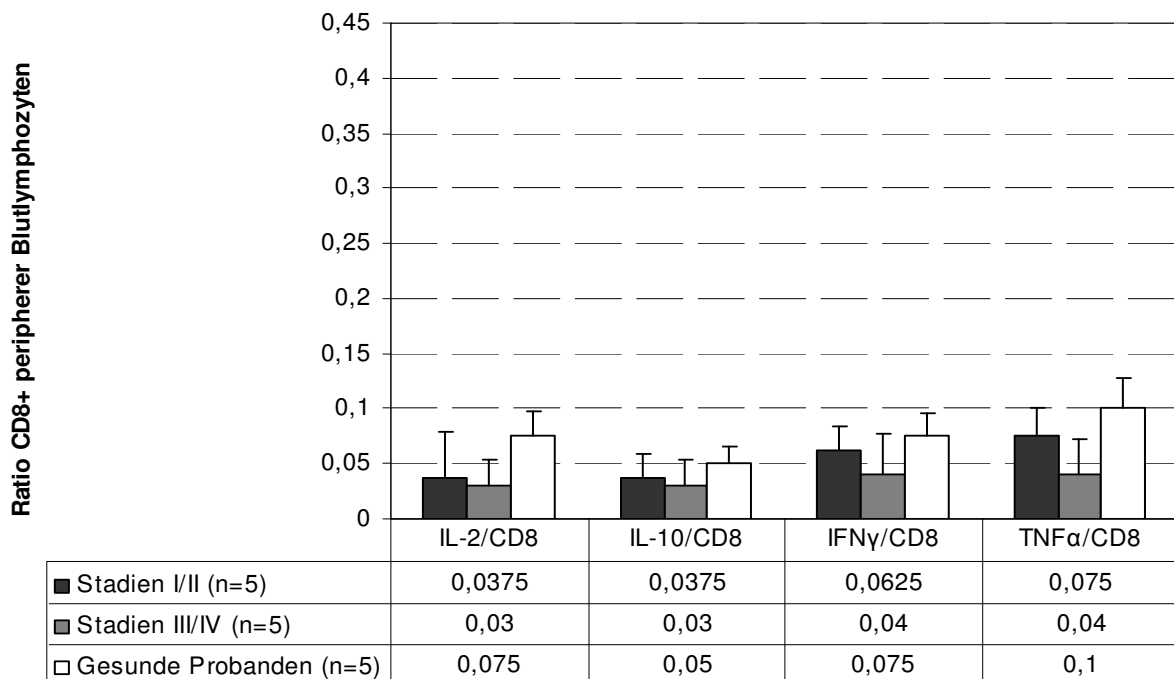
In der CD4+ T-Zellpopulation überwogen in frühen Tumorstadien IL-2 ( $36,3\pm 4,1\%$ ) und IL-10 ( $35\pm 5\%$ ) positive Zellen über den IFN- $\gamma$  ( $18,8\pm 5,5\%$ ) und TNF- $\alpha$  ( $16,3\pm 6,5\%$ ) positiven Lymphozyten. Dieselbe Tendenz wurde auch für die CD4+ T-Zellen von Patienten später Tumorstadien festgestellt. Gesunde Probanden wiesen keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  positiver CD4+ Zellen auf. Der Anteil jeder Population betrug etwa 7,5% der Gesamtanzahl der CD4+ T-Zellen (Abbildungen 3.2. und 6.1.1.).

Die Verteilung in der CD8+ T-Zellpopulation im peripheren Blut der Tumorpatienten zeigte ein entgegengesetztes Bild. Im allen Tumorstadien lagen die TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  exprimierenden CD8+ Zellen in grösserer Anzahl als IL-2 und IL-10 exprimierende CD8+ Zellen vor. Während der Anteil der TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  exprimierenden CD8+ PBLs in Patienten früher Stadien  $7,5\pm 2,5\%$  und  $6,3\pm 2,2\%$  betrug, lag die Rate der IL-2 und IL-10 positiven CD8+ PBLs bei  $3,8\pm 4,1\%$  und  $3,8\pm 2,2\%$ . In PBLs gesunder Probanden überwogen die TNF- $\alpha$  ( $10\pm 2,7\%$ ) sowie IL-2 und IFN- $\gamma$  ( $7,5\pm 2\%$ ) exprimierenden CD8+ Zellen über den IL-10 positiven CD8+ Zellen ( $5\pm 1,5\%$ ) (Abbildung 3.3.).

Beim Vergleich der untersuchten T-Zellpopulationen zeigte sich, dass die CD4+ T-Zellen während der Tumorentwicklung signifikant anstiegen, während die CD8+ Zellen in der Zahl leicht abfielen. Eine hohe Anzahl IL-2 exprimierender CD4+ T-Zellen während der Tumorentwicklung korrelierte mit einer angestiegenen IL-10 Expression.

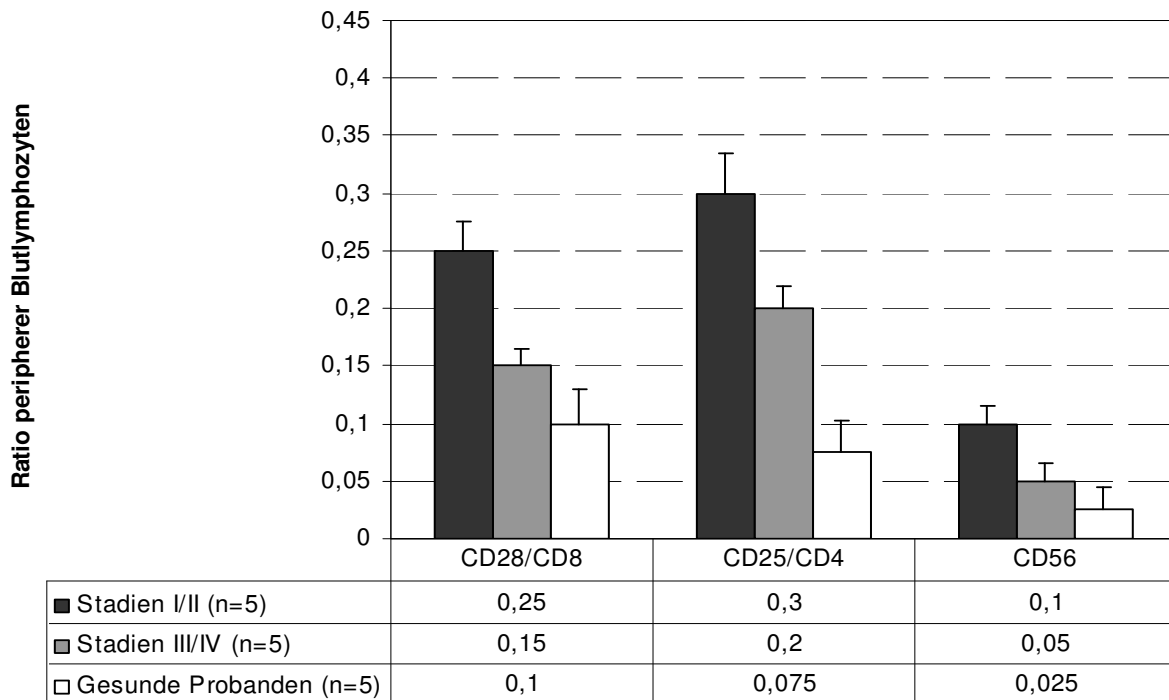


**Abbildung 3.2. Anteil CD4 positiver PBLs mit verschiedenen Zytokinprofilen.** In der CD4+ T-Zellpopulation überwogen in frühen Tumorstadien IL-2 (36,3 $\pm$ 4,1%) und IL-10 (35 $\pm$ 5%) positive Zellen über den IFN- $\gamma$  (18,8 $\pm$ 5,5%) und TNF- $\alpha$  (16,3 $\pm$ 6,5%) positiven Lymphozyten. Dieselbe Tendenz wurde für die CD4+ T-Zellen von Patienten später Tumorstadien festgestellt. Gesunde Probanden wiesen keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  positiver CD4+ Zellen auf. Der Anteil jeder Population betrug etwa 7,5% der Gesamtanzahl der CD4+ T-Zellen. Die CD4+ Zellen stiegen während der Tumorentwicklung signifikant an.



**Abbildung 3.3. Anteil CD8 positiver PBLs mit verschiedenen Zytokinprofilen.** In allen Tumorstadien lagen die TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  exprimierenden CD8+ Zellen in grösserer Anzahl als IL-2 und IL-10 exprimierende CD8+ Zellen vor. Während der Anteil der TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  exprimierenden CD8+ PBLs in Patienten früher Stadien 7,5 $\pm$ 2,5% und 6,3 $\pm$ 2,2% betrug, lag die Rate der IL-2 und IL-10 positiven CD8+ PBLs bei 3,8 $\pm$ 4,1% und 3,8 $\pm$ 2,2%. In PBLs gesunder Probanden überwogen die TNF- $\alpha$  (10 $\pm$ 2,7%) sowie IL-2 und IFN- $\gamma$  (7,5 $\pm$ 2%) exprimierenden CD8+ Zellen über den IL-10 positiven CD8+ Zellen (5 $\pm$ 1,5%). während der Tumorentwicklung signifikant anstiegen während die CD8+ Zellen in der Zahl leicht abfielen.

In weiteren Färbungen wurde gezeigt, dass die Anzahl an CD8+CD28+ Zellen, CD4+CD25+ Zellen und CD56+ Zellen im peripheren Blut von Tumorpatienten wesentlich höher war als bei gesunden Probanden. Ein besonders deutlicher Unterschied der Anzahl wurde für CD4+CD25+ Zellen gesehen. Für alle drei Zellpopulationen zeigte sich bei Progression des Tumors ein Abfall in der Zellzahl.

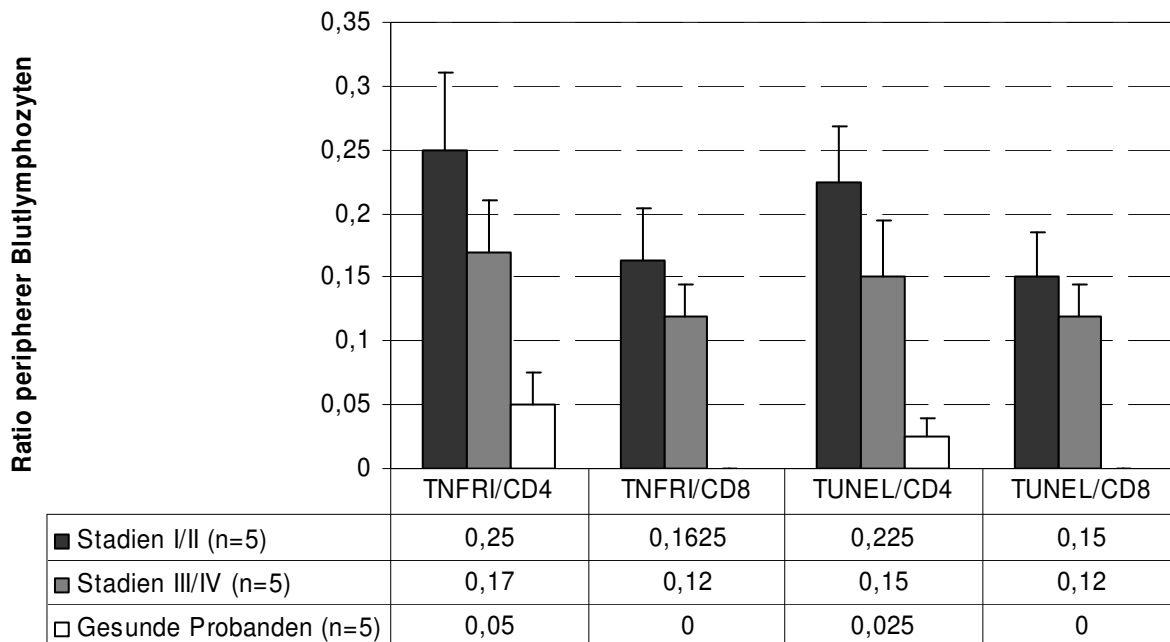


**Abbildung 3.4. Anteil CD28+/CD8+, CD25+/CD4+ und CD56+ positiver PBLs.** Die Anzahl an CD8+/CD28+, CD4+/CD25+ und CD56+ Zellen war im peripheren Blut von Tumorpatienten wesentlich höher als bei gesunden Probanden. Ein besonders deutlicher Unterschied der Anzahl wurde für CD4+/CD25+ Zellen gesehen. Für alle drei Zellpopulationen zeigte sich bei Progression des Tumors ein Abfall in der Zellzahl.

### 3.1.3. Apoptose peripherer Blutlymphozyten

Aus dem peripheren Blut von zehn Tumorpatienten verschiedener Stadien sowie von fünf gesunden Probanden gewonnene CD4+ und CD8+ T-Zellen wurden auf Zeichen der Apoptose hin untersucht. Mittels Immunfluoreszenz wurde sowohl der TNFR I gefärbt als auch ein TUNEL Assay durchgeführt. In beiden Färbungen wies die CD4+ T-Zellpopulation einen grösseren Anteil an TNFR I und TUNEL positiven Zellen verglichen mit dem CD8+ T-Zellanteil auf. Der Anteil an TNFR I exprimierenden Zellen in beiden T-Zellpopulationen zeigte einen stadienabhängigen Charakter mit einer höheren Anzahl positiver Zellen in frühen Stadien (25±6% für CD4+ T-Zellen und 16,3±4,1% für CD8+ T-Zellen) im Vergleich zu fortgeschrittene Stadien (17±4,5% für CD4+ T-Zellen und 12±2,5% für CD8+ T-Zellen). Die TNFR I Expression zeigten 5±2,5% der CD4+ T-Zellen und keine CD8+ T-Zellen aus peripherem Blut gesunder Probanden.

Der TUNEL Assay zeigte dieselbe Tendenz in den T-Zellpopulationen bei Tumorprogression. CD4+ Zellen zeigten eine wesentlich höhere Anzahl an TUNEL positiven Zellen ( $22,5\pm 4,3\%$ ) als CD8+ Zellen ( $15\pm 3,5\%$  bei Patienten früher Stadien). Interessanterweise ergab geringere Anzahl an TNFR I positiven PBLs eine positive TUNEL Färbung. Dies galt sowohl für CD4+ als auch CD8+ T-Lymphozyten in Patienten aller Tumorstadien (Abbildungen 3.5., 6.1.2., 6.1.3.). Da im peripheren Blut gesunder Probanden doppelt so wenige TUNEL positive Zellen als TNFR I positive CD4+ Zellen gefunden wurden, ist zu vermuten, dass die TNFR I Expression auf der Zelloberfläche nicht unbedingt zur Apoptose der Zelle führte.

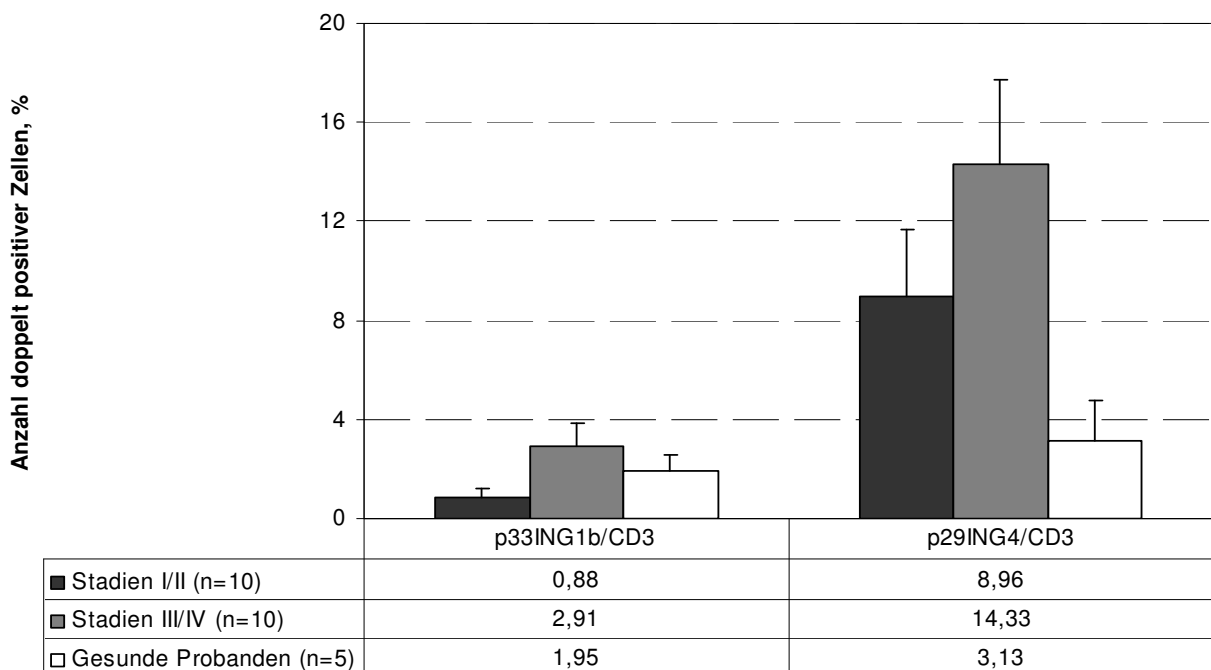


**Abbildung 3.5. Anteil TNFR I und TUNEL positiver PBLs.** In beiden Färbungen wies die CD4+ T-Zellpopulation einen größeren Anteil an TNFR I und TUNEL positiven Zellen verglichen mit dem CD8+ T-Zellanteil auf. Der Anteil an TNFR I exprimierenden Zellen in beiden T-Zellpopulationen zeigte einen stadienabhängigen Charakter mit einer höheren Anzahl positiver Zellen in frühen Stadien ( $25\pm 6\%$  für CD4+ T-Zellen und  $16,3\pm 4,1\%$  für CD8+ T-Zellen) im Vergleich zu fortgeschrittene Stadien ( $17\pm 4,5\%$  für CD4+ T-Zellen und  $12\pm 2,5\%$  für CD8+ T-Zellen). Der TUNEL Assay zeigte dieselbe Tendenz in den T-Zellpopulationen bei Tumorprogression. CD4+ Zellen zeigten eine wesentlich höhere Anzahl an TUNEL positiven Zellen ( $22,5\pm 4,3\%$ ) als CD8+ Zellen ( $15\pm 3,5\%$  bei Patienten früher Stadien)

**3.1.4. FACS Analyse p33ING1b- und p29ING4-exprimierender peripherer Blutlymphozyten**

Aus dem peripheren Blut von 20 Patienten mit NZK verschiedener Stadien sowie fünf gesunden Probanden gewonnene mononukleäre Zellen wurden im FACS auf CD3- und p33ING1b- bzw. p29ING4-doppelt positive Zellen hinuntersucht.

Sowohl T-Lymphozyten aus dem Blut gesunder Probanden als auch aus dem Blut der Tumorpatienten verschiedener Stadien exprimierten oberflächige p33ING1b und p29ING4 Proteine, wobei sich die Anzahl p33ING1b- und p29ING4-positiver T-Lymphozyten in Tumorpatienten stadienabhängig unterschied. p33ING1b-positiv T-Zellen fanden sich bei Tumorpatienten früher Tumorstadien ( $0,9 \pm 0,3\%$ ) wie in gesunden Probanden in deutlich geringer Anzahl ( $2,0 \pm 0,6\%$ ), in fortgeschrittenen Stadien nahm diese Anzahl zu ( $2,9 \pm 0,9\%$ ). Der Anteil p29ING4-positiver T-Zellen betrug  $3,1 \pm 1,6\%$  bei gesunden Probanden; Patienten sowohl früher als auch später Tumorstadien zeigten dagegen einen angestiegenen Anteil von  $9,0 \pm 2,7\%$  bzw.  $14,3 \pm 3,4\%$  p29ING4-positiver T-Zellen. Die Gesamtanzahl p29ING4-positiver T-Lymphozyten in Patienten aller Stadien lag signifikant höher als die Anzahl p33ING1b-positiver T-Lymphozyten (Abbildung 3.6.).



**Abbildung 3.6. FACS Analyse CD3-positiver T-Zellen im peripheren Blut.** Sowohl T-Lymphozyten aus dem Blut gesunder Probanden als auch von Tumorpatienten verschiedener Stadien exprimierten oberflächige p33ING1b und p29ING4 Proteine, wobei sich die Anzahl p33ING1b- und p29ING4-positiver T-Lymphozyten in Tumorpatienten stadienabhängig unterschied. Die Gesamtanzahl p29ING4-positiver T-Lymphozyten bei Patienten aller Stadien war im Vergleich p33ING1b-positiven T-Lymphozyten signifikant höher.

Mittel der p33ING1b/CD4- sowie p29ING4/CD8-Doppelfärbungen konnten wir zeigen, dass es keine wesentliche Unterschiede in der Anzahl der p33ING1b- oder p29ING4- exprimierenden CD4- und CD8 T-Zellen im peripherem Blut vorliegt.

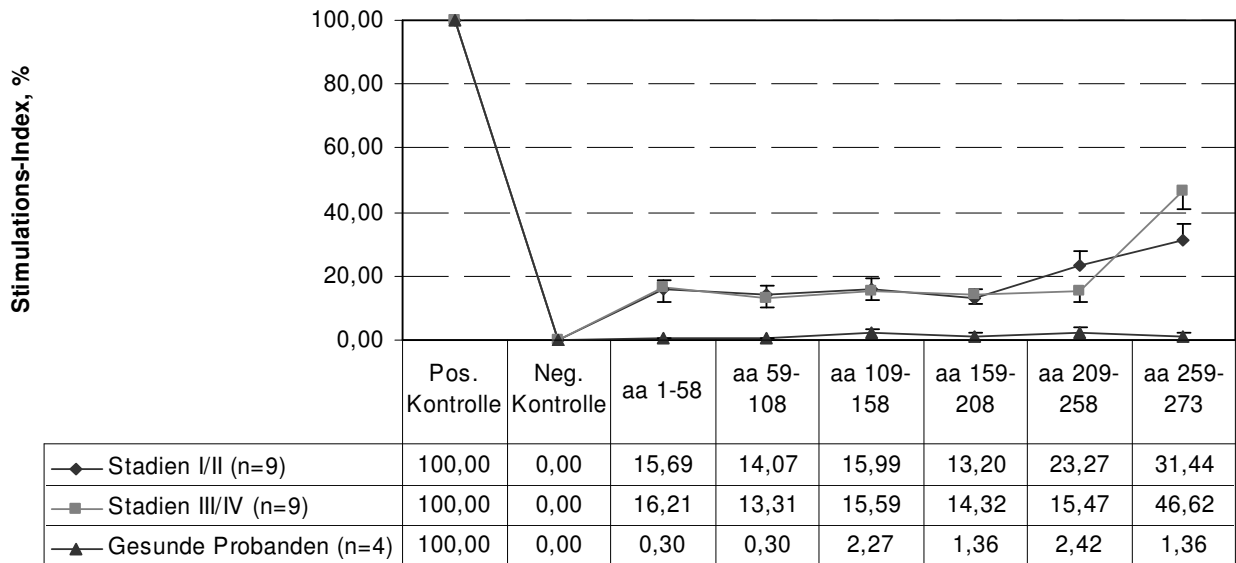
### **3.1.5. Analyse der Immunantwort peripherer Blutlymphozyten nach Stimulation mit p33ING1b und p29ING4 Peptiden**

Die aus dem peripheren Blut von Tumorpatienten und gesunden Probanden gewonnenen mononukleären Zellen wurden *in vitro* mit p33ING1b- und p29ING4-Peptiden stimuliert. Dabei wurde die IFN- $\gamma$  Expression nach Stimulation im ELISPOT gemessen. Für die Messung weiterer Zytokine und Chemokine wurden die ELISPOT-Überstände im LUMINEX untersucht. In verschiedenen experimentellen Ansätzen wurden die Zellen mit den Peptidpools der vollen Proteinelänge (10 Oligomere pro Pool) sowie mit einzelnen Oligomeren stimuliert. Für die Berechnung der Stimulationsindizes wurden die Negativkontrollwerte (nicht stimulierte mononukleäre Zellen) in allen Ansätzen subtrahiert und Positivkontrollwerte (mit PHA stimulierte mononukleäre Zellen) mit 100% gleichgesetzt.

#### **3.1.5.1. Stimulation mit p33ING1b und p29ING4 Peptidpools voller Proteinelänge**

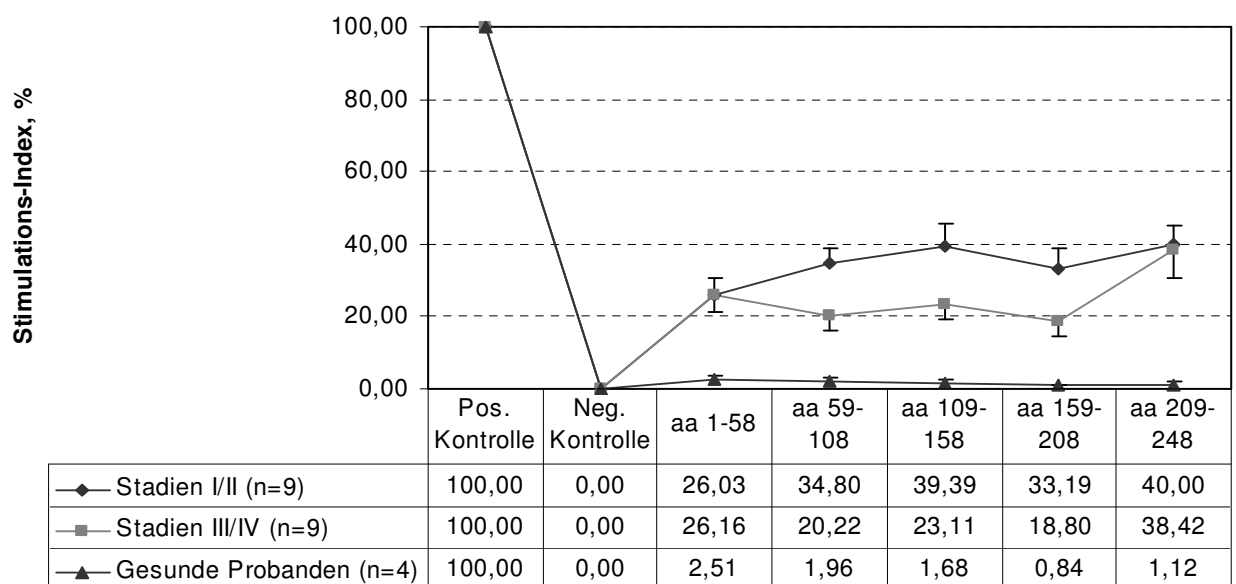
##### **3.1.5.1.1. IFN- $\gamma$ Expression**

Nach der Stimulation mit beiden ING-Peptiden zeigten die peripheren Blutlymphozyten aus Tumorpatienten stadienunabhängig eine höhere IFN- $\gamma$  Expression verglichen mit entsprechenden Zellen gesunder Probanden. Bei Stimulation mit den p33ING1b Peptidpools zeigten sich stadienabhängig unterschiedlich starke IFN- $\gamma$ -Antworten auf Sequenzen aa 209-258 (23,3 $\pm$ 4,5% in den Stadien I/II und 15,5 $\pm$ 3,4% in den Stadien III/IV) und aa 259-273 (31,4 $\pm$ 4,7% in den Stadien I/II und 46,6 $\pm$ 5,5% in den Stadien III/IV). Andere Pools riefen in allen Stadien eine vergleichbare IFN- $\gamma$  Immunantwort peripherer Blutlymphozyten der Tumorpatienten hervor. Die höchsten Stimulations-Indizes wurden für Patienten der Stadien I/II nach Stimulation mit den Peptiden aa 209-258 (23,3 $\pm$ 4,5%) und aa 259-273 (31,4 $\pm$ 4,7%) erreicht (Abbildung 3.7.).



**Abbildung 3.7. Die IFN- $\gamma$  Produktion nach der Stimulation mit p33ING1b-Peptiden.** Die höchsten Stimulations-Indizes wurden für Patienten der Stadien I/II nach Stimulation mit aa 209-258 (23,3 $\pm$ 4,5%) und aa 259-273 (31,4 $\pm$ 4,7%) erreicht.

Im Falle der Stimulation mit p29ING4 wies die IFN- $\gamma$  Immunantwort stadienabhängige Unterschiede mit einer Ausnahme des Peptidpools aa 209-248 auf. Die höchsten Stimulations-Indizes wurden für Tumorpatienten der Stadien I/II nach Stimulation mit den Peptidpools aa 109-158 (39,4 $\pm$ 5,9%) sowie aa 209-248 (40 $\pm$ 5%) erreicht (Abbildung 3.8.).



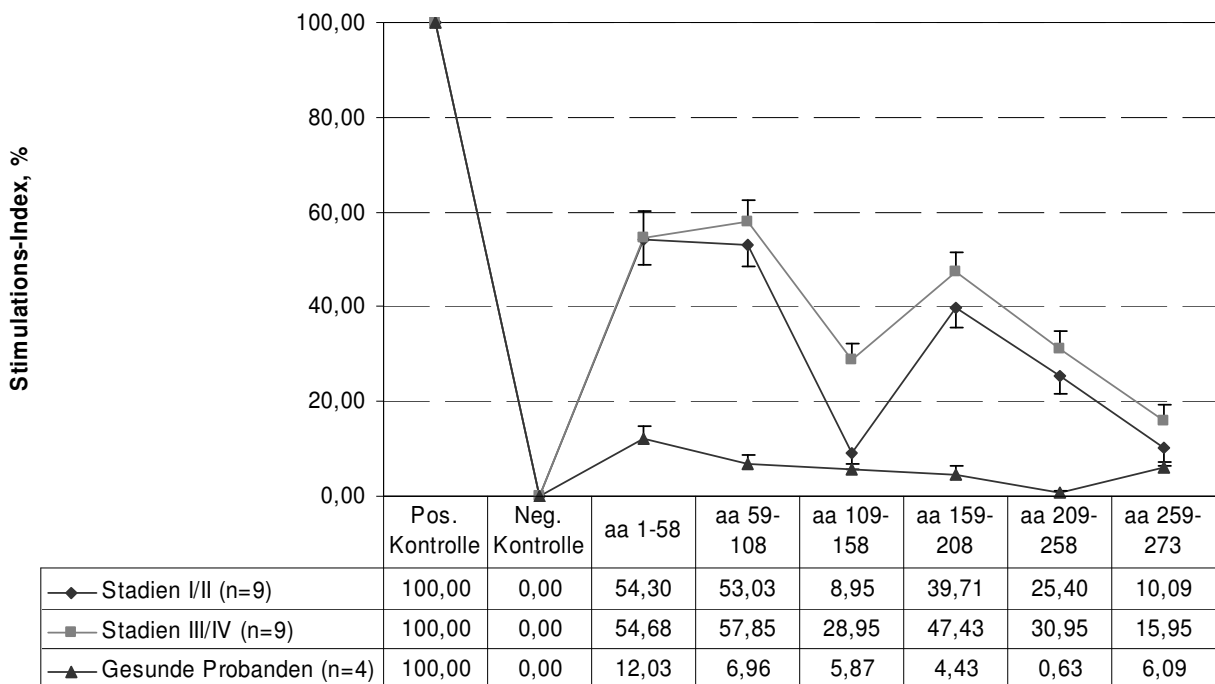
**Abbildung 3.8. Die IFN- $\gamma$  Produktion nach der Stimulation mit p29ING4-Peptiden.** Die höchsten Stimulations-Indizes wurden für Tumorpatienten der Stadien I/II nach der Stimulation mit den Peptidpools aa 109-158 (39,4 $\pm$ 5,9%) und aa 209-248 (40 $\pm$ 5%) erreicht.



Mit Ausnahme des Peptidpools aa 259-273 scheinen p33ING1b-Peptidpools weniger stimulierend zu wirken (Indizes < 23,3%) als p29ING4-Peptide, die Stimulationen-Indizes zwischen 18,8% und 40,0% aufwiesen.

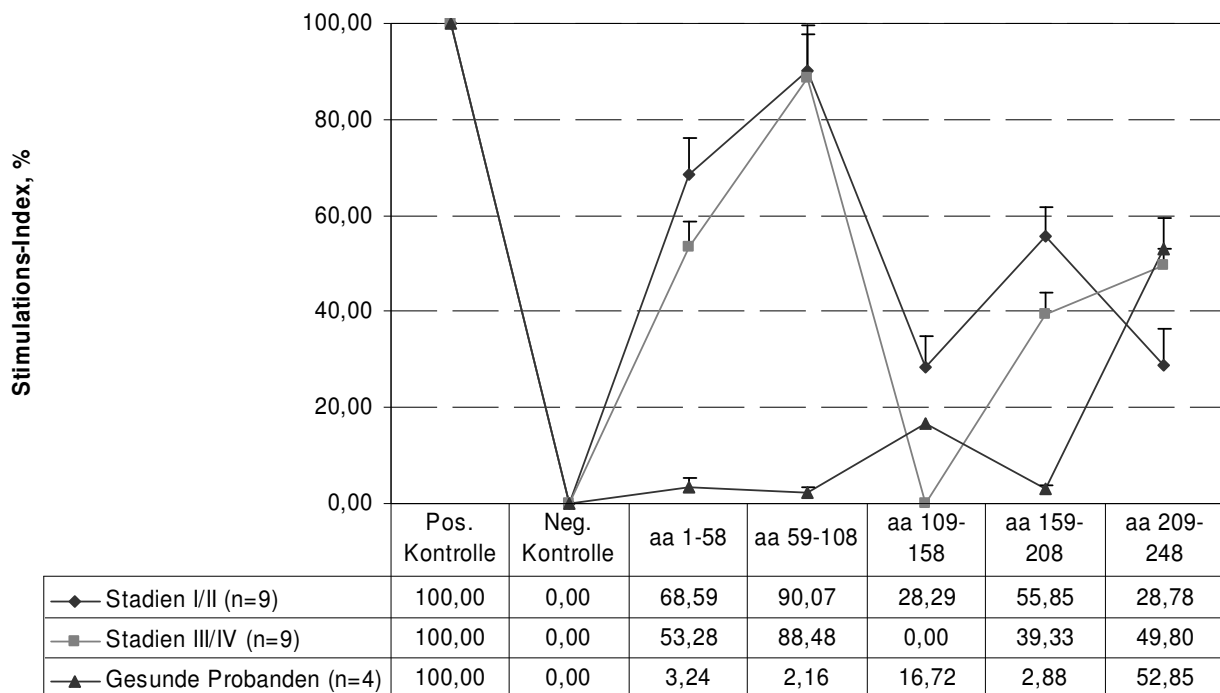
**3.1.5.1.2. IL-10 Expression**

Im Falle der Stimulation mit p33ING1b zeigten periphere Blutlymphozyten der Tumorpationen stadienunabhängig eine stärkere IL-10 Antwort verglichen mit entsprechenden Zellen gesunder Probanden. Die Stärke der IL-10 Antwort wies keine signifikante stadienabhängige Unterschiede gegenüber allen p33ING1b-Peptidpools. Die IL-10 Expression war nach Stimulation mit den Peptidpools aa 109-158 und aa 259-273 in frühen Tumorstadien weniger stark erhöht als bei den anderen Pools (Abbildung 3.9.).



**Abbildung 3.9. Die IL-10 Produktion nach Stimulation mit p33ING1b Peptiden.** Die IL-10 Expression war nach Stimulation mit den Peptidpools aa 109-158 und aa 259-273 in allen Tumorstadien weniger stark erhöht im Vergleich zu den anderen Peptidpools.

In Antwort auf p29ING4 exprimierten periphere Blutlymphozyten der Tumorpationen mehr IL-10 als solche Lymphozyten gesunder Probanden. Eine Ausnahme stellte das Peptidpool aa 209-248 dar. Diese Sequenz rief eine signifikant höhere Stimulation von IL-10 in Patienten der Stadien III/IV und in gesunden Probanden hervor ( $49,8 \pm 3,4\%$  und  $52,8 \pm 6,5\%$  entsprechend) als in den Patienten der Stadien I/II ( $28,8 \pm 7,6\%$ ). Beim Vergleich aller p29ING4 Peptidpools war die IL-10 Produktion nach Stimulation mit den Peptidpools aa 109-158 und aa 209-248 in peripheren Blutlymphozyten von Tumorpationen der Stadien I/II signifikant reduziert (Abbildung 3.10.).



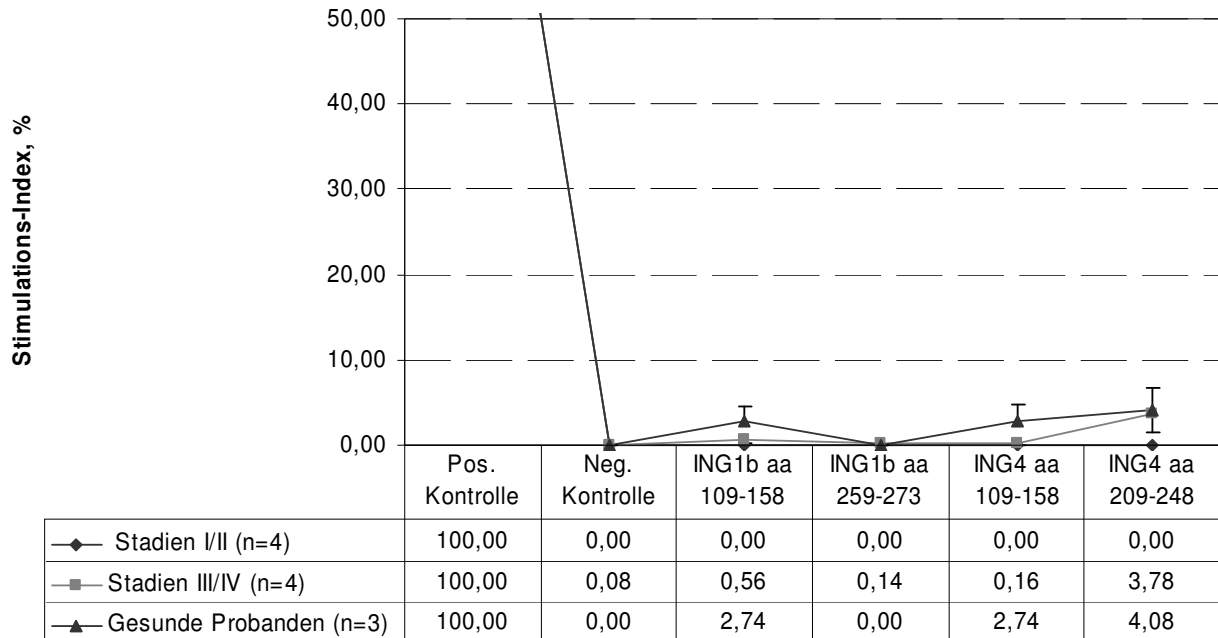
**Abbildung 3.10. Die IL-10 Produktion nach Stimulation mit p29ING4 Peptiden.** Die IL-10 Produktion war in periphere Blutlymphozyten von Tumorpatienten der Stadien I/II nach Stimulation mit den Peptidpools aa 109-158 und aa 209-248 signifikant reduziert.

Zusammenfassend ruft p33ING1b (ausgenommen aa 259-273) in frühen Tumorstadien eine verminderte Produktion von IFN- $\gamma$  (13,2 bis 23,3%) im Vergleich zu p29ING4 (26 bis 40%) hervor. Die Stimulation mit p33ING1b Peptidpools führt dagegen zu einer reduzierten Produktion von IL-10 (8,95 bis 53,03%) vergleichbar der mit p29ING4 Sequenzen (28,3 bis 90,1%). Interessanterweise zeigen zwei Peptidpools des p33ING1b Proteins (aa 109-158 und aa 259-273) und zwei Peptidpools des p29ING4 Proteins (aa 109-158 und aa 209-248) eine angestiegene IFN- $\gamma$  Produktion sowie eine signifikant reduzierte IL-10 Produktion. Die Zellüberstände der Patienten mit deutlicher IFN- $\gamma$  Überexpression nach Stimulation mit diesen Sequenzen (66% der Patienten im Falle p33ING1b und 55% im Falle p29ING4 aller untersuchten Fälle) wurden im Luminex zusätzlich auf IL-2, IL-2R, IL-4, -5, -6, -13 und TNF- $\alpha$  untersucht.

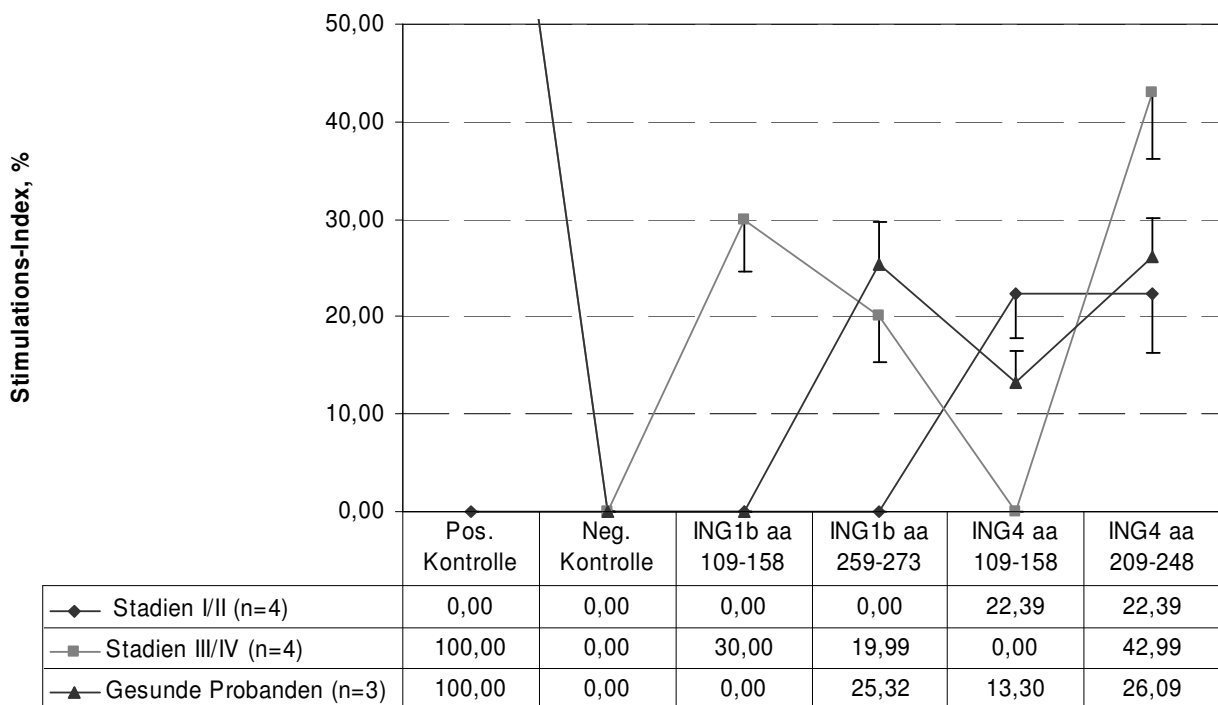
### 3.1.5.1.3. IL-2 und IL-2R Expression

In Patienten der Stadien I/II führte ausschließlich die Stimulation mit p29ING4 zur IL-2R Expression. Dabei lösten beide p29ING4 Sequenzen eine vergleichbar hohe IL-2 Rezeptor Expression aus. In den späten Tumorstadien zeigte sich gegenüber p33ING1b (aa 109-158) sowie p29ING4 (aa 209-248) eine IL-2 Antwort und deutliche Expression des IL-2 Rezeptors.

In gesunden Probanden riefen sowohl p33ING1b als auch p29ING4 eine hohe IL-2 Antwort und IL-2R Expression hervor (Abbildung 3.11., 3.12.).



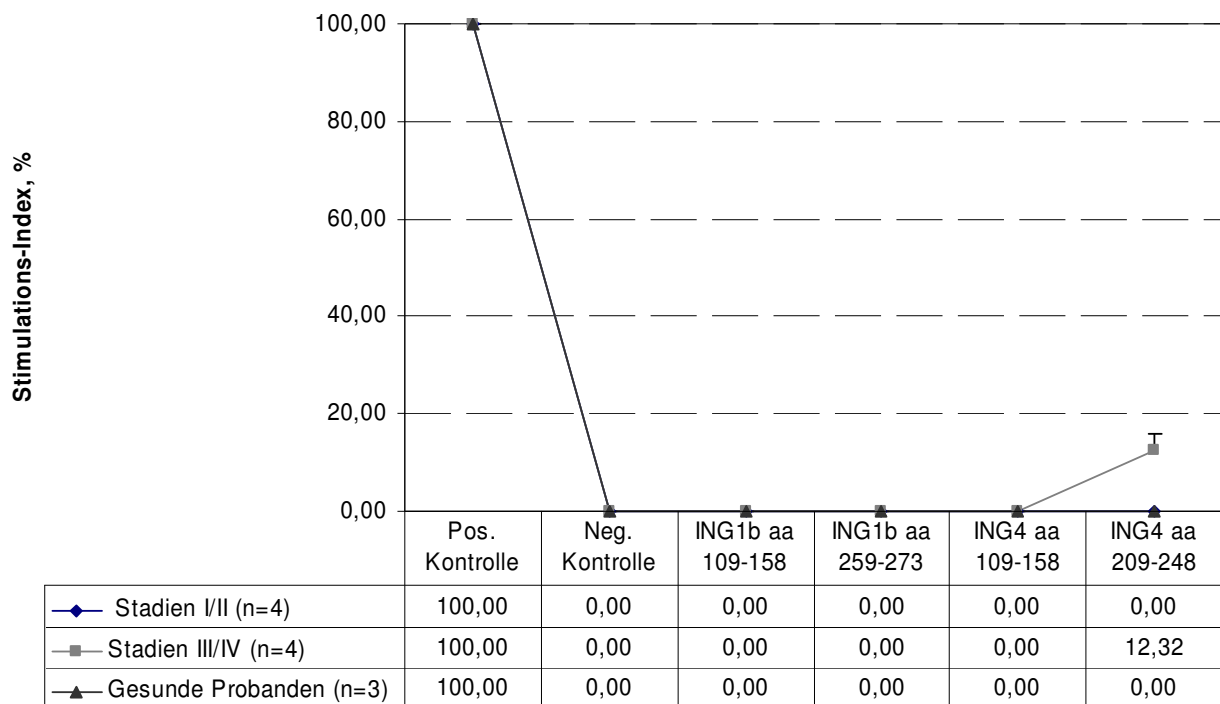
**Abbildung 3.11. Die IL-2 Produktion nach Stimulation mit spezifischen p33ING1b und p29ING4-Peptidpools.** Die Produktion von IL-2 war in PBL der Tumorpatienten (Stadien III/IV) nach Stimulation mit den Sequenzen aa 109-158 des p33ING1b und aa 209-248 des p29ING4 deutlich erhöht.



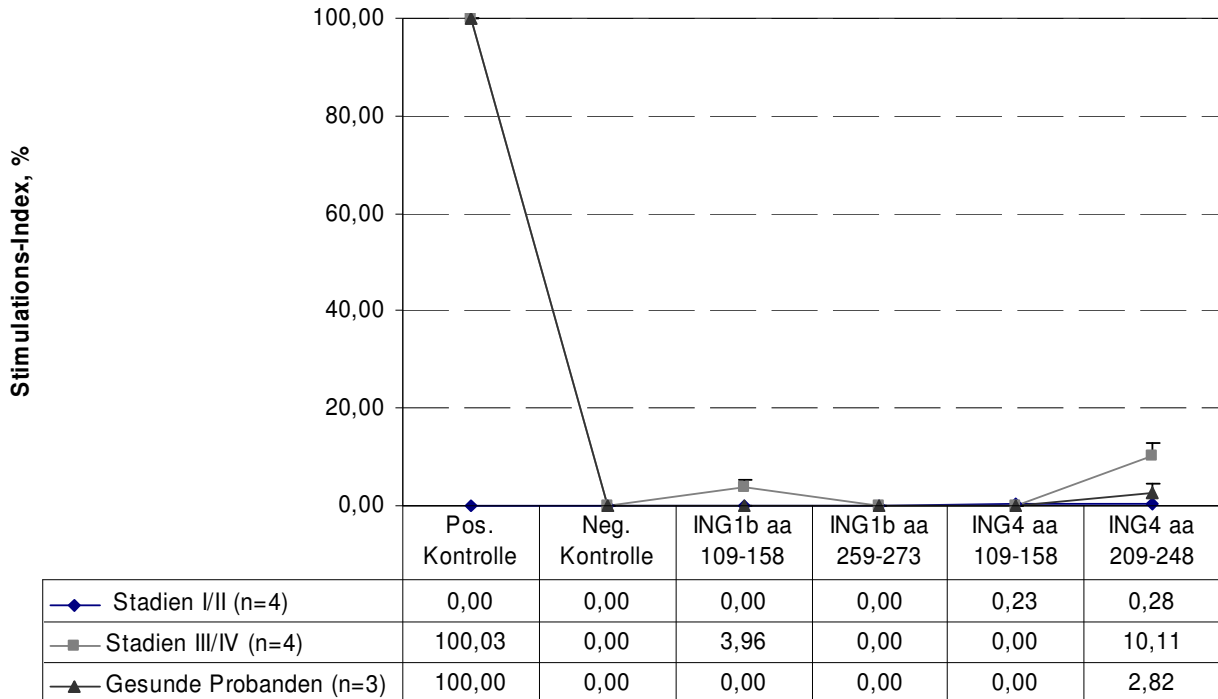
**Abbildung 3.12. Die IL-2R Expression nach Stimulation mit spezifischen p33ING1b- und p29ING4-Peptidpools.** Die Produktion von IL-2R war in PBLs früher Tumorpatienten der Stimulation mit aa 259-273 von p33ING1b und aa 209-248 von p29ING4 und in PBLs fortgeschrittener Tumorpatienten nach Stimulation mit den Sequenzen aa 109-158 von p33ING1b sowie aa 209-248 von p29ING4 deutlich erhöht.

**3.1.5.1.4. IL-4, -5, -6, -13 und TNF- $\alpha$  Zytokin-Expression**

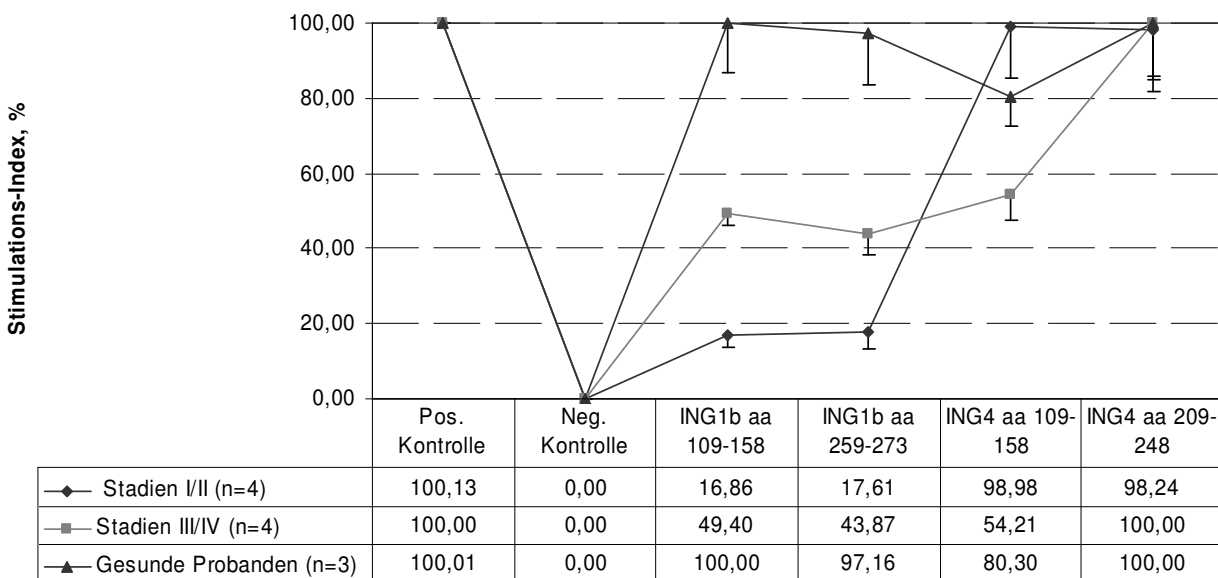
Sowohl die p33ING1b- als auch p29ING4-Peptidpools spielten eine Rolle für den Anstieg der Expression von IL-4, -5 und -13 bei Tumorpatienten später Stadien, nicht aber bei Patienten früherer Stadien und gesunden Probanden. Dabei wurden vergleichsweise starke Antworten in PBLs von Patienten später Stadien bei Stimulation mit dem p33ING1b-Peptidpool aa 109-158 (IL-5, -13, TNF- $\alpha$ ) und Peptidpool p29ING4 aa 209-248 (IL-4, -5, -6, -13, TNF- $\alpha$ ) hervorgerufen (Abbildung 3.13. bis 3.17.). Eine Ausnahme bildete die IL-6 Expression in PBLs der Patienten früher Stadien. Beide Sequenzen des p33ING1b- und p29ING4-Peptidpools riefen eine IL-6 Produktion hervor. Dabei erreichte der Stimulations-Index beider p29ING4 Sequenzen ca. 98% (Abbildung 3.15.).



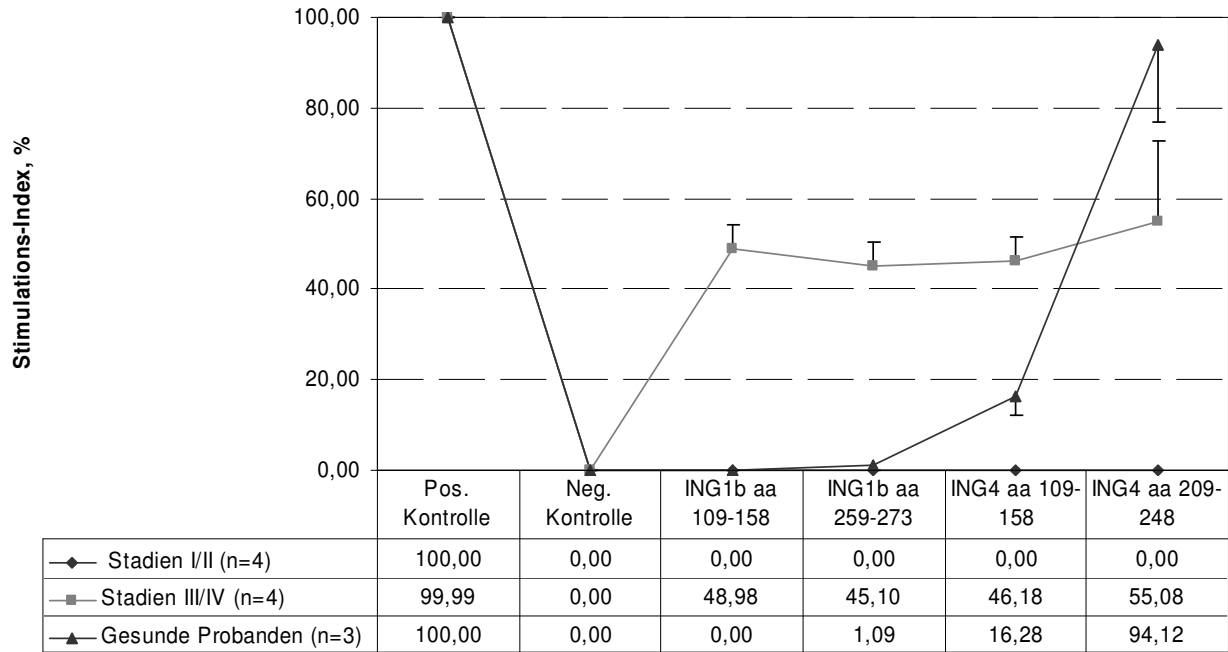
**Abbildung 3.13. Die IL-4 Produktion nach Stimulation mit spezifischen p33ING1b- und p29ING4-Peptidpools.** In PBLs von Patienten später Stadien wurde durch Inkubation mit aa 209-248 des p29ING4 ein höherer Stimulations-Index erreicht.



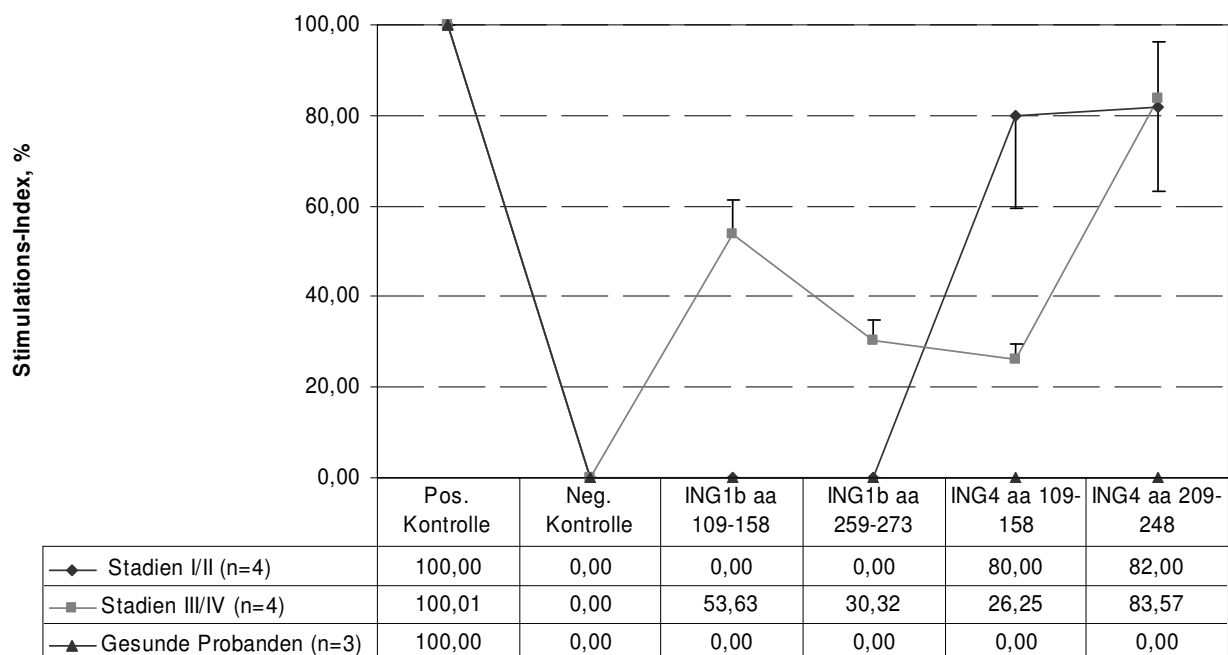
**Abbildung 3.14. Die IL-5 Produktion nach Stimulation mit spezifischen p33ING1b- und p29ING4-Peptidpools.** In PBLs von Patienten später Stadien wurde durch Inkubation mit aa 109-158 des p33ING1b und aa 209-248 des p29ING4 ein höherer Stimulations-Index erreicht.



**Abbildung 3.15. Die IL-6 Produktion nach Stimulation mit spezifischen p33ING1b- und p29ING4- Peptidpools.** Beide Sequenzen von p33ING1b und p29ING4 riefen eine IL-6 Produktion bei PBLs von Patienten früher Stadien hervor. Dabei erreichte der Stimulations-Index von beiden p29ING4 Sequenzen 80% bzw. 82%



**Abbildung 3.16. Die IL-13 Produktion nach Stimulation mit spezifischen p33ING1b- und p29ING4-Peptidpools.** In PBLs von Patienten später Stadien wurde durch Inkubation mit aa 109-158 des p33ING1b und aa 209-248 des p29ING4 ein höherer Stimulations-Index erreicht.



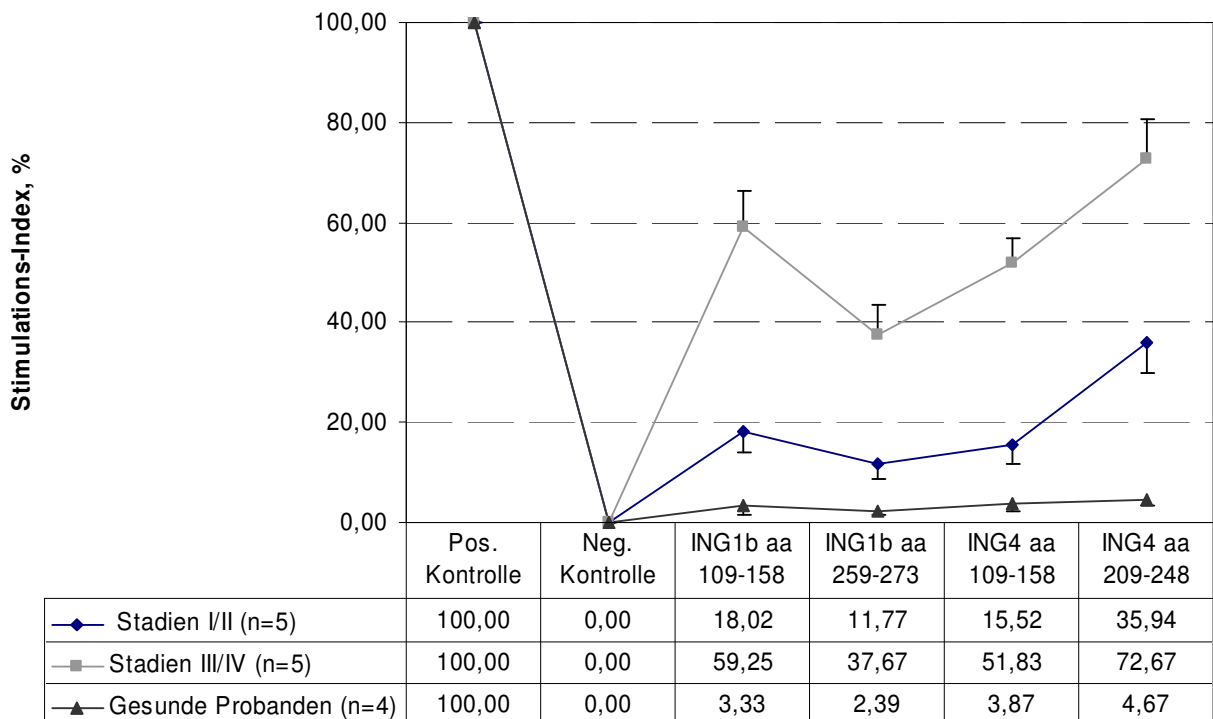
**Abbildung 3.17. Die TNF-α Produktion nach Stimulation mit spezifischen p33ING1b- und p29ING4-Peptidpools.** In PBLs von Patienten später Stadien wurde durch Inkubation mit aa 109-158 des p33ING1b und aa 209-248 des p29ING4 ein höherer Stimulations-index erreicht.

**3.1.5.2. Stimulation mit spezifischen p33ING1b und p29ING4 Peptidpools der CD4+ bzw. CD8+ depletierten peripheren Blutlymphozyten**

Um die durch Stimulation mit ING Peptiden entstehende Polarisation der T-Zellen festzustellen wurden Splenozyten analysiert, die entweder ihres CD4+ oder CD8+ Anteil depletiert waren.

**3.1.5.2.1. IFN- $\gamma$  Expression**

Sowohl CD4+ als auch CD8+ Lymphozyten von Patienten fortgeschrittener Tumorstadien wiesen nach Stimulation sowohl mit den p33ING1b Peptidpools (aa 109-158 und aa 259-273) als auch mit dem p29ING4 Peptidpool aa 109-158 keine signifikant unterschiedliche Stimulations-Indizes für IFN- $\gamma$  Produktion innerhalb jeder Zellpopulation auf. Der p29ING4 Peptidpool aa 209-248 rief eine stärkere Antwort bei CD4-Zellen (52,7 $\pm$ 5,7%) als bei CD8-Zellen (35,9 $\pm$ 4,3%) in frühen Stadien hervor (Abbildung 3.18., 3.20.). Dieser Pool wies aber keine signifikant unterschiedliche Aktivierung zwischen CD8-Zellen (72,7 $\pm$ 8,1%) und CD4-Zellen (67,7 $\pm$ 8,9%) von Patienten fortgeschrittener Stadien auf. Dieses spricht für eine potentiell induzierbare CD8 T-Zellantwort in frühen und späten Tumorstadien des Nierenzellkarzinoms (p29ING4 aa 209-248).



**Abbildung 3.18. Die IFN- $\gamma$  Produktion durch CD8 positive Zellen (CD4 Depletion) nach Stimulation mit den p33ING1b und p29ING4 Peptidpools.** Sowohl p33ING1b als auch p29ING4 Pools riefen die Aktivierung der CD8-Zellen von Tumorpatienten später Stadien in größerem Maß als der CD8-Zellen von Tumorpatienten früher Stadien hervor.

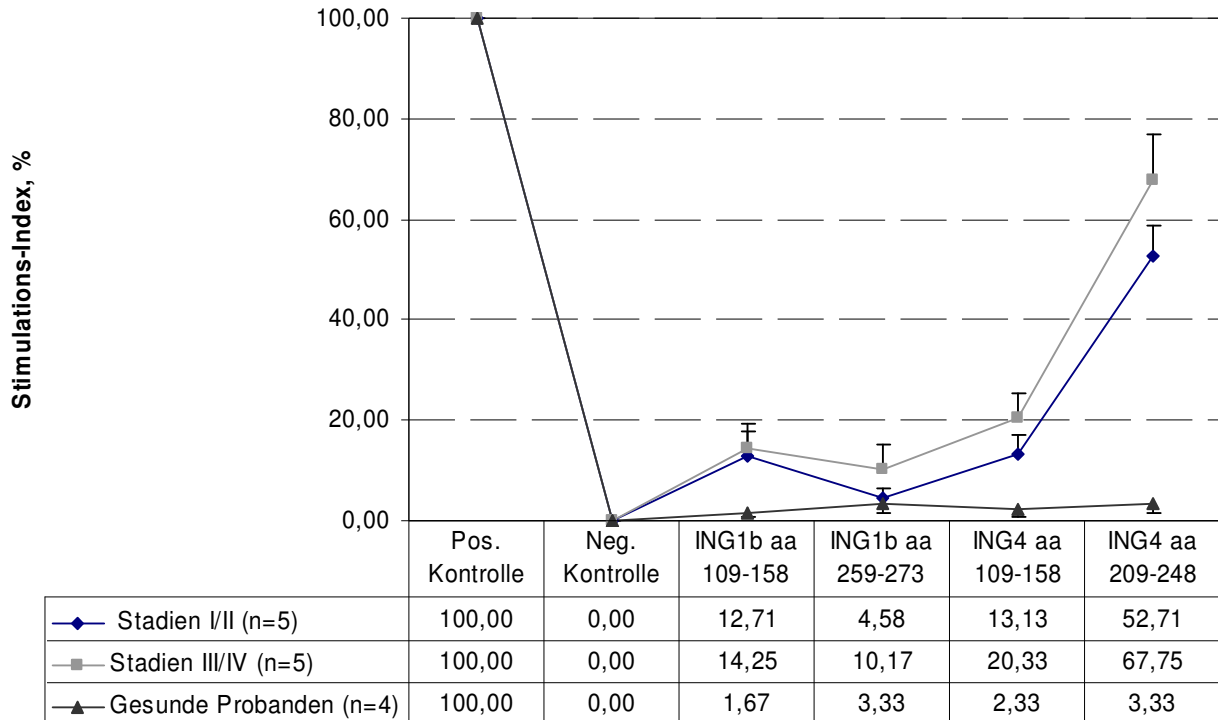


Abbildung 3.19. Die IFN- $\gamma$  Produktion durch CD4 positive Zellen (CD8 Depletion) zeigt eine signifikant angestiegene stadienunabhängige Aktivierung der CD4-Zellen durch Peptidpool aa 209-248 von p29ING4.

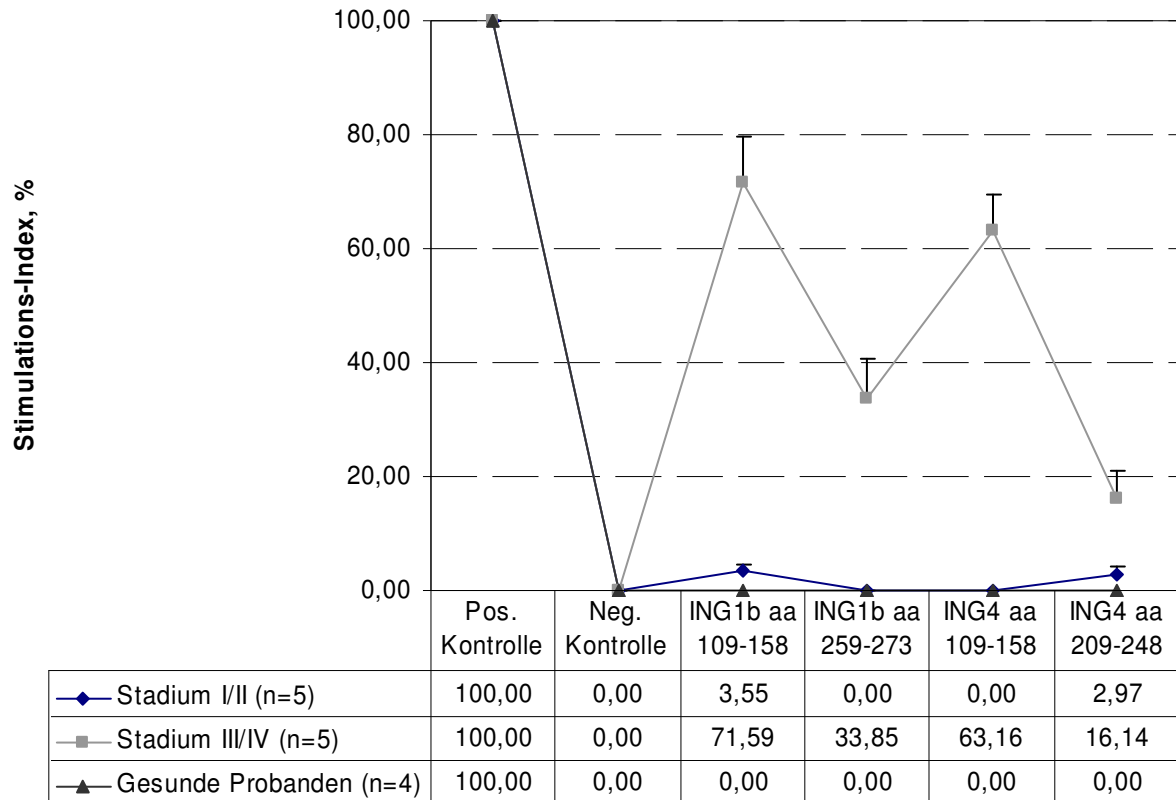
### 3.1.5.2.2. IL-10 Expression

Die Stimulation mit den ING-Peptidpools rief in beiden CD4 und CD8 Zellpopulationen überwiegend bei Patienten später Stadien eine Aktivierung von IL-10 positiven Zellen hervor. Die IL-10 Produktion war in CD8 positiven Zellen von Patienten aller Tumorstadien angestiegen, wobei in frühen Stadien nur leicht angestiegen in Antwort auf aa 109-158 und aa 209-248. CD4+ T-Zellen dagegen exprimierten IL-10, wenn sie ausschliesslich aus Patienten später Tumorstadien stammten. Im Gegensatz zu den CD4+ T-Zellen zeigten CD8+ T-Zellen die höchste IL-10 Expression nach Stimulation mit den Pools aa 109-158 von p33ING1b ( $71,6 \pm 7,9\%$ ) und aa 109-158 von p29ING4 ( $63,2 \pm 6,8\%$ ).

Die p29ING4 Sequenz aa 209-248 ergab die geringste IL-10 Expression sowohl in CD8+ ( $16,1 \pm 4,9\%$ ) als auch in CD4+ ( $3,0 \pm 1,6\%$ ) T-Zellen von Patienten fortgeschrittener Stadien.

In Patienten früher Stadien wurde keine IL-10 Expression durch stimulierte CD4+ T-Zellen gefunden (Abbildung 3.20., 3.21.).





**Abbildung 3.20. Die IL-10 Produktion durch CD8 positive Zellen (CD4 Depletion) nach Stimulation mit den p33ING1b und p29ING4 Peptidenpools.** Sowohl p33ING1b als auch p29ING4 Pools bewirkten die Aktivierung der CD8-Zellen von Tumorpatienten später Stadien in größerem Maß als der CD8-Zellen von Tumorpatienten früher Stadien.

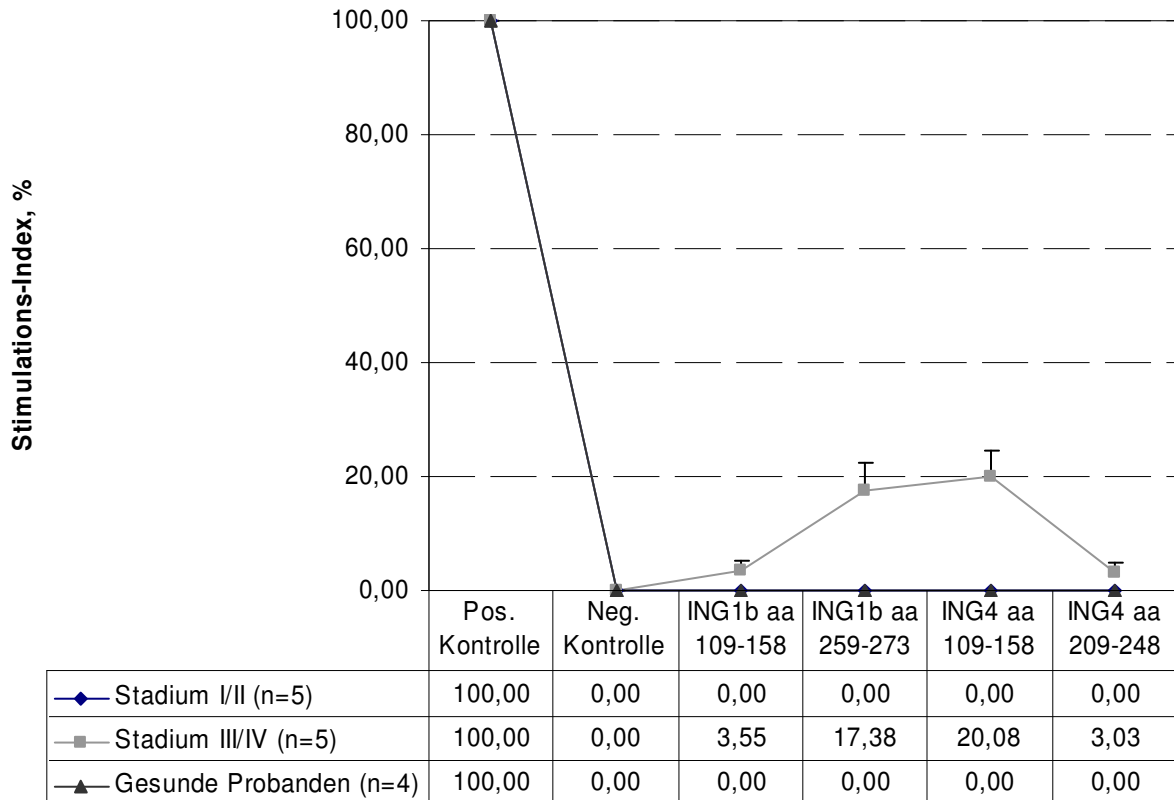


Abbildung 3.21. Die IL-10 Produktion durch CD4 positive Zellen (CD8 Depletion) nach Stimulation mit den p33ING1b und p29ING4 Peptidpools. Sowohl p33ING1b als auch p29ING4 Pools ergaben die Aktivierung IL-10 positiver CD4 Zellen ausschließlich von Tumorpatienten später Stadien.

### 3.1.5.2.3. IL-2 und IL-2R Expression

T-Zellen, die entweder ihres CD4+ oder CD8+ Anteil depletiert waren, und mit p33ING1b bzw. p29ING4 stimuliert wurden, sezernierten verhältnismäßig weniger IL-2 als nicht stimulierte T-Zellen. Dieses wurde für PBLs aus Tumorpatienten und auch aus gesunden Probanden beobachtet. Stimulierte T-Zellen aus Patienten früher Tumorstadien und aus gesunden Probanden zeigte auch keine angestiegene IL-2R Expression. Der Vergleich der CD8+ und der CD4+ T-Zell-Immunreaktivität in Patienten mit einem fortgeschrittenen Tumor deutete darauf hin, dass die IL-2R Expression in CD8+ T-Zellen durch alle ING-Peptide hervorgerufen wird, wogegen CD4+ T-Zellen ausschließlich durch Peptid aa 259-273 des p33ING1b stimuliert werden (Abbildung 3.22., 3.23.).

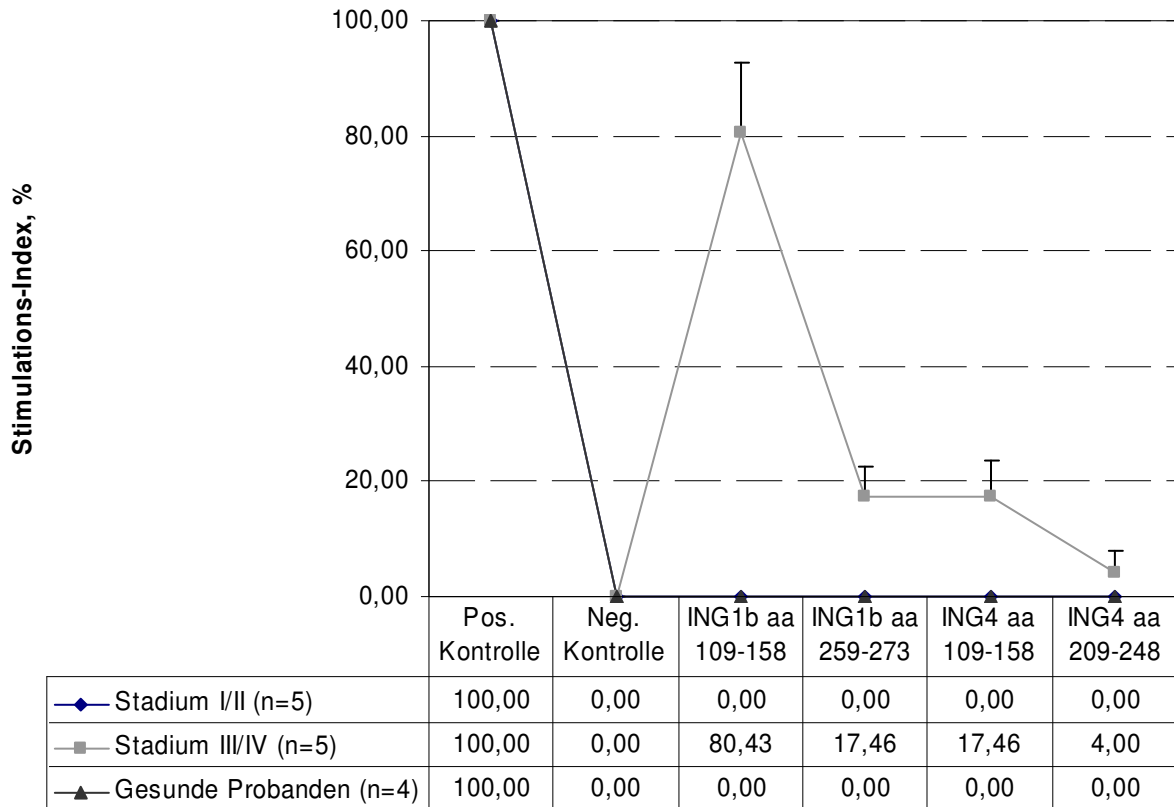


Abbildung 3.22. Die IL-2R Produktion durch CD8 positive Zellen (CD4 Depletion) zeigt sich sowohl nach der Stimulation mit p33ING1b als auch mit p29ING4 Pools ausschließlich bei Tumorpatienten später Stadien.

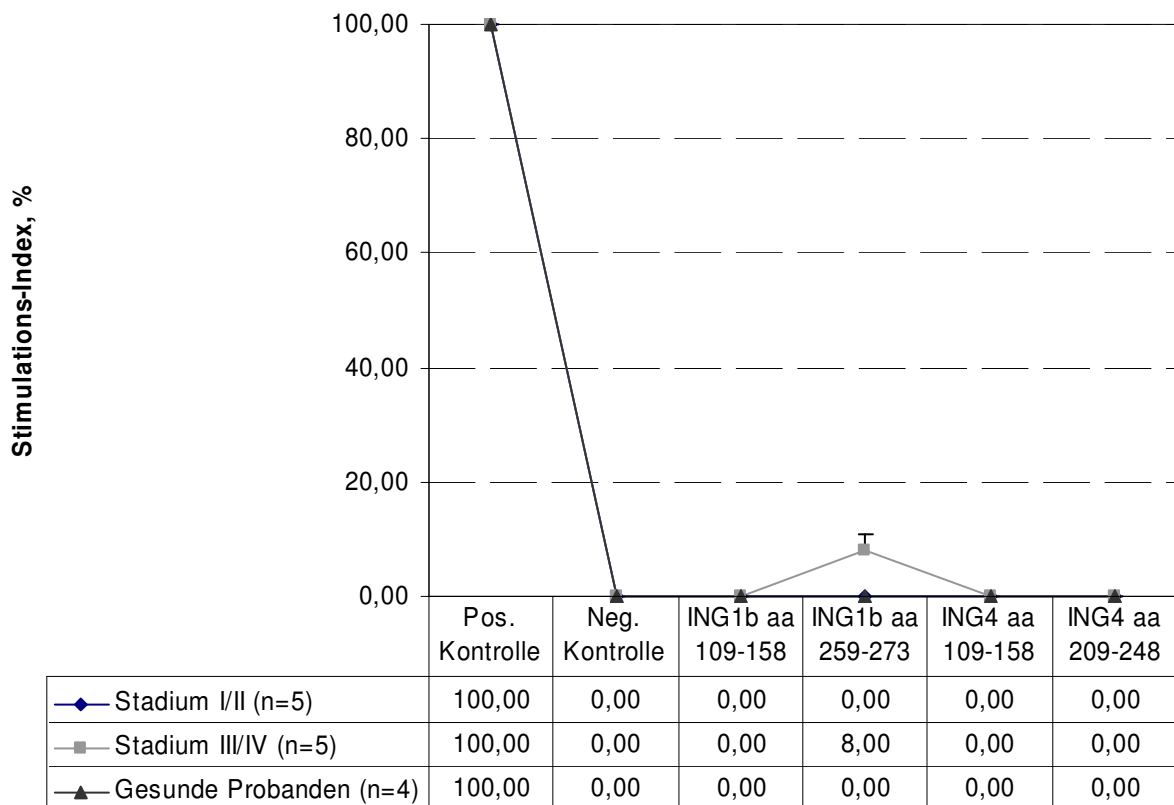
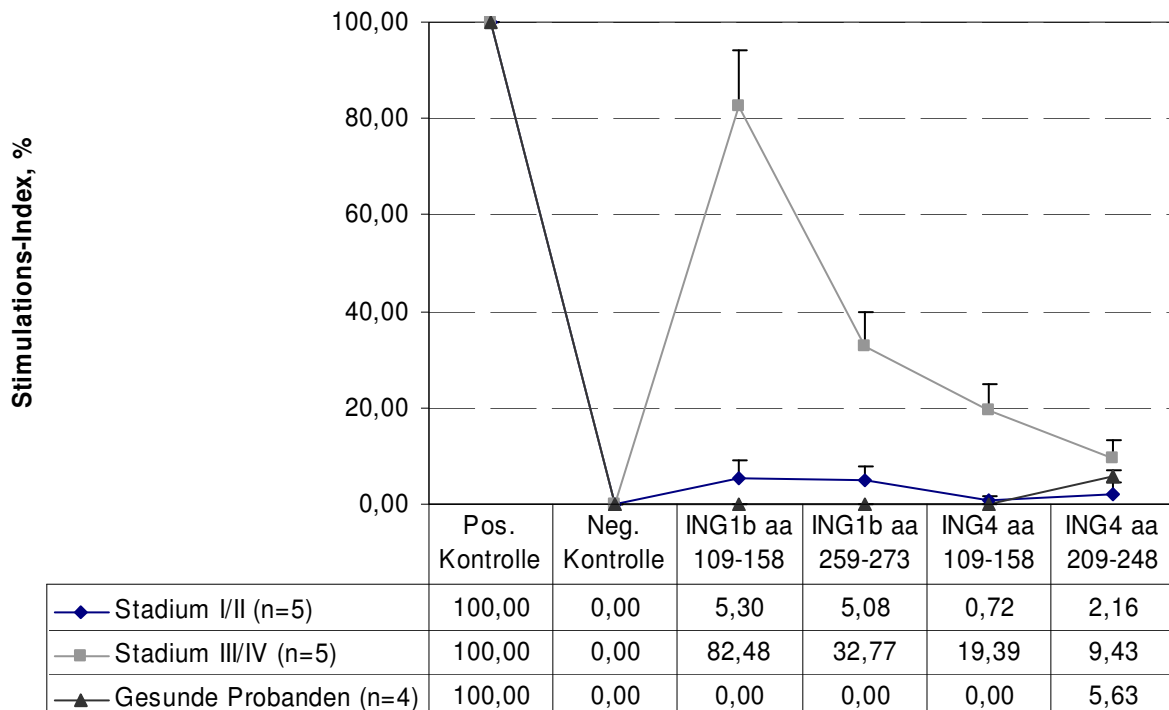


Abbildung 3.23. Die IL-2R Produktion durch CD4 positive Zellen (CD8 Depletion) zeigt sich nach der Stimulation mit aa 259-273 von p33ING1b ausschließlich bei Tumorpatienten später Stadien.

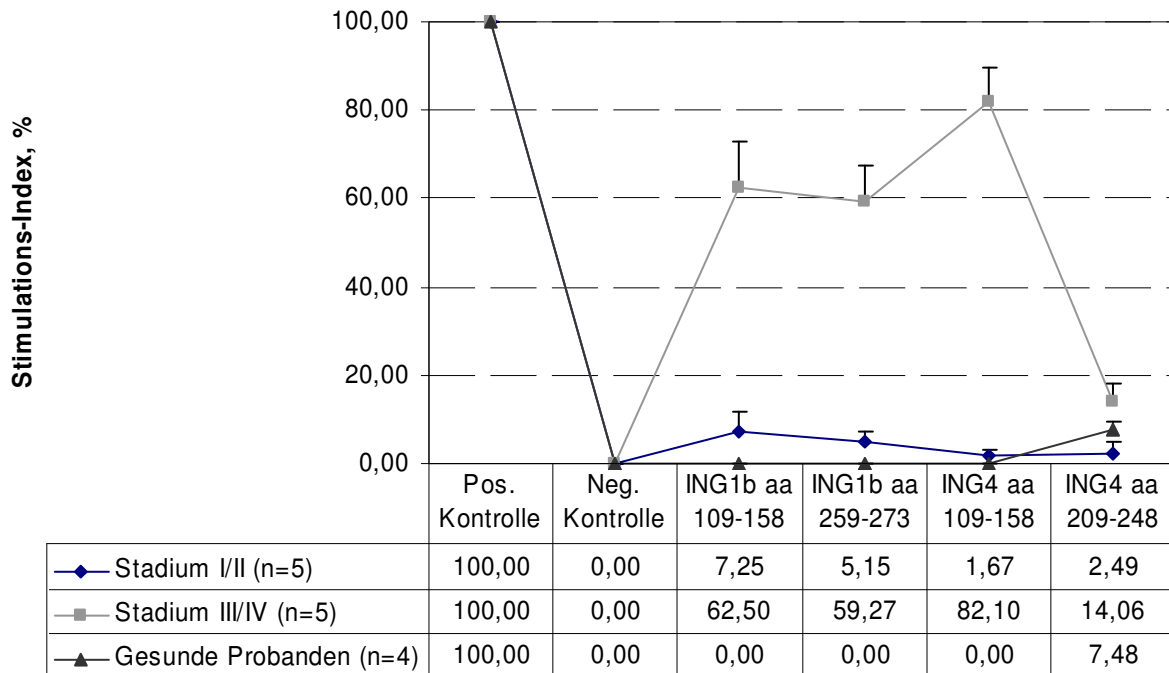
**3.1.5.2.4. IL-4, -5, -6 und -13 Expression**

T-Zellen, die entweder ihres CD4+ oder CD8+ Anteil depletiert waren, und mit p33ING1b bzw. p29ING4 stimuliert wurden, sezernierten verhältnismässig wenig IL-4, -5 und -13. Dieses konnte für PBLs sowohl von Tumorpatienten als auch von gesunden Probanden gezeigt werden.

Die IL-6 Expression wurde dagegen sowohl in CD4+ als auch in CD8+ T-Zellen gesehen. PBLs von Tumorpatienten verschiedener Stadien waren durch ING-Peptide stimuliert. PBLs von Patienten früher Tumorstadien antworteten auf Stimulation mit ING-Peptiden mit geringeren Stimations-Indizes: 5,3% für CD8- und 7,3% für CD4-Zellen (aa 109-158). Dabei wies die Stimulation mit ING-Peptidpools in beiden CD4+ und CD8+ Zellpopulationen von Patienten später Stadien eine stärkere Aktivierung von CD8- (Stimations-Indizes 9,4% bis 82,5%) und CD4-Zellen (Stimations-Indizes 14,1% bis 82,1%) auf. Die Sequenz aa 209-248 von p29ING4 zeigte auch vergleichbare stimulierende Wirkung auf CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen gesunder Probanden (Abbildung 3.24., 3.25.).



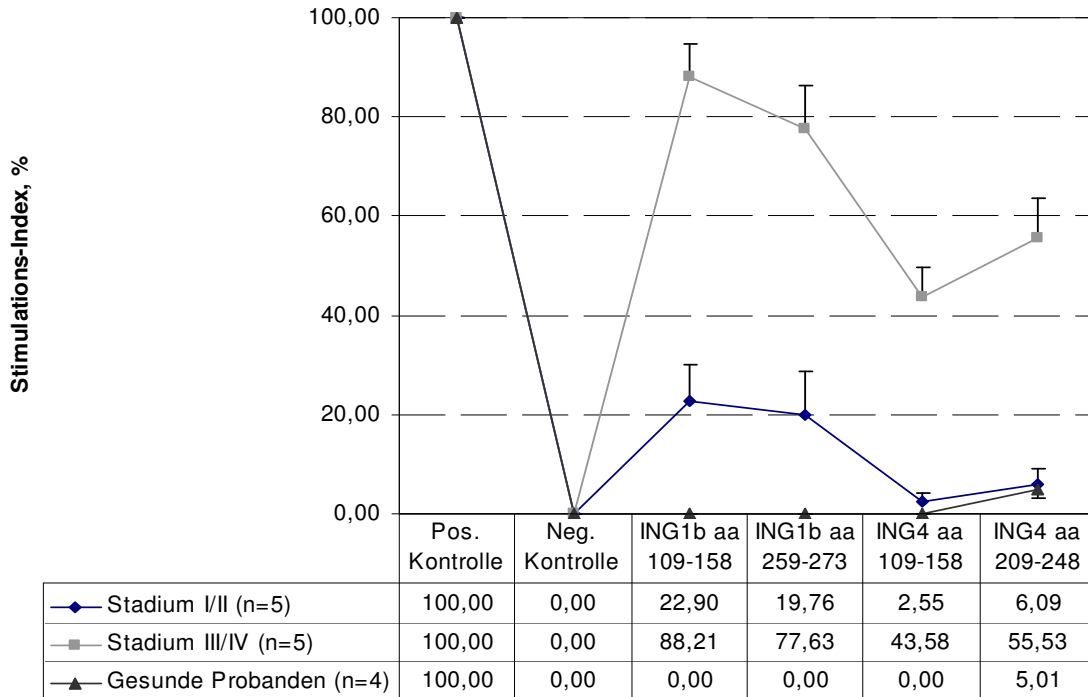
**Abbildung 3.24. IL-6 Produktion durch CD8 positive Zellen (CD4 Depletion).** Höhere IL-6 Produktion wurde nach Stimulation in CD8-Zellen von Tumorpatienten später Stadien gezeigt.



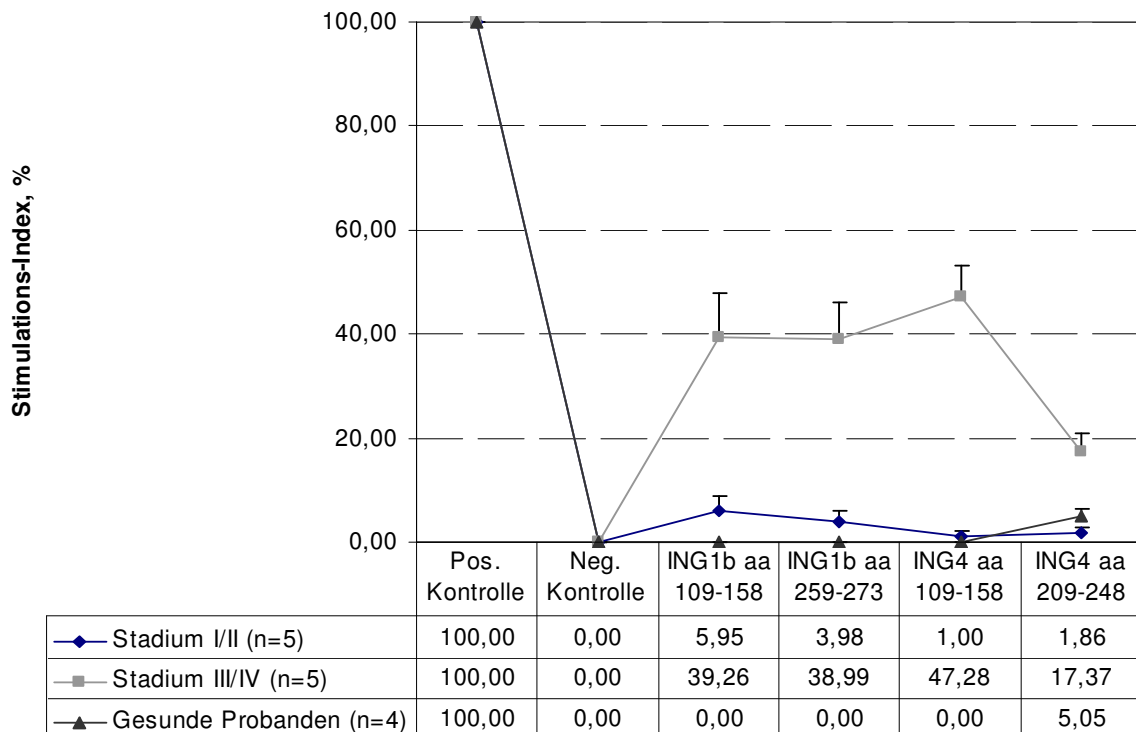
**Abbildung 3.25. IL-6 Produktion durch CD4 positive Zellen (CD8 Depletion).** Höhere IL-6 Produktion wurde nach Stimulation in CD4-Zellen von Tumorpatienten später Stadien gezeigt.

### 3.1.5.2.5. TNF- $\alpha$ , TNFR I und TNFR II Expression

Die TNF- $\alpha$  Expression wurde sowohl in CD4+ als auch in CD8+ T-Zellen gesehen. PBLs von Tumorpatienten verschiedener Stadien waren durch ING-Peptide stimuliert. Dabei erreichte die Stimulation mit den ING-Peptidpools eine stärkere Aktivierung von CD8- (Stimulations-Indizes 43,6% bis 88,2%) und CD4-Zellen (Stimulations-Indizes 17,4% bis 47,3%) in Zellpopulationen von Patienten später Stadien. PBLs von Patienten früher Tumorstadien antworteten auf ING Stimulation mit geringeren Stimulations-Indizes (unter 22,9% für CD8- und 5,9% für CD4-Zellen). Die Immunreaktivität von CD8-Zellen stieg in allen Tumorstadien in größerem Ausmaß an als CD4-Zellen. Die Sequenz aa 209-248 von p29ING4 hatte ebenfalls vergleichbare mit den Tumorstadien I/II stimulierende Wirkung auf CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen gesunder Probanden (Abbildung 3.26, 3.27.).

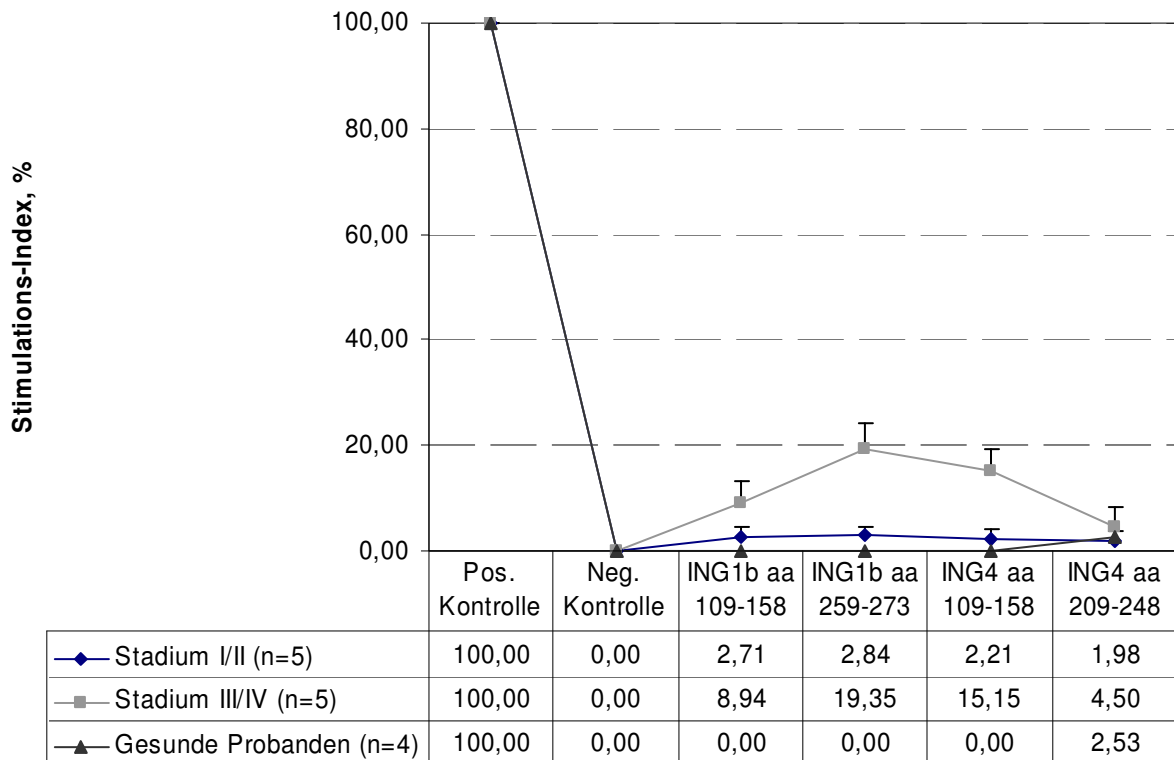


**Abbildung 3.26. TNF- $\alpha$  Produktion durch CD8 positive Zellen (CD4 Depletion).** PBLs von Tumorpatienten verschiedener Stadien konnten durch ING Peptide stimuliert werden. Dabei erreichte die Stimulation mit den ING-Peptidpools in der CD8 Zellpopulation von Patienten später Stadien eine höhere Aktivierung von CD8- (Stimulations-Indizes von 43,6% bis 88,2%). PBLs von Patienten früher Tumorstadien antworteten auf ING Stimulation mit geringeren Stimulations-Indizes: unter 22,9% für CD8-Zellen.

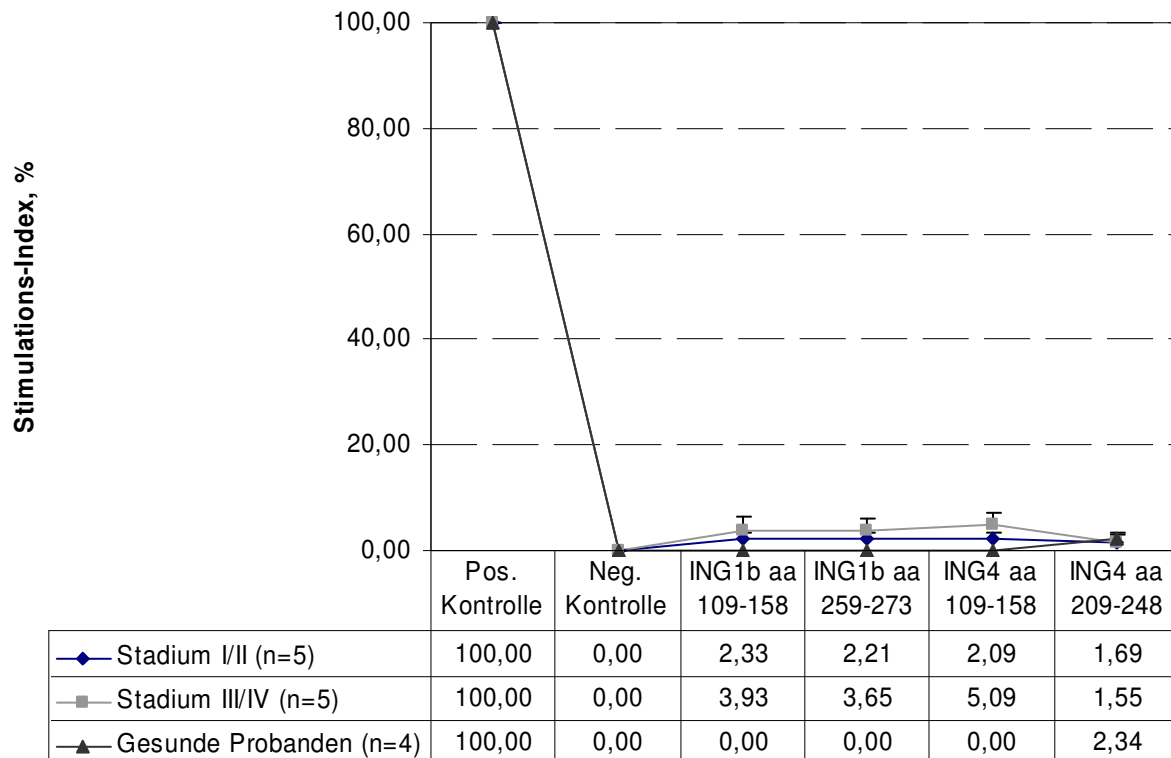


**Abbildung 3.27. TNF- $\alpha$  Produktion durch CD4 positive Zellen (CD8 Depletion).** PBLs von Tumorpatienten verschiedener Stadien konnten durch ING Peptide stimuliert werden. Dabei erreichte die Stimulation mit den ING-Peptidpools in der CD4 Zellpopulationen von Patienten später Stadien eine höhere Aktivierung von CD4-Zellen (Stimulations-Indizes von 17,4% bis 47,3%). PBLs von Patienten früher Tumorstadien antworteten auf ING Stimulation mit geringeren Stimulations-Indizes: unter 6,0% für CD4-Zellen.

Depletierte CD4+ und CD8+ Zellpopulationen wiesen nach der Stimulation keine erhöhte TNFR I Expression auf. Die TNFR II Expression sowohl durch CD4+ als auch CD8+ PBLs zeigte bei Patienten früher Stadien dagegen einen leichten Anstieg (maximal bis auf  $2,8\pm 1,3\%$ ) bei CD8+ T-Zellen. CD8+ PBLs aus Patienten später Stadien wiesen eine signifikant erhöhte TNFR II Expression auf ( $19,4\pm 5,8\%$  im Falle aa 259-273 von p33ING1b). Die ING-Pepidpools zeigten dafür bei den CD4 positiven PBLs nur einen unbedeutenden Anstieg der TNFR II Expression. Bei gesunden Probanden wurde keine durch Stimulation angestiegene TNFR II Expression gesehen.



**Abbildung 3.28.** Die TNFR II Produktion durch CD8 positive Zellen (CD4 Depletion) zeigte einen leichten Anstieg (maximal bis auf  $2,8\pm 1,3\%$ ) bei Patienten früher Stadien und einen signifikanten Anstieg ( $19,4\pm 5,8\%$  im Falle aa 259-273 von p33ING1b) bei Patienten später Stadien.



**Abbildung 3.29.** Der TNFR II Produktion durch CD4 positive Zellen (CD8 Depletion) zeigte einen leichten Anstieg, maximal bis auf  $2,3\pm 1,0\%$  bei Patienten früher Stadien und  $5,1\pm 2,7\%$  bei Patienten später Stadien.

### 3.1.5.3. Stimulation mit einzelnen Peptiden der p33ING1b und p29ING4 Proteine

Ferner wurde die Immunreaktivität der PBLs von zwölf Tumorpatienten und sechs gesunden Probanden mittels ELISPOT und LUMINEX untersucht. Um für die Immunaktivierung entscheidende p33ING1b bzw. p29ING4 Epitope zu identifizieren, wurde die Stimulation mit einzelnen neunzehn Aminosäuren langen Peptiden durchgeführt. Es wurden nur die Peptide getestet, die in den immunaktivierenden Peptidpools enthalten waren (siehe 3.1.5.1.).

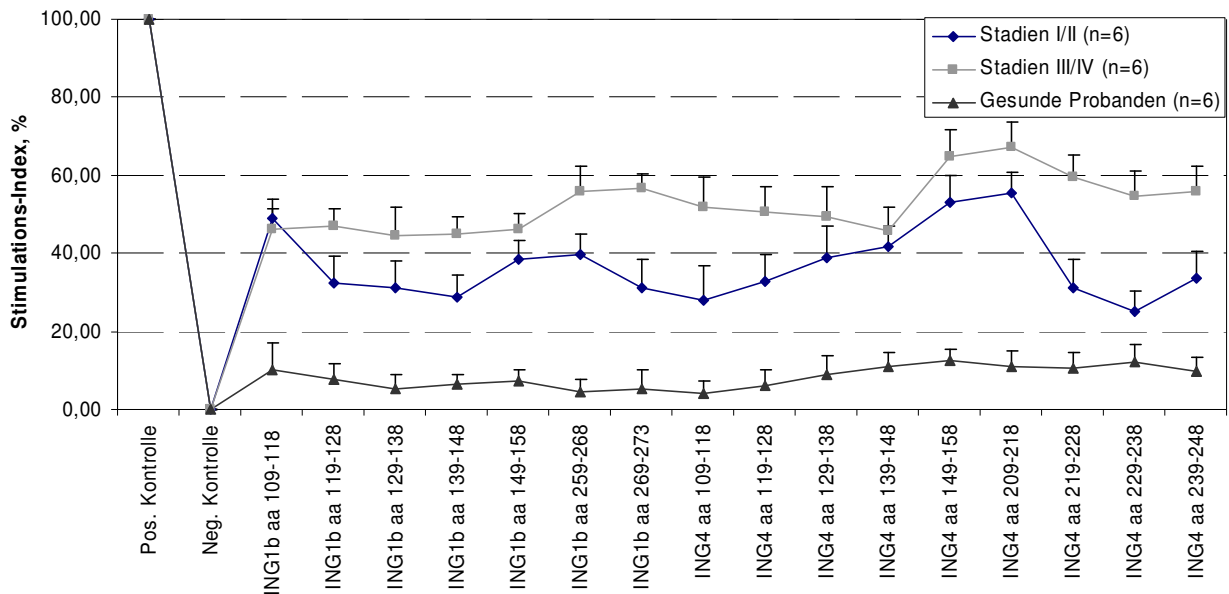
#### 3.1.5.3.1. IFN- $\gamma$ Expression

Im Vergleich zu den PBLs gesunder Probanden zeigte sich für alle p33ING1b und p29ING4 Epitope eine signifikant stärkere Sekretion von IFN- $\gamma$  in PBLs der Tumorpatienten. IFN- $\gamma$  zeigte dabei in PBLs aus Patienten fortgeschrittener Tumorstadien im Allgemein eine stärkere Sekretion als bei Patienten früher Stadien.

Einzelne p33ING1b Epitope (aa 109-118, aa 149-158 und aa 259-268) und p29ING4 Epitope (aa 149-158 und aa 209-218) aktivierten die PBLs der Patienten aller Stadien besonders ausgeprägt.



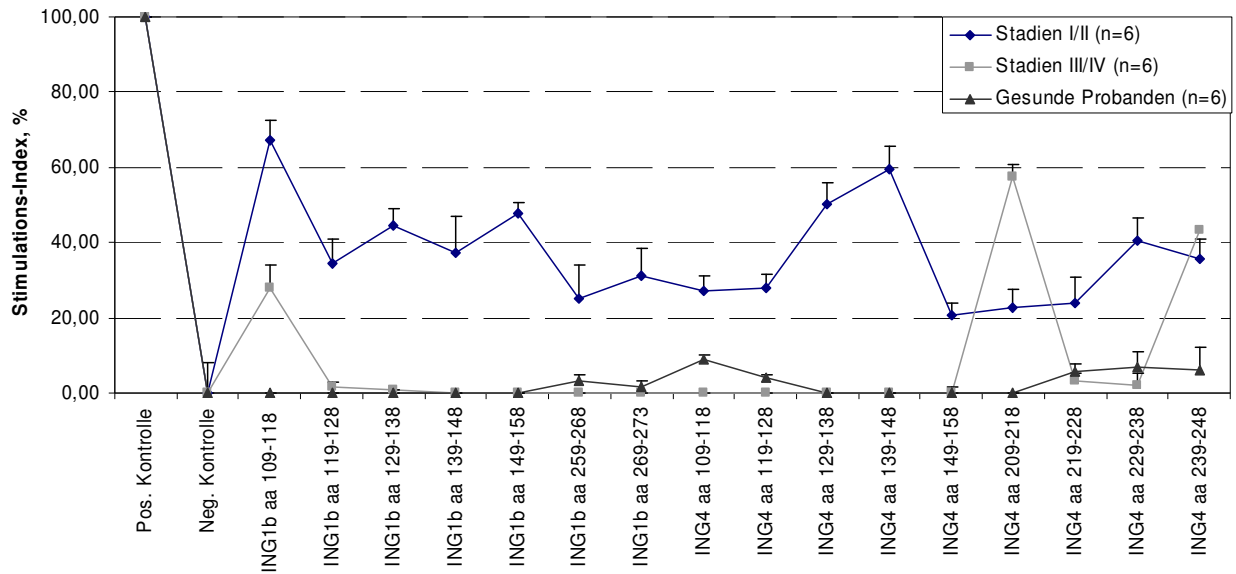
Der höchste Stimulations-Index wurde bei der Stimulation mit aa 209-218 des p29ING4 Proteins (55,4±6,0%) erreicht (Abbildung 3.30.).



**Abbildung 3.30. INF- $\gamma$  Produktion nach der Stimulation mit den p33ING1b- und p29ING4 Peptiden.** Die höchsten Stimulations-Indizes für Patienten der Stadien I/II wurden nach Stimulation mit aa 109-118, aa 149-158 und aa 259-268 des p33ING1b Proteins bzw. aa 149-158 und aa 209-218 des p29ING4 Proteins erreicht.

### 3.1.5.3.2. IL-10 Expression

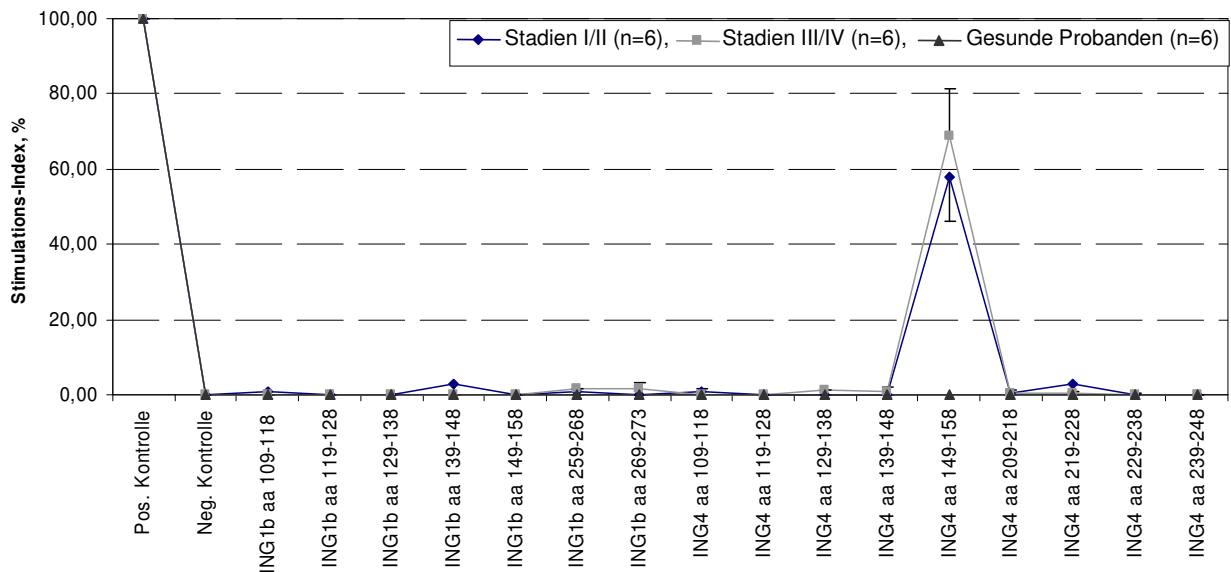
Als potenziell bedeutsam für eine Immunaktivierung waren die Sequenzen, die zu einer geringen IL-10 Expression in PBLs führen. Diese sind für die Tumorstadien I/II das p33ING1b-Peptid aa 259-268 sowie das p29ING4 Peptid aa 149-158 und 209-228. Diese Epitope riefen keine oder nur geringe IL-10 Expression in PBLs gesunder Probanden hervor. Für Patienten später Stadien wirkten nur die Sequenzen aa 109-118 des p33ING1b, aa 209-218 und 239-248 des p29ING4 hoch stimulierend (Abbildung 3.31.).



**Abbildung 3.31. IL-10 Produktion in PBLs der Tumorpatienten.** Geringere Stimulation der IL-10 Expression wiesen aa 259-268 von p33ING1b und aa 149-158 und 209-228 von p29ING4 für die Stadien I/II des NZKs auf. Diese Epitope riefen keine oder nur geringe IL-10 Expression in PBLs gesunder Probanden hervor.

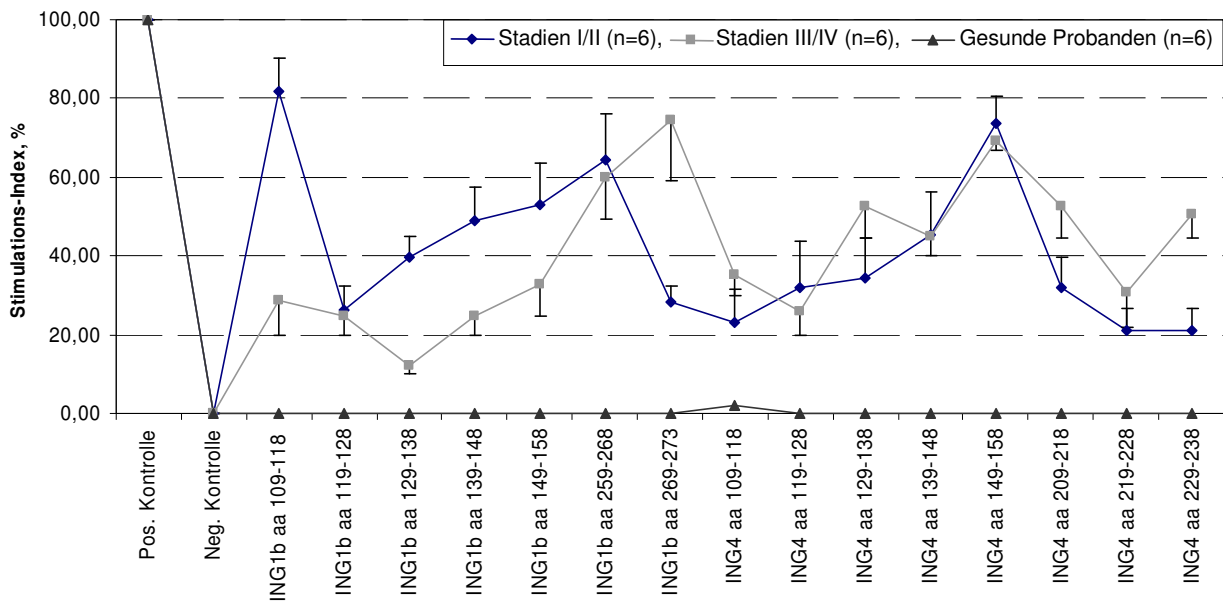
### 3.1.5.3.3. IL-2 und IL-2R Expression

Die Produktion von IL-2 war in PBLs der Tumorpatienten nach Stimulation mit der p29ING4 Sequenz aa 149-158 deutlich verstärkt nachweisbar. Andere Epitope riefen sowohl in PBLs der Tumorpatienten als auch gesunder Probanden keine angestiegene IL-2 Expression hervor (Abbildung 3.32.).



**Abbildung 3.32. Die Produktion von IL-2** war in PBL der Tumorpatienten nach Stimulation mit der Sequenz aa 149-158 von p29ING4 deutlich angestiegen. Andere Epitope riefen in PBLs sowohl von Tumorpatienten als auch von gesunden Probanden keine angestiegene IL-2 Expression hervor.

Eine verstärkte Expression des IL-2 Rezeptors wurde nach Stimulation mit mehreren Peptiden beobachtet. Die höchsten Stimations-Indizes zeigten sich in PBLs der Patienten früher Stadien nach Stimulation mit p33ING1b aa 109-118 ( $82,0 \pm 8,4\%$ ) und aa 259-268 ( $64,5 \pm 7,7\%$ ) und in PBLs der Patienten fortgeschrittener Stadien nach Stimulation mit p33ING1b aa 269-278 ( $74,6 \pm 11,4\%$ ). Interessanterweise wirkte die Sequenz aa 149-158 des p29ING4 Proteins für PBLs aus Tumorpatienten aller Stadien hoch stimulierend. Die Stimations-Indizes betragen dabei  $73,5 \pm 7,1\%$  für die Patienten früher Stadien und  $69,2 \pm 4,4\%$  für die Patienten fortgeschrittener Stadien. In PBLs gesunder Probanden ergab sich dagegen keine Stimulation (Abbildung 3.33.).

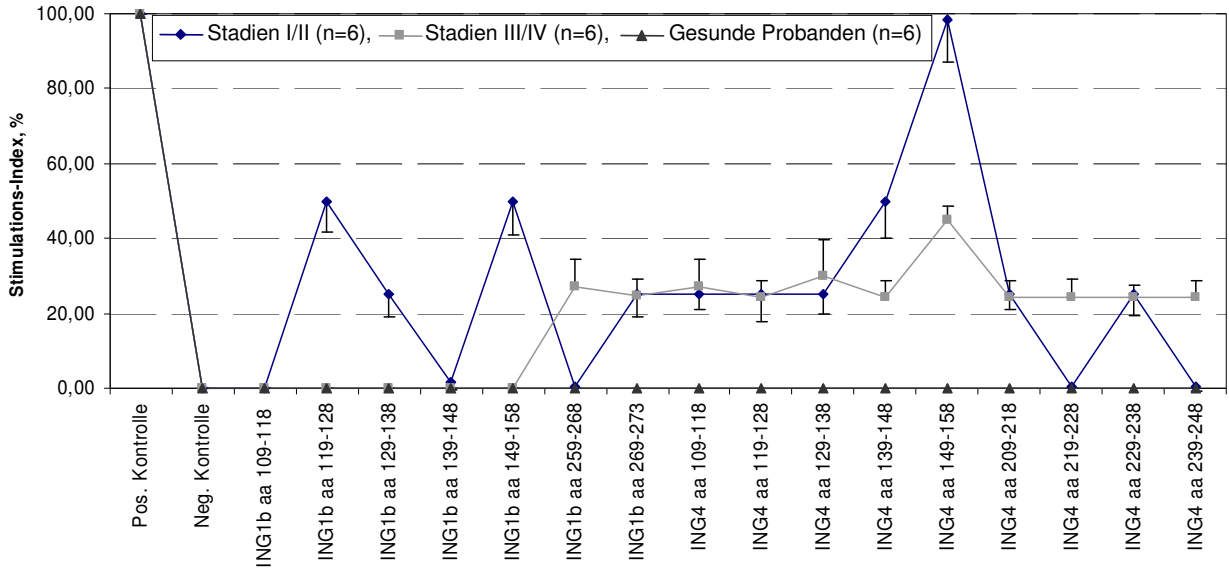


**Abbildung 3.33. Die Expression von IL-2R** war in PBLs der Tumorpatienten nach Stimulation mit der p29ING4 Sequenz aa 149-158 deutlich verstärkt. Es wurden die höchste Stimations-Indizes in PBLs der Patienten früher Stadien nach Stimulation mit p33ING1b aa 109-118 und aa 259-268 sowie in PBLs der Patienten fortgeschrittener Stadien nach Stimulation mit p33ING1b aa 269-278 erreicht. Diese Epitope riefen in PBLs gesunder Probanden keine angestiegene IL-2R Expression hervor.

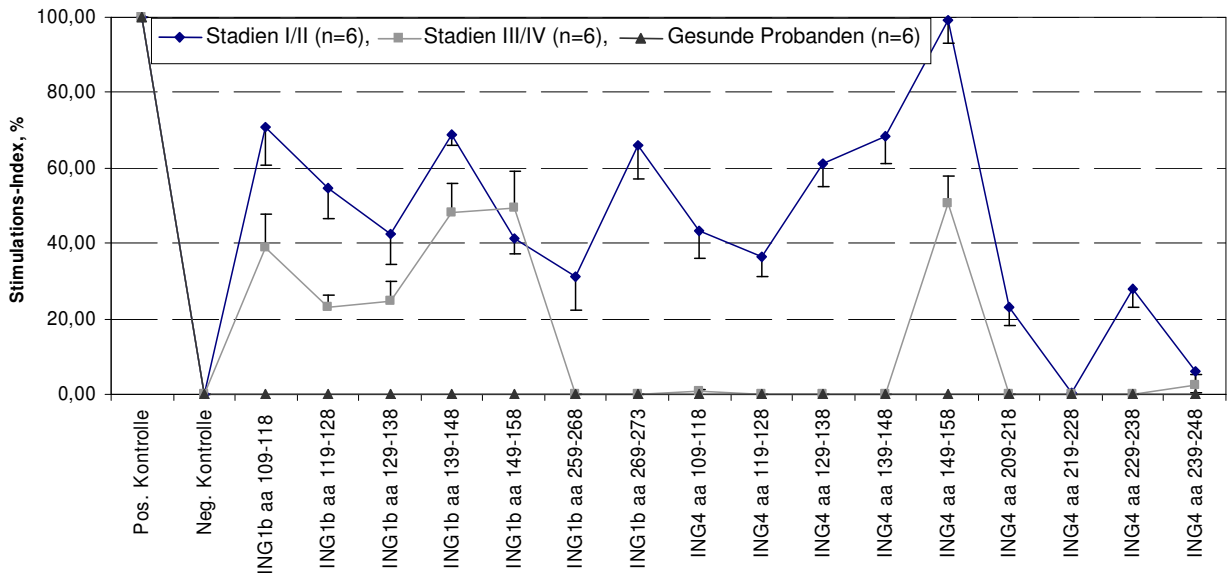
### 3.1.5.3.4. IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13 Expression

Der Expressionsanstieg von IL-4, -5, -6 und -13 hatte dagegen weniger deutlichen Charakter. Die Sequenz aa 149-158 des p29ING4 Proteins spielte dabei eine besonders wichtige Rolle für die Stimulation von IL-4, -5 und -13 in PBLs der Patienten früher Stadien und für die Stimulation von IL-4, -5, -6 und -13 in PBLs der Patienten später Stadien. Weiterhin zeigte sich ein deutlicher Anstieg der IL-4 Expression in PBLs der Patienten früher Stadien nach Stimulation mit den p33ING1b Peptiden aa 119-128, aa 149-158 und mit dem p29ING4 Peptid aa 139-148. Ferner wurde ein deutlicher Anstieg der IL-5 und IL-6 Expression mit den p33ING1b Peptiden aa 109-

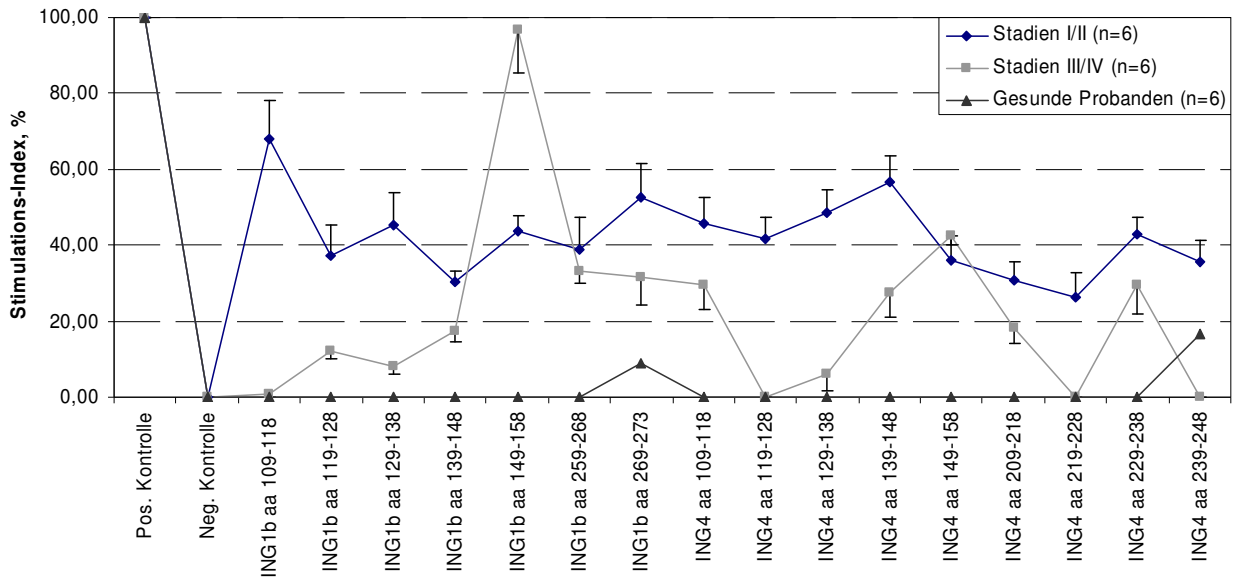
119, aa 139-148 (nur für IL-5), aa 269-273 und mit dem p29ING4 Peptid aa 129-148 detektiert. In PBLs gesunder Probanden fand sich lediglich eine erhöhte IL-6 Expression bei Stimulation mit dem p33ING1b Peptid aa 269-273 und p29ING4 Peptid aa 239-248 (Abbildungen 3.34. bis 3.37.).



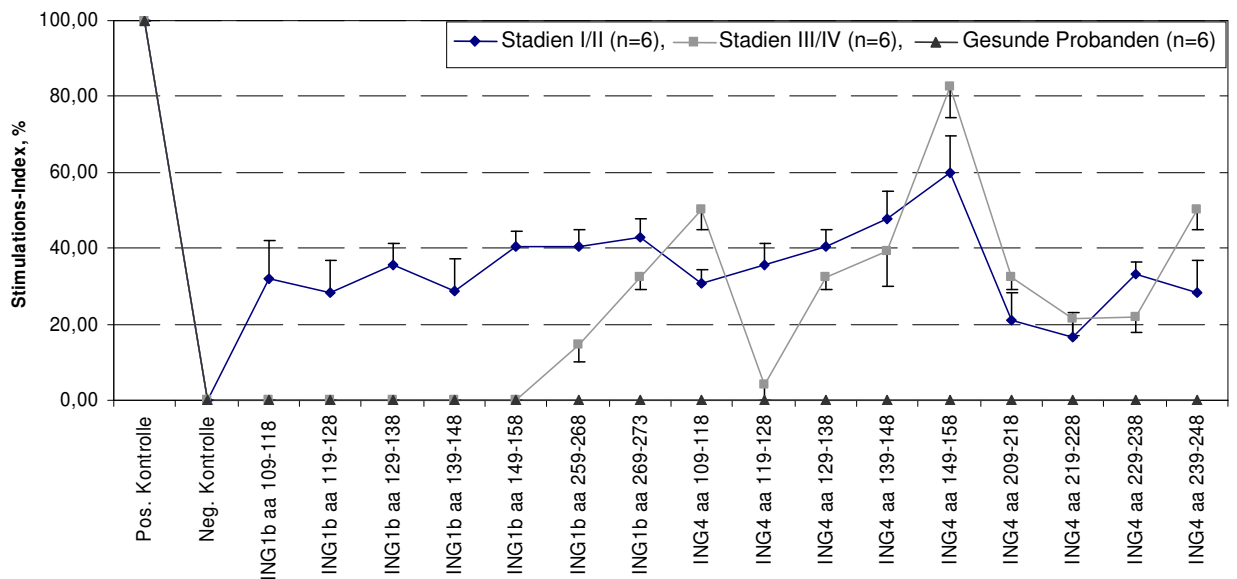
**Abbildung 3.34. Die Produktion von IL-4** zeigte in PBL der Tumorpatienten nach Stimulation mit der Sequenz aa 149-158 von p29ING4 einen deutlichen Anstieg. In PBLs gesunder Probanden fand sich keine IL-4 Expression.



**Abbildung 3.35. Die Produktion von IL-5** war in PBL der Patienten früher Stadien nach Stimulation mit der Sequenz aa 149-158 von p29ING4 deutlich angestiegen. In PBLs gesunder Probanden fand sich keine IL-5 Expression.



**Abbildung 3.36.** Die Produktion von IL-6 war in PBLs der Patienten früherer Stadien nach Stimulation mit den Sequenzen aa 109-118 von p33ING1b und aa 139-148 von p29ING4 deutlich angestiegen. Diese Epitope spielten keine Rolle für die IL-6 Stimulation in PBLs gesunder Probanden.

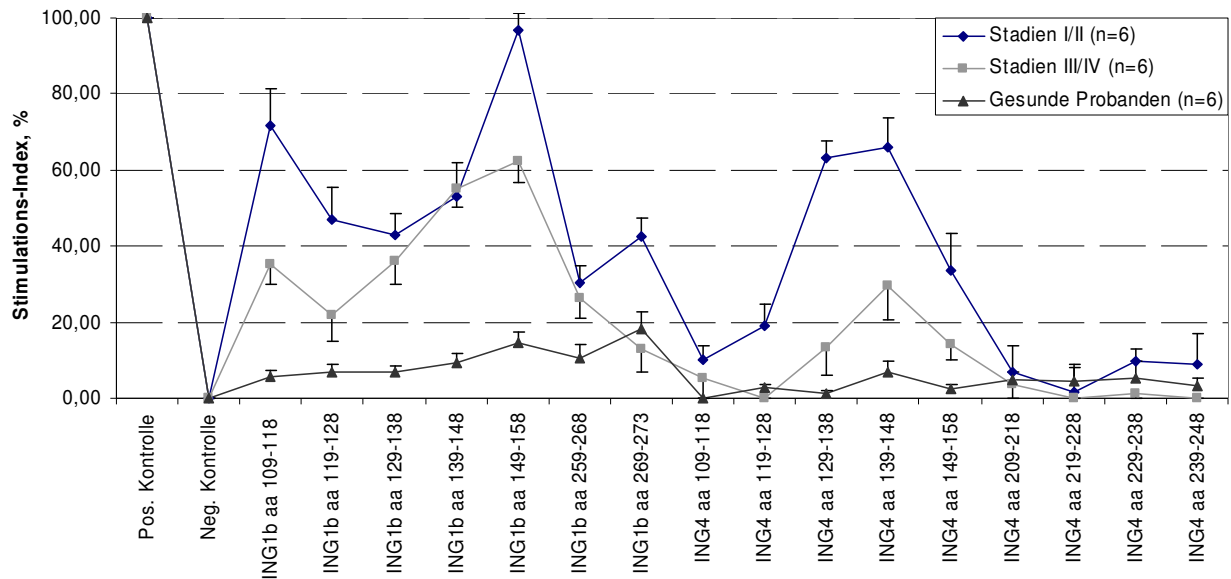


**Abbildung 3.37.** Die Produktion von IL-13 war in PBLs der Tumorprieten nach Stimulation mit der Sequenz aa 149-158 von p29ING4 deutlich angestiegen. In PBLs gesunder Probanden konnte keine IL-13 Expression festgestellt werden.

### 3.1.5.3.5. TNF- $\alpha$ , TNFR I und TNFR II Expression

Eine Stimulation der TNF- $\alpha$  Expression war in PBLs der Patienten früherer Stadien durch die p33ING1b Sequenzen aa 109-118, aa 149-158 und p29ING4 Sequenzen aa 129-138 und aa 139-148 hervorgerufen. Die Sequenz aa 149-158 des p33ING1b rief auch eine verstärkte TNF- $\alpha$

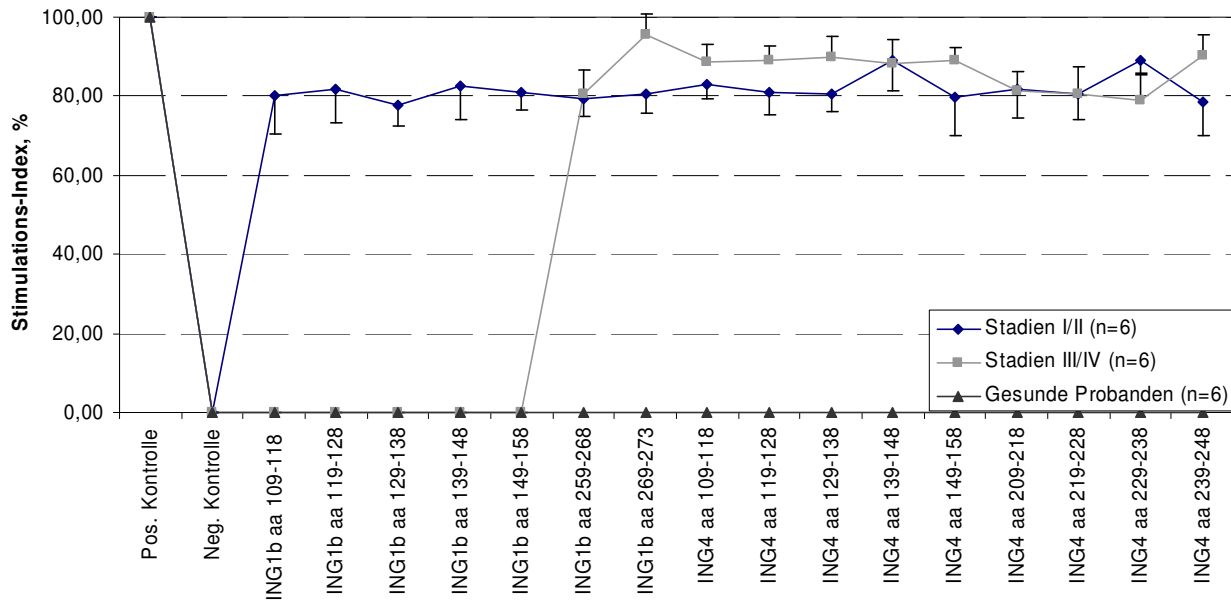
Expression bei Patienten fortgeschrittener Stadien. In PBLs gesunder Probanden bewirkten diese Sequenzen eine vergleichsweise geringe TNF- $\alpha$  Antwort (Abbildung 3.38.).



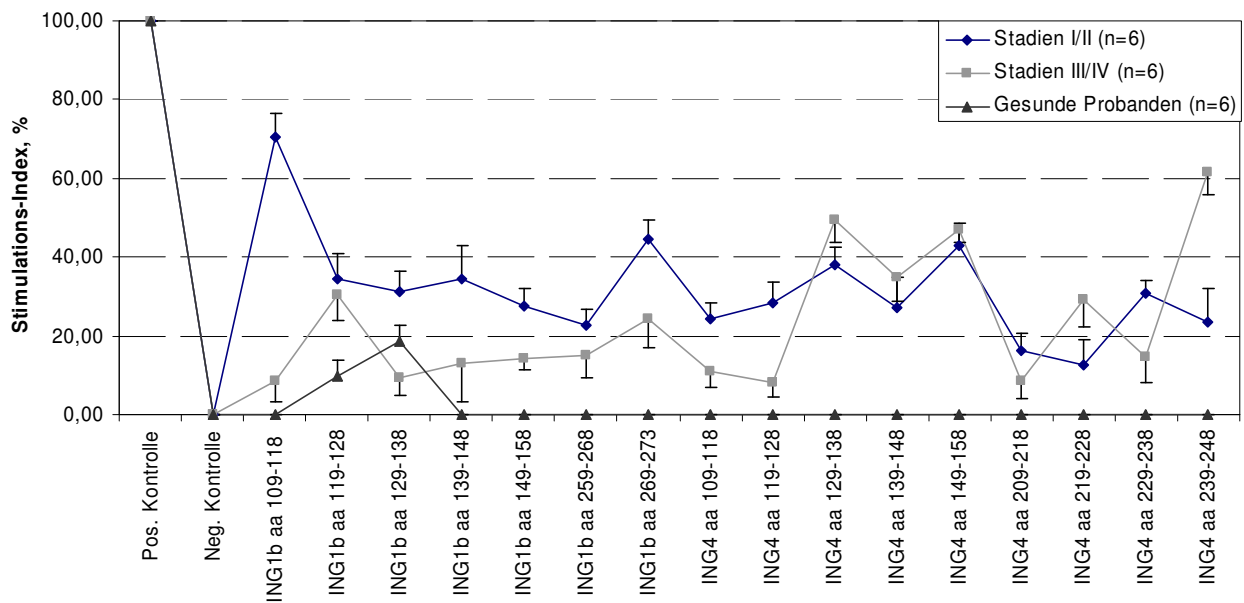
**Abbildung 3.38. Produktion von TNF- $\alpha$  in PBLs der Tumorpatienten.** Eine Stimulation der TNF- $\alpha$  Expression war in PBLs der Patienten früher Stadien durch die Sequenzen aa 109-118, aa 149-158 des p33ING1b und aa 129-148 des p29ING4 hervorgerufen. Die Sequenz aa 149-158 des p33ING1b rief auch eine verstärkte TNF- $\alpha$  Expression bei Patienten fortgeschrittener Stadien. In PBLs gesunder Probanden bewirkten diese Sequenzen eine vergleichsweise geringe TNF- $\alpha$  Antwort.

Eine Expression von TNFR I war durch Stimulation mit allen Peptiden in PBLs bei 56% der Patienten früher Stadien hervorgerufen. 44% der Patienten früher Stadien wiesen dagegen keinen Expressionsanstieg durch die Stimulation mit den ING Peptiden auf. In 52% der Patienten fortgeschrittener Stadien waren PBLs nicht in der Lage TNFR I zu exprimieren. Bei den 48% der Patienten fortgeschrittener Stadien konnte die TNFR I Expression durch Stimulation mit dem p33ING1b Peptid aa 259-273 und allen p29ING4 Peptiden in PBLs aktiviert werden. Die Expressionshöhe zeigte in beiden Fällen keinen signifikanten Unterschied. In PBLs gesunder Probanden wurde kein Expressionsanstieg des TNF Rezeptors I unter dem Einfluss von ING-Peptiden beobachtet (Abbildung 3.39.).

Die Expression von TNFR II wies dagegen verschiedene Werte auf. Effektive Stimulationen von PBLs aus Patienten aller Stadien zeigte sich für die Peptide aa 269-273 des p33ING1b, aa 129-138 und aa 149-158 des p29ING4. Die höchsten TNFR II Stimations-Indizes wurden durch das p33ING1b Peptid aa 109-118 in PBLs der Patienten früher Stadien ( $70,6 \pm 5,9\%$ ) und durch das p29ING4 Peptid aa 239-248 in PBLs der Patienten später Stadien ( $61,4 \pm 5,4\%$ ) erreicht. PBLs gesunder Probanden reagierten auf Sequenzen aa 119-128 und aa 129-138 von p33ING1b mit den TNFR II Stimations-Indizes  $9,7 \pm 3,8\%$  und  $18,8 \pm 4,1\%$  (Abbildung 3.40.).



**Abbildung 3.39. Expression von TNFR I in PBLs der Tumorpatienten.** Eine Expression von TNFR I war durch Stimulation mit allen Peptiden in PBLs von Patienten früherer Stadien (in 56% der Patienten) bzw. durch Stimulation mit dem p33ING1b Peptid aa 259-273 und allen p29ING4 Peptiden in PBLs aus Patienten fortgeschrittener Stadien (in 48% der Patienten) hervorgerufen. In PBLs gesunder Probanden wurde kein TNFR I Expressionsanstieg unter dem Einfluss von ING-Peptiden beobachtet.



**Abbildung 3.40. Expression von TNFR II in PBLs der Tumorpatienten.** Eine effektive Stimulation von PBLs der Patienten aller Stadien zeigte sich für die Peptide aa 269-273 des p33ING1b, aa 129-138 und aa 149-158 des p29ING4. Die höchsten TNFR II Stimations-Indizes wurden durch das p33ING1b Peptid aa 109-118 in PBLs der Patienten früherer Stadien (70,6±5,9%) und durch das Peptid p29ING4aa 239-248 in PBLs der Patienten späterer Stadien (61,4±5,4%) erreicht. PBLs gesunder Probanden reagierten auf die Sequenzen aa 119-128 und aa 129-138 des p33ING1b mit den TNFR II Stimations-Indizes 9,7±3,8% und 18,2±4,1%.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die aa 209-248 Sequenz von p29ING4 in frühen Stadien eine Aktivierung der Th1- und Th2-Zellen bewirkt, wobei in späten Stadien ein Gleichgewicht der CD4/CD8 Zellen erreicht wird. Eine suppressive Funktion bei der Stimulation mit der aa 209-248 Sequenz von p29ING4 erfüllen bei Patienten aller Tumorstadien überwiegend die CD8-Zellen.

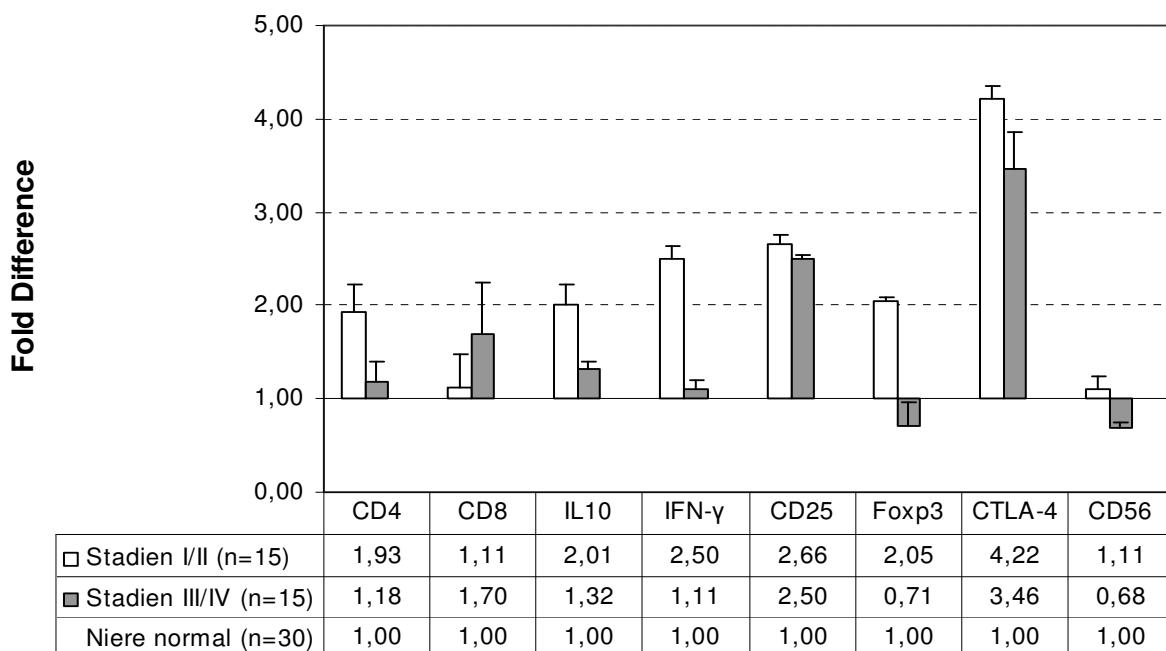
p29ING4 Epitop aa 149-158 zeigt eine stimulierende Wirkung auf IFN- $\gamma$  exprimierende CD4+ und CD8+ T-Zellen in den PBLs der Patienten mit einem NZK. Das gilt aber nicht für gesunde Probanden.

### 3.2. Untersuchung des Tumorgewebes

#### 3.2.1. Analyse tumor-infiltrierender Lymphozyten

##### 3.2.1.1. Real Time PCR Analyse der Genexpression immunologischer Marker

Die RNA aus Tumorgewebe von 32 Patienten wurde auf die Expression folgender Gene untersucht: CD4, CD8, CD25, CTLA4, Foxp3, CD56, IFN- $\gamma$  und IL-10. Im Tumor ergab die Analyse eine erhöhte Expression aller Marker im Vergleich zu normalem Gewebe. Davon ausgenommen waren Foxp3 und CD56 in den Stadien III/IV. Dabei wurde eine erniedrigte Anzahl an CD4 positiven Zellen bzw. T-Helfer (Th) Zellen und T-regulatorischen Zellen (Treg) sowie Natural Killer Zellen (NK) im Tumor fortgeschrittener Stadien festgestellt. Dieselbe Tendenz konnte für die Produktion von IFN- $\gamma$  und IL-10 nachgewiesen werden. CD8 Expression Level war stark variierend von Patient zu Patient (Abbildung 3.41.).



**Abbildung 3.41. Die Real Time PCR Analyse der Genexpression immunologischer Marker im Tumorgewebe** ergab in fortgeschrittenen Stadien der Krankheit eine erniedrigte Anzahl von CD4 positiven Zellen bzw. T-Helfer Zellen und T-regulatorischen Zellen, Natural Killer Zellen, IFN- $\gamma$  und IL-10 Expression.



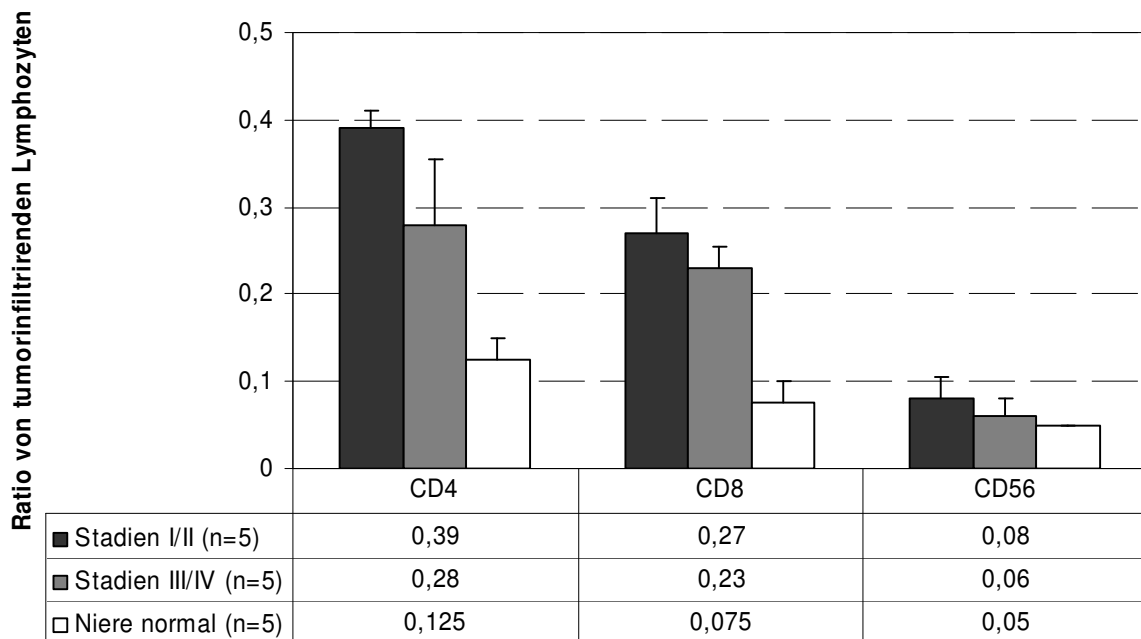
### 3.2.1.2. Immunhistochemische Analyse immunologischer Marker im Tumorgewebe und in tumor-infiltrierenden Lymphozyten

Bei der immunhistologischen Auswertung von 10 Tumorpatienten wurde der prozentuale Anteil von Tumorzellen mit Positivität für spezifische immunologische Marker und tumor-infiltrierender Lymphozyten im Tumorgewebe semiquantitativ bestimmt. Alle untersuchten Marker (CD4, CD8, CD25, CTLA4, Foxp3, CD56, IFN- $\gamma$  und IL-10) zeigten hinsichtlich ihres Expressionsmusters eine erhöhte Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe. Der Rückgang in der Anzahl CD4-, CD8-, CD25-, CTLA4-, Foxp3-, CD56-, IFN- $\gamma$ - und IL-10-positiver Zellen bei Vergleich früher mit fortgeschrittenen Stadien war deutlich erkennbar (Abbildungen 6.1.4. bis 6.1.10.). Die gemittelten Werte der immunhistologischen Analyse aller verwendeten Marker sind in Tabelle 3.1. dargestellt.

**Tabelle 3.1. Die semiquantitative immunhistologische Analyse des Nierentumorgewebes von CD4, CD8, CD25, CTLA4, Foxp3, CD56, IFN- $\gamma$  und IL-10** zeigten hinsichtlich ihres Expressionsmusters eine erhöhte Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe. Der Rückgang in der Anzahl CD4-, CD8-, CD25-, CTLA4-, Foxp3-, CD56-, IFN- $\gamma$ - und IL-10-positiver Zellen bei Vergleich früher mit fortgeschrittenen Stadien war deutlich erkennbar.

Marker	Normale Niere (%)	NZK, Stadien I/II (%)	NZK, Stadien III/IV (%)
CD4/CD25	5 $\pm$ 1,9	23 $\pm$ 4,8	15,5 $\pm$ 3,5
CD4/CTLA-4	5 $\pm$ 2,4	21,5 $\pm$ 5,3	12,5 $\pm$ 2,9
CD4/Foxp3	5 $\pm$ 2,1	22,3 $\pm$ 5,1	13,8 $\pm$ 3,2
IL-10	4 $\pm$ 1,3	25,5 $\pm$ 4,3	18,1 $\pm$ 3,3
IFN- $\gamma$	4,5 $\pm$ 1,8	20,5 $\pm$ 3,9	15,5 $\pm$ 2,7
CD4	10 $\pm$ 2,1	30 $\pm$ 4,6	22,5 $\pm$ 3,8
CD8	10 $\pm$ 1,8	29,2 $\pm$ 5,3	19,5 $\pm$ 3,4
CD56	4,5 $\pm$ 1,3	22,0 $\pm$ 4,2	12,5 $\pm$ 2,6

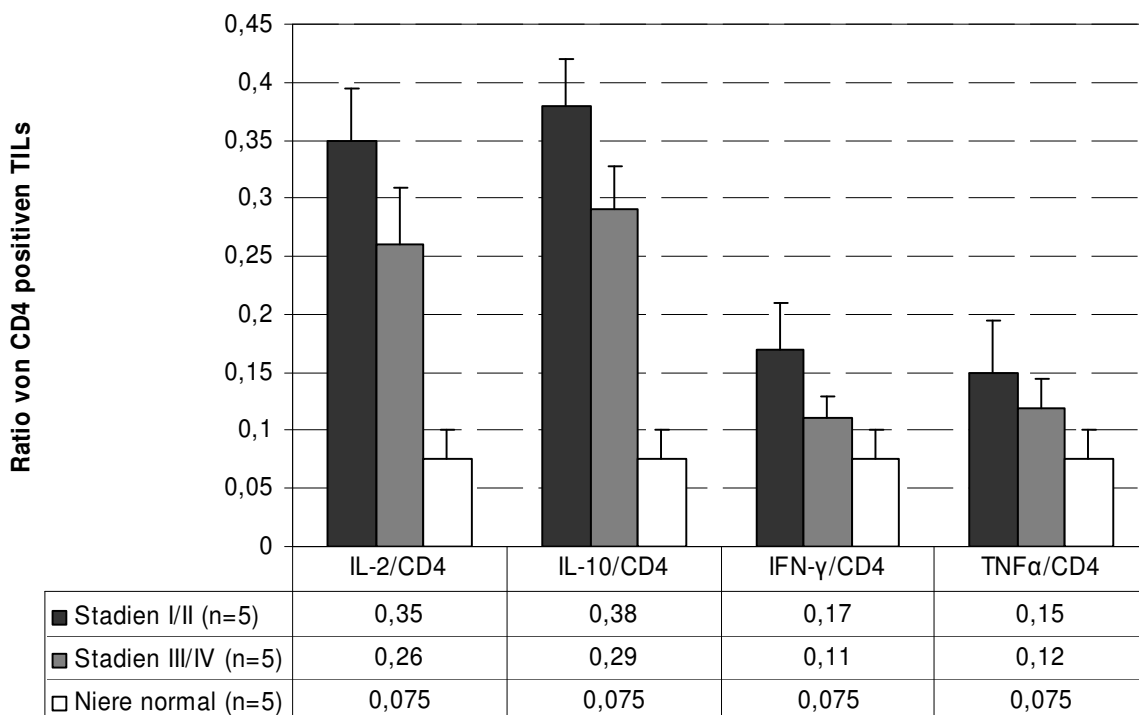
Bei semiquantitativer immunhistologischer Auswertung konnte gezeigt werden, dass tumorinfiltrierende CD4 positive Zellen im Tumorgewebe aller Stadien und CD4 positive Zellen in der gesunden Niere im Vergleich zu CD8 und CD56 positiven Zellen dominieren. Dabei wurde für CD4+, CD8+ und CD56+ Zellen sowohl ein bedeutender Anstieg im Tumorgewebe in früherer Stadien der Krankheit festgestellt, als auch eine rückgängige Tendenz beim weiteren Tumorstadium. Am wenigsten veränderte sich bei der Tumorentwicklung die Anzahl an CD56 positiven Zellen im Vergleich zu der gesunden Niere (Abbildung 3.42.).



**Abbildung 3.42.** Der Anteil von tumor- bzw. gewebeinfiltrierenden CD4+, CD8+, CD56+ Zellen nimmt im Tumorgewebe beim Vergleich Patienten früherer Stadien, späterer Stadien und normalem Nierenparenchym ab.

**3.2.1.3. Immunhistologische Analyse CD4+ Lymphozyten**

Immunhistochemisch fanden sich im Tumorgewebe Th1 (CD4/IL-2 und CD4/IFN- $\gamma$  doppelt positive Zellen), CD4 bzw. Treg (CD4/IL-10) und CD4/TNF- $\alpha$  exprimierende Zellen. Für diese Zellpopulationen zeigte sich ein stadienabhängiger Anstieg in der Zellanzahl bei der Entstehung des Nierenzellkarzinoms. In fortgeschrittenen Stadien ging die Anzahl CD4 positiver Zellen im Vergleich zu früher Tumorstadien zurück. Die gesunde Niere wies eine vergleichbare Anzahl an diesen Zellen auf, während im Tumor diese Zellpopulationen in unterschiedlichem Ausmaß auftraten. So stieg die Anzahl IL-10 positiver CD4+ T-Zellen bis auf  $38\pm 4\%$  in den Stadien I/II des Tumors und bis auf  $29\pm 3,7\%$  in den Stadien III/IV an. IL-2 positive CD4+ Zellen erreichten  $35\pm 4,5\%$  in frühen Stadien und  $26\%\pm 4,9\%$  in späteren Stadien. Dagegen betrug die Reduktion für IFN- $\gamma$  positive CD4+ Zellen bei Progression des Tumors von frühen Stadien zu fortgeschrittenen Stadien nur 6% und für CD4/TNF- $\alpha$  doppelt positive Zellen nur 3% (Abbildung 3.43).



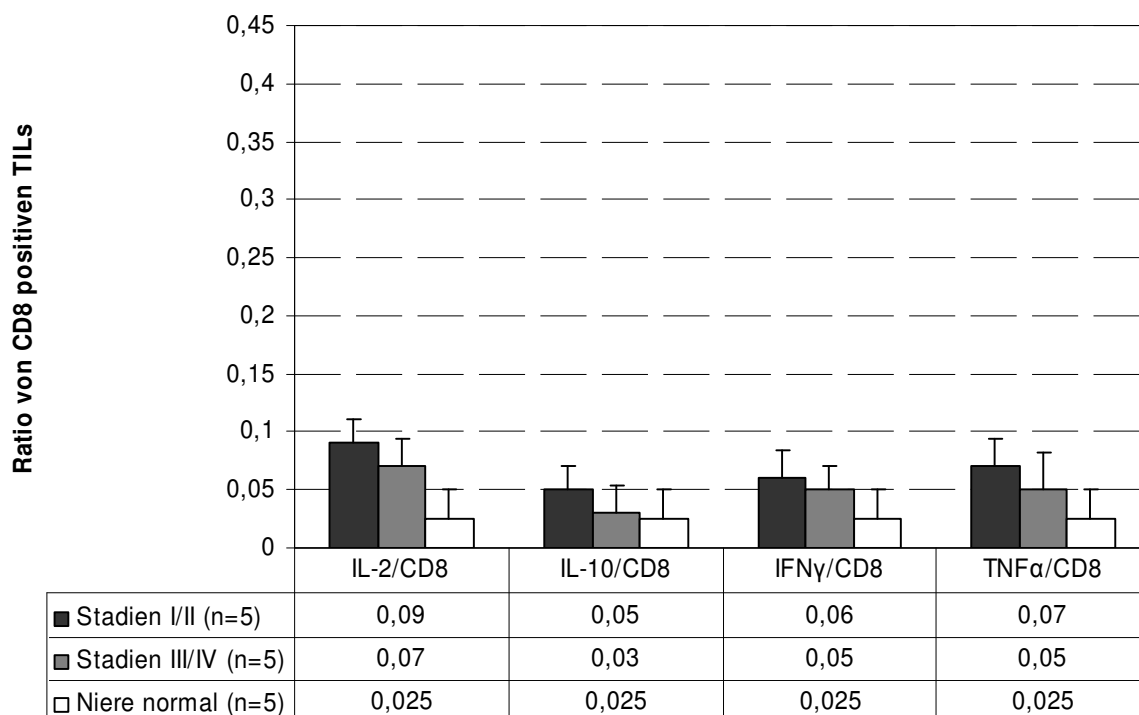
**Abbildung 3.43. Anteil von tumor- bzw. gewebeinfiltrierenden CD4 positiven Zellpopulationen.** Diese Zellpopulationen weisen einen Anstieg der Zellanzahl im Tumorgewebe im Vergleich zu gesunder Niere auf. Stadienabhängig ging die Zellzahl dieser Population bei der Entwicklung des Tumors zurück.

### 3.2.1.4. Immunhistologische Analyse CD8+ Lymphozyten

CD8 positive tumor-infiltrierende Lymphozyten lagen im Tumorgewebe aller Stadien und in Präparaten gesunder Nieren in signifikant geringeren Mengen als CD4 positive Zellen vor.

Immunhistologisch wurden IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  positive CD8+ Zellen im Tumorgewebe im Vergleich zum Nierennormalgewebe verstärkt nachgewiesen. Stadienabhängig nahmen diese Populationen bei Progression des Tumors ab. Die Anordnung der Zytokine nach dem Anteil der sie exprimierenden CD8+ Zellen ergibt die Reihenfolge: IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-10. Hierbei liegt eine absteigende Tendenz vor, d.h. IL-2 wird in dieser Zytokingruppe von dem größten Anteil, während IL-10 vom geringsten Anteil an CD8+ Zellen exprimiert wird.

Bei Vergleich CD8/IFN- $\gamma$  doppelt positiver (vermutlich zytotoxische Tc1-Zellen) und CD8/IL-10 doppelt positiver Zellen (vermutlich Suppressor Tc2-Zellen) konnte ein leichter *Shift* zu zytotoxischen Zellen gesehen werden (Abbildung 3.44.).

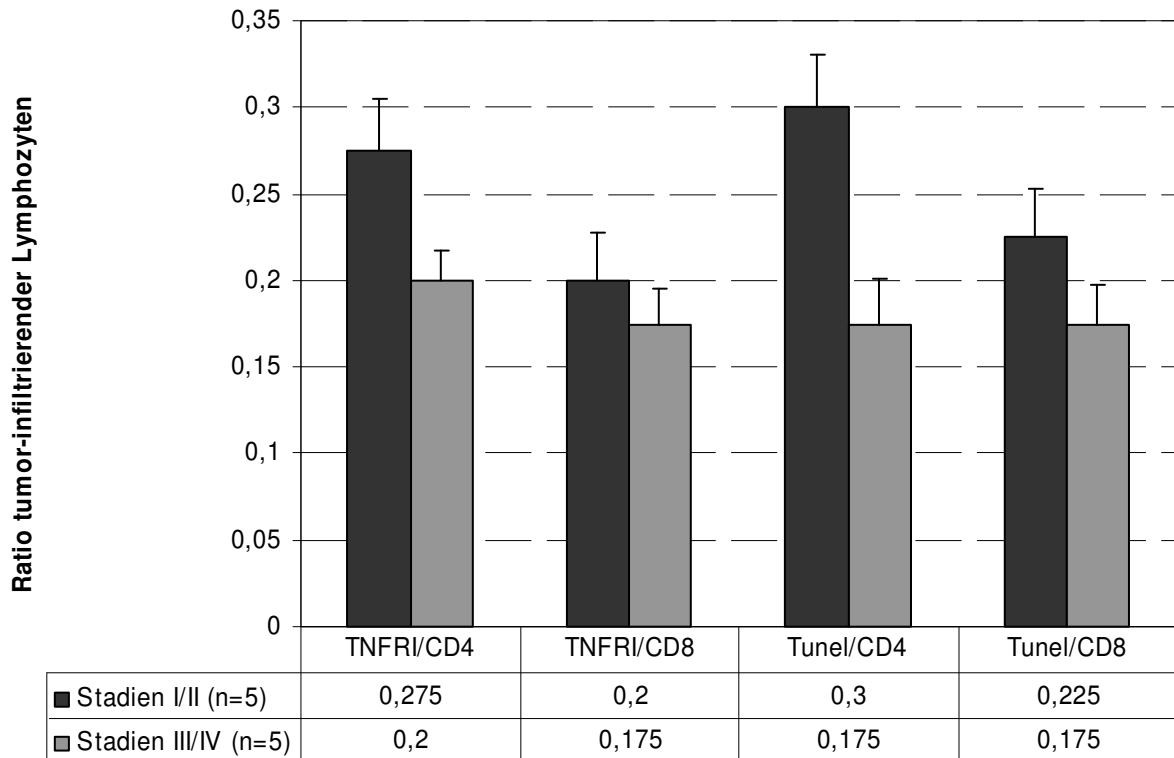


**Abbildung 3.44. Anteil von tumor- bzw. gewebe-infiltrierenden CD8 positiven Zellpopulationen.** Alle dieser Zellpopulationen weisen einen Anstieg der Zellanzahl im Tumorgewebe im Vergleich zu gesunder Niere auf. Stadienabhängig ging die Zellzahl dieser Population bei der Entwicklung des Tumors zurück.

### **3.2.1.5. Analyse apoptotischer tumor-infiltrierender Lymphozyten**

Als weiteres wurden CD4+ und CD8+ T-Zellen im Tumorgewebe auf Zeichen der Apoptose und Expression des TNFR I auf ihrer Zelloberfläche untersucht. CD4+ T-Zellen wiesen in beiden Färbungen einen grösseren Anteil an TUNEL- und TNFR I positiver Zellen verglichen mit der CD8+ T-Zellpopulation auf. Der Anteil an TNFR I exprimierenden Zellen in beiden T-Zellpopulationen zeigte einen stadienabhängigen Charakter. T-Lymphozyten in Tumoren früher Stadien zeigten eine höhere Rate an TNFR I positiven Zellen ( $27,5\pm 3\%$  für CD4+ und  $20\pm 2,8\%$  für CD8+ T-Zellen) als die in fortgeschrittenen Stadien ( $20\pm 1,7\%$  für CD4+ T-Zellen und  $17,1\pm 2\%$  für CD8+ T-Zellen). Keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl TNFR I positiver TILs wurden in Tumoren später Stadien festgestellt. Der TUNEL Assay wies dieselbe stadienabhängige Reduktion der Anzahl an positiven T-Zellen bei Tumorprogression auf. CD4+ Zellen zeigten eine wesentlich höhere Anzahl an TUNEL positiven Zellen ( $30\pm 3\%$ ) als die CD8+ Zellen ( $22,5\pm 2,8\%$  bei Patienten früher Stadien) (Abbildung 3.45.).

Eine höhere Anzahl tumor-infiltrierender Lymphozyten wies eine apoptotische TUNEL Färbung verglichen mit einer TNFR I Färbung in Tumoren früher Stadien auf. Dagegen zeigten TILs im Tumorgewebe später Stadien keine signifikanten Unterschiede in beiden Färbungen.



**Abbildung 3.45. Anteil TNFR I- und TUNEL- positiver TILs.** Der Anteil an TNFR I exprimierenden Zellen in beiden T-Zellpopulationen zeigte einen stadienabhängigen Charakter. T-Lymphozyten in Tumoren früher Stadien zeigten eine höhere Rate an TNFR I positiven Zellen ( $27,5\pm 3\%$  für CD4+ und  $20\pm 2,8\%$  für CD8+ T-Zellen) als die in fortgeschrittenen Stadien ( $20\pm 1,7\%$  für CD4+ T-Zellen und  $17,1\pm 2\%$  für CD8+ T-Zellen). Keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl TNFR I positiver TILs wurden in Tumoren später Stadien festgestellt. Der TUNEL Assay wies dieselbe stadienabhängige Reduktion der Anzahl an positiven T-Zellen bei Tumorprogression auf. CD4+ Zellen zeigten eine wesentlich höhere Anzahl an TUNEL positiven Zellen ( $30\pm 3\%$ ) als die CD8+ Zellen ( $22,5\pm 2,8\%$  bei Patienten früher Stadien).

### 3.2.1.6. Immunhistochemische Analyse p33ING1b und p29ING4 exprimierender Lymphozyten

Als weiteres wurden CD4+ und CD8+ tumor-infiltrierende T-Zellen auf die Anwesenheit von p33ING1b und p29ING4 Antigenen auf ihrer Zelloberfläche untersucht.

Im Nierennormalgewebe fanden sich 2,5% der CD4+ und CD8+ Zellen positiv für beide ING Proteine. Während der Entwicklung des Tumors stieg die Anzahl dieser Zellen signifikant an und sankte teilweise wieder während der weiteren Tumorprogression. Der Anteil p33ING1b und p29ING4 positiver CD4 Zellen überwiegt mit  $28,8 \pm 2,2\%$  bzw.  $27,5 \pm 2,5\%$  deutlich von einem unbedeutenden Anteil entsprechender CD8+ T-Zellen (Abbildungen 3.46, 6.1.11. und 6.1.12.).

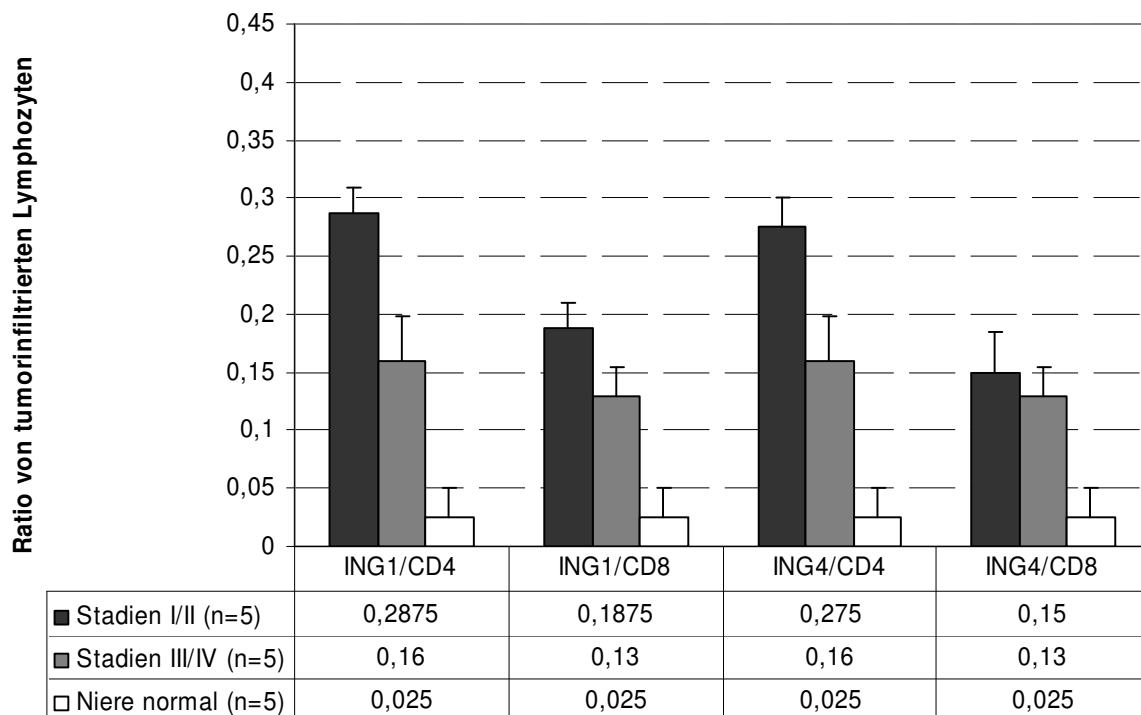


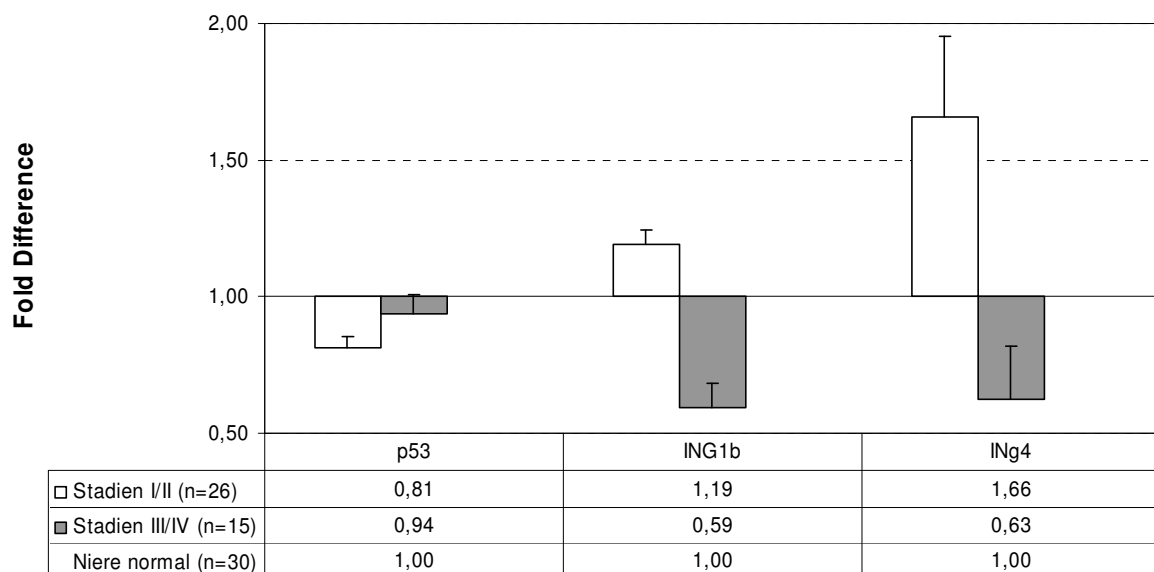
Abbildung 3.46. Ratio von p33ING1b und p29ING4 positiven CD4+ bzw. CD8+ tumor-infiltrierenden Lymphozyten steigt im Tumorgewebe von Tumorpatienten stadienabhängig an.

### 3.2.2. Untersuchung der p53, p33ING1b und p29ING4 Expression im Tumorgewebe

#### 3.2.2.1. Real time PCR Analyse der p53, ING1b und ING4 Genexpression

Bei der Berechnung der Real-Time PCR Ergebnisse wurden die Daten von drei unabhängigen Probeläufen sowie Doppelansätzen berücksichtigt. Für die graphische Darstellung wurde die Genexpression im Tumor anhand solcher im Normalgewebe normalisiert. Die Daten für normales Gewebe wurden später abgezogen und sind in den Graphiken nicht dargestellt. Für die Bestimmung des relativen p53, ING1b und ING4 Genexpressionsniveaus im Tumorgewebe der Tumorpatienten wurden Gewebeproben von 41 Patienten verschiedener Stadien nach der Robson Klassifikation untersucht.

Die Genexpression dieser Proteine wurde stadienabhängig reguliert. Das p53-Gen wurde im Tumor herabreguliert. Beide ING1b- und ING4-Gene wurden dagegen in frühen Tumorstadien hochreguliert. Die Genexpression von ING4 erreichte dabei viel höhere Werte als die des ING1b. Die Expression der beiden Gene im Tumorgewebe fortgeschrittener Karzinomen zeigten eine Herrunterregulation (Abbildung 3.47.).



**Abbildung 3.47. p53, ING1b und ING4 Genexpressionsanalyse.** Die Genexpression dieser Proteine wurde stadienabhängig reguliert. Das p53-Gen wurde im Tumor herabreguliert. Beide ING1- und ING4-Gene wurden dagegen in frühen Tumorstadien hochreguliert. Die Genexpression von ING4 erreichte dabei viel höhere Werte als die des ING1.

Nicht alle Tumore wiesen eine eindeutige stadienabhängige Tendenz für ING1b und ING4 Expression auf. In frühen Stadien zeigten 41% der Patienten eine signifikante Überexpression von ING1b und 31% der Patienten eine signifikante Überexpression von ING4 (Abbildung 3.49.); in späten Stadien waren es 40% und entsprechend 33% (Abbildung 3.50.).



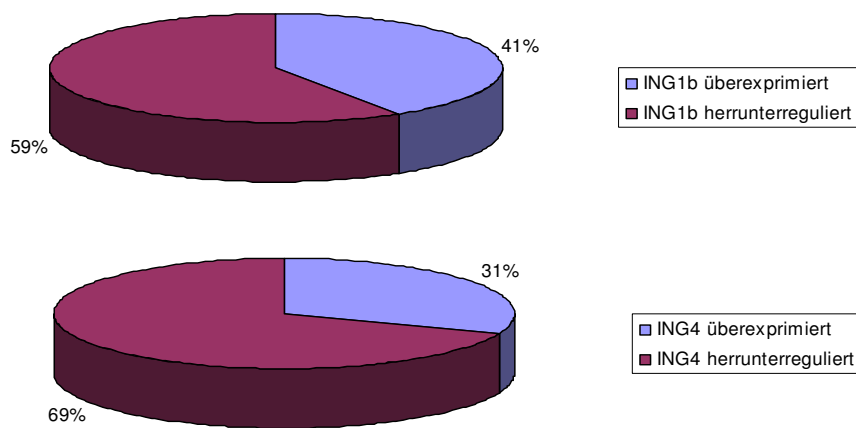


Abbildung 3.49. Prozentuelle Anzahl von Tumorpatienten frühen Stadien mit verschiedener p33ING1b und p29ING4 Expressionshöhe.

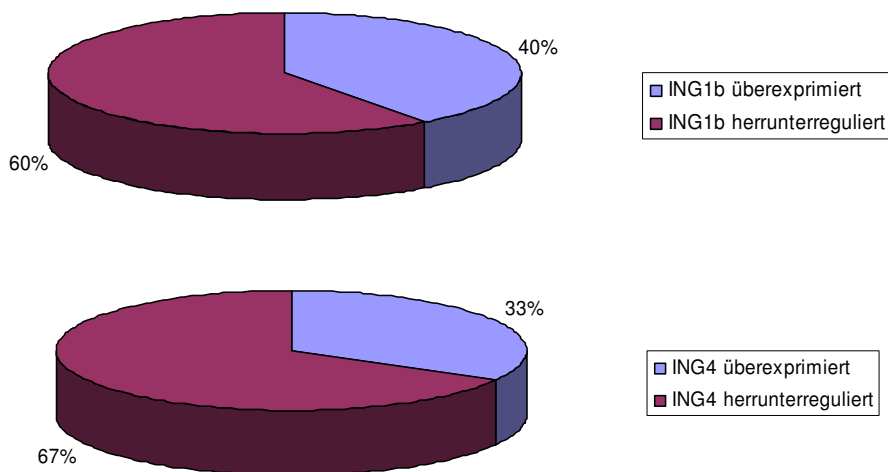


Abbildung 3.50. Prozentuelle Anzahl von Tumorpatienten späten Stadien mit verschiedener p33ING1b und p29ING4 Expressionshöhe.

### 3.2.2.2. Immunhistologische Analyse der p53, p33ING1b und p29ING4

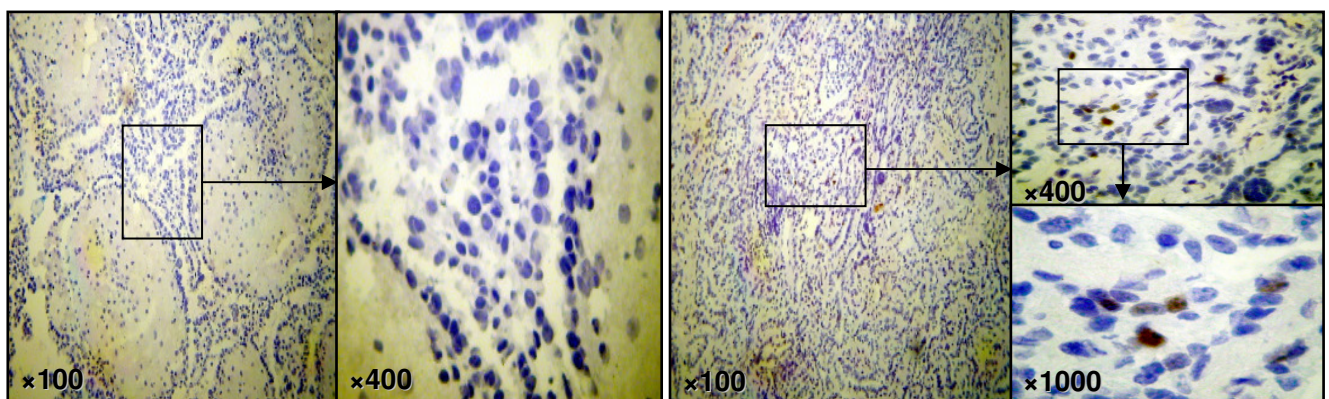
Immunhistologische Schnitte von neun Tumorpatienten (n=5 Stadien I/II und n=4 Stadien III/IV) wurden semiquantitativ analysiert. In höheren Tumorstadien fand sich eine Anreicherung von p53, p33ING1b und p29ING4 Proteinen. p53 wurde in frühen und fortgeschrittenen Stadien der Krankheit in  $5 \pm 1,5\%$  und entsprechend  $15 \pm 3,6\%$  der Tumorzellen detektiert, nicht aber im Normalgewebe oder. Dagegen wurden beide ING Proteine verglichen mit Normalgewebe verstärkt im Tumorgewebe nachgewiesen. Die Anzahl p33ING1b positiver Tumorzellen betrug in frühen

## ERGEBNISSE

Stadien  $13,2 \pm 2,7\%$  und in späten Stadien  $22,2 \pm 5,1\%$ , wobei die Anzahl p29ING4 positiver Tumorzellen entsprechend  $21 \pm 4\%$  und  $38,4 \pm 7,3\%$  war.

**Tabelle 3.2. Semiquantitative immunhistologische Analyse des Nierengewebes von Tumorpatienten auf p53, p33ING1b und p29ING4 Proteinexpression**

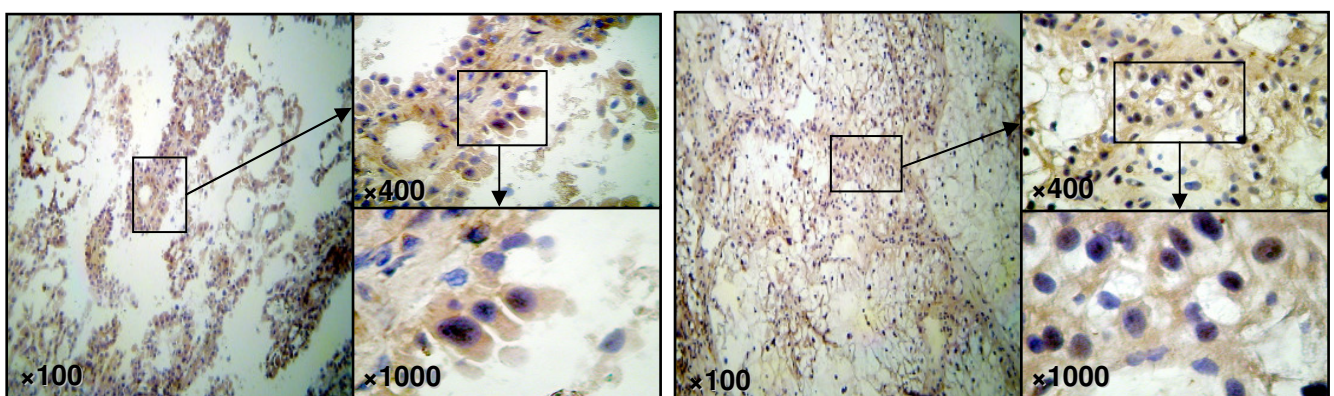
	Normale Niere (%)	Stadien I/II (%)	Stadien III/IV (%)
p53	- (0)	+ ( $5 \pm 1,5$ )	+ ( $15 \pm 3,6$ )
p33ING1	+ ( $5 \pm 1$ )	+ ( $13,2 \pm 2,7$ )	++ ( $22,2 \pm 5,1$ )
p29ING4	+ ( $5 \pm 1,4$ )	++ ( $21 \pm 4$ )	+++ ( $38,4 \pm 7,3$ )



A

B

**Abbildung 3.51. p53 immunhistologische Färbung bei einem Tumorpatienten im Stadium I (A) und Stadium III (B).** Einige der Tumorpatienten in hohen Tumorstadien wiesen eine Anreicherung des p53 Proteins auf.

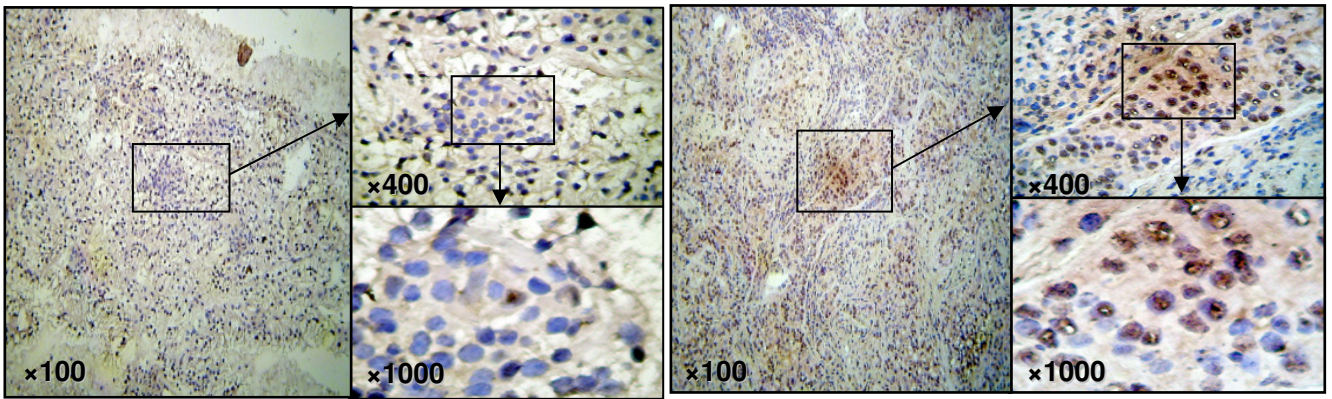


A

B

**Abbildung 3.52. p33ING1b immunhistologische Färbung bei einem Tumorpatienten im Stadium I (A) und Stadium III (B).** Einige der Tumorpatienten in hohen Tumorstadien wiesen eine Anreicherung des p33ING1 Proteins auf.

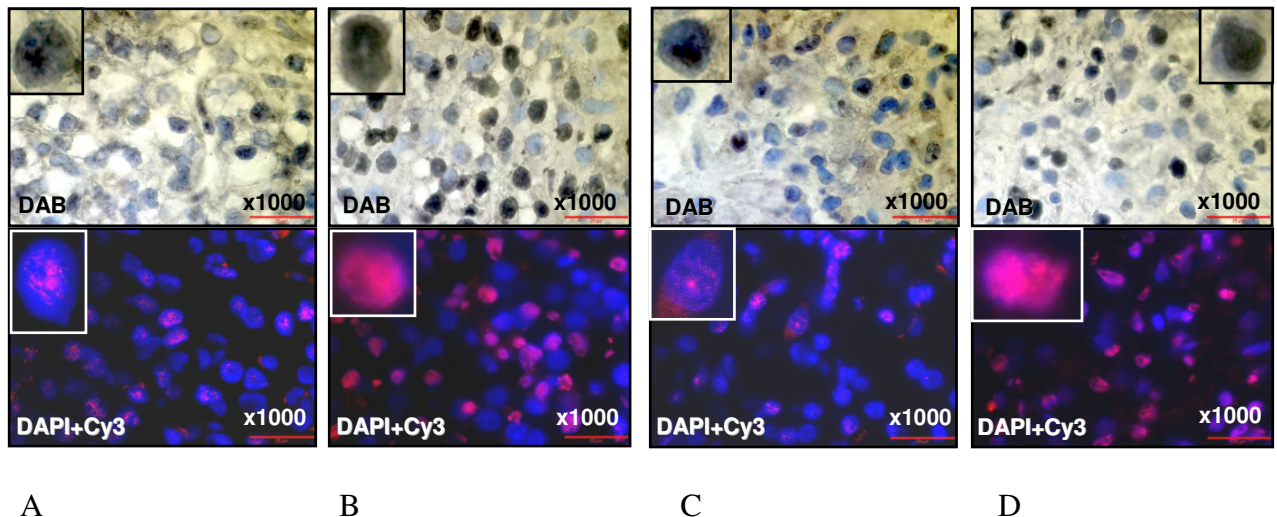




**A** **B**  
**Abbildung 3.53. p29ING4 immunhistologische Färbung bei einem Tumorpatienten im Stadium I (A) und Stadium III (B).** Einige der Tumorpatienten in hohen Tumorstadien wiesen eine Anreicherung des p29ING4 Proteins auf.

Dabei zeigte sich für beide ING Proteinen sowohl ein zytoplasmatisches als auch ein nukleäres Expressionsmuster, wobei in Karzinomen der Stadien I/II ein nukleäres Färbemuster dominierte und in Patienten vorgeschrittener Stadien sich auch zytoplasmatisches p33ING1b und p29ING4 Protein zunehmend zeigte.

Die Immunfluoreszenz und immunhistologische Färbung des p29ING4 Proteins waren wesentlich intensiver als p33ING1 im Tumorgewebe aller Stadien.

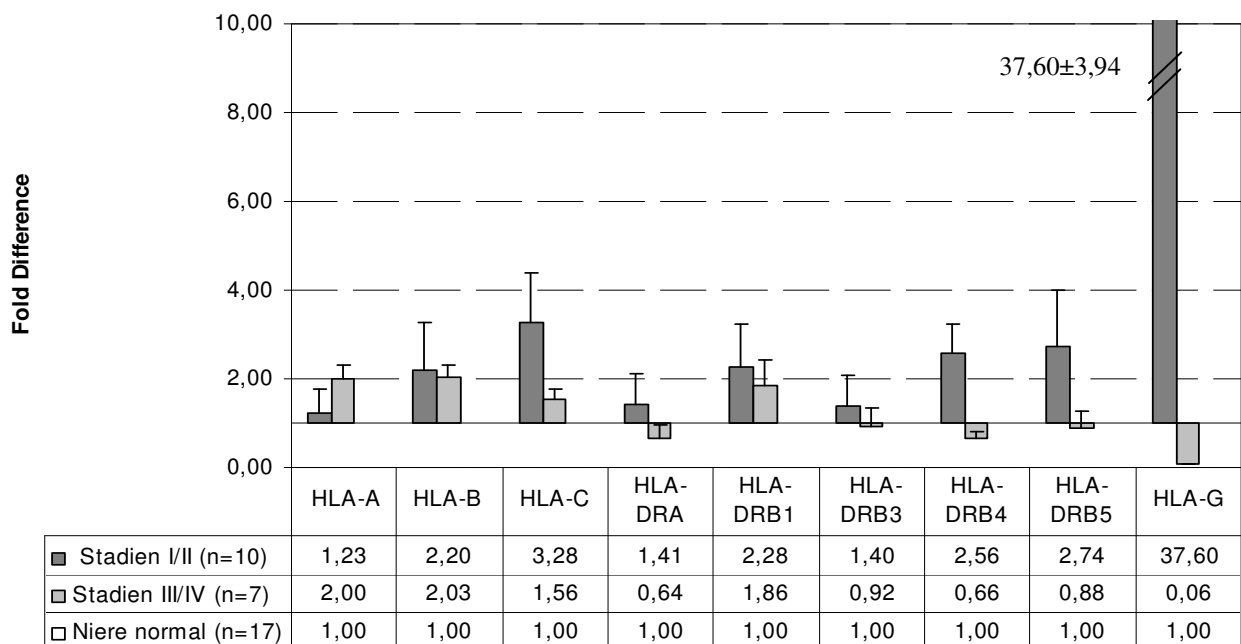


**A** **B** **C** **D**  
**Abbildung 3.54. Immunfluoreszenz und immunhistologische Färbung des p33ING1b Proteins im Tumorgewebe eines Tumorpatienten Stadium I (A) und III (C); Immunfluoreszenz und immunhistologische Färbung des p29ING4 Proteins im Tumorgewebe eines Tumorpatienten Stadium I (B) und III (D).** Die Immunfluoreszenz und immunhistologische Färbung des p29ING4 Proteins waren wesentlich intensiver als p33ING1 im Tumorgewebe aller Stadien. Dabei zeigte sich für beide ING Proteinen sowohl ein zytoplasmatisches als auch ein nukleäres Expressionsmuster, wobei in Karzinomen der Stadien I/II ein nukleäres Färbemuster dominierte und in Patienten vorgeschrittener Stadien sich auch zytoplasmatisches p33ING1b und p29ING4 Protein zunehmend zeigte.

### 3.2.3. Untersuchung der MHC Expression

#### 3.2.3.1. Real Time PCR Analyse der MHC Expression im Tumorgewebe

Tumorgewebe von 39 Patienten mit einem Nierenzellkarzinom (n=10 Stadien I/II und n=7 Stadien III/IV) wurde mittels Real Time PCR auf dessen Expression an HLA Klasse I (HLA-A, -B, -C, -G) und Klasse II Molekülen (HLA-DRB1, -B3, -B4, -B5) untersucht. In dieser Tumorart konnten Heterogenität und starke Abweichungen der HLA Expression nachgewiesen werden. Für HLA Klasse I und II Moleküle wies die Tumorgewebe von Patienten früher Stadien eine Überexpression auf (für HLA-A und HLA-B bei n=7/10 (70% der Patienten), HLA-C bei n=5/10 (50%) und HLA-G bei n=10/10 (100%) und HLA Klasse II (HLA-DRA und HLA-DRB3 bei n=5/10 (50% der Patienten); HLA-DRB1, -B4, -B5 bei n=7/10 (70%). Im Gegensatz zu den frühen Stadien zeigte sich für HLA Klasse I und II Moleküle in fortgeschrittenen Tumoren eine Herabregulation. Bei manchen Patienten waren HLA-A (31,6% der Patienten) und HLA-DRA (25% der Patienten), HLA-DRB3 (75% der Patienten), HLA-DRB4 (100% der Patienten) und HLA-DRB5 (50% der Patienten) in fortgeschrittenen Stadien bis auf Werte unter denen in normaler Niere herabreguliert. Eine Ausnahme stellte HLA-A Expression in fortgeschrittenen Tumoren dar, die herabreguliert war bei n=5/7 (71,4% der Patienten). HLA-G zeigte deutlich signifikante Überexpression in 100% aller Tumoren der Stadien I/II und in 75% aller fortgeschrittenen Tumoren (Abbildung 3.55.).



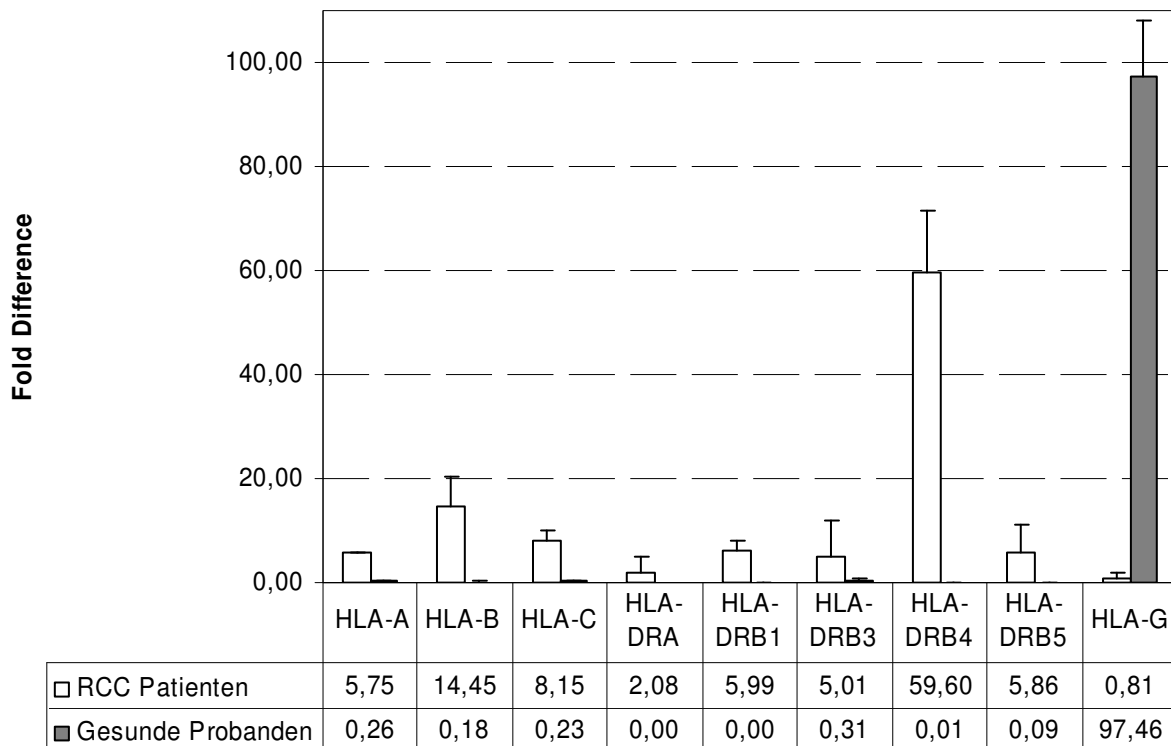
**Abbildung 3.55. Real Time PCR Analyse der Genexpression von HLA Molekülen in Tumorgewebe und normaler Niere der Tumorpationen.** Im Vergleich zu frühen Stadien zeigten HLA Moleküle beider Klassen in fortgeschrittenen Tumoren eine Herabregulation.

Die immunhistologische Untersuchung der Expression von MHC Klasse I Molekülen in 10 Tumorpatienten und 5 gesunden Probanden hat folgendes ergeben: in normalem Nierengewebe wird MHC Klasse I Antigen, nicht aber MHC Klasse II exprimiert; im Tumorgewebe früher Stadien steigt die Expression signifikant an und schwächt sich in späten Stadien wieder ab. Eine Überexpression und dieselbe stadienabhängige rückläufige Tendenz findet sich für die MHC Klasse II Antigen Expression im Tumorgewebe.

### 3.2.3.2. Real Time PCR Analyse der MHC Expression auf peripheren Blutlymphozyten

Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut von Tumorpatienten (n=7) und gesunden Probanden (n=7) wurden mittels Real Time PCR auf die Expression der HLA Molekülen untersucht.

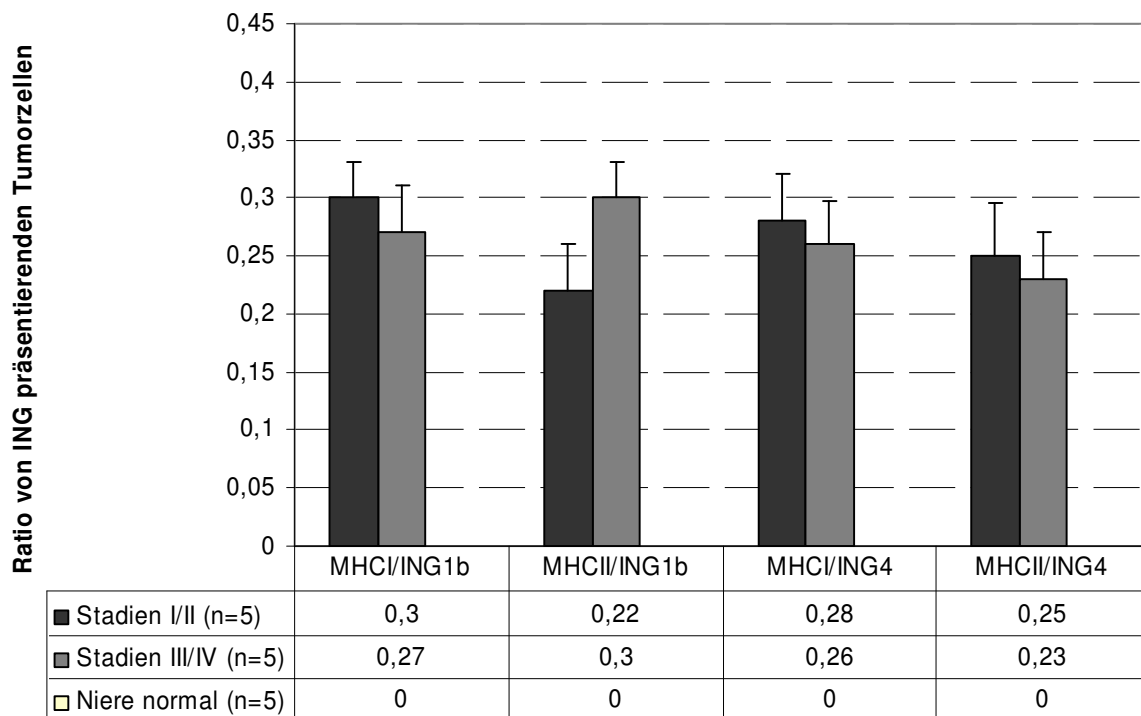
Unterschiedliche Klasse I und II HLA-Moleküle wiesen eine erhöhte Expression in peripheren Blutlymphozyten von Tumorpatienten verglichen mit gesunden Probanden auf. Eine Ausnahme stellte HLA-G dar. Die Tumorentwicklung beeinflusste die Absenkung von HLA-G Expression um das 120,3-Fache verglichen mit gesunden Probanden (Abbildung 3.56.).



**Abbildung 3.56. Real Time PCR Analyse der Genexpression von HLA Molekülen auf mononukleären Zellen aus peripherem Blut von Tumorpatienten und gesunden Probanden.** Unterschiedliche Klasse I und II HLA-Moleküle (ausgenommen HLA-G) wiesen eine erhöhte Expression in peripheren Blutlymphozyten von Tumorpatienten verglichen mit gesunden Probanden auf.

### 3.2.4. Untersuchung der Präsentation der p33ING1b und p29ING4 Proteine über MHC Moleküle der Klasse I und II im Tumorgewebe

Die immunhistologische Untersuchung von p33ING1b und p29ING4 im Tumorgewebe hat ergeben, dass die Präsentation beider ING Proteinen über die beiden Komplexe MHC Klasse I und II möglich war. Hohe Anzahl an Tumorzellen aus Patienten früher Stadien zeigten eine Präsentation der ING Proteine über MHC I ( $30\pm 3,2\%$  für p33ING1b und  $28\pm 4\%$  für p29ING4) (Abbildungen 6.1.13 und 6.1.14.). Die Anzahl an Zellen, die p29ING4 über MHC II präsentieren war nur unbedeutend geringer ausgeprägt. Eine rückläufige Tendenz beim weiteren Tumorwachstum ist für alle drei Fälle charakteristisch. Die p33ING1b Präsentation über MHC II stieg dagegen stadienabhängig von  $22\pm 4,1\%$  in Stadien I/II des NZK bis auf  $30\pm 3,2\%$  in Stadien III/IV (Abbildungen 3.57, 6.1.15 und 6.1.16.). In der normalen Niere konnte keine solche Präsentation nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.57.** Die Präsentation der p33ING1b und p29ING4 Proteinen findet im Tumor über MHC Moleküle Klasse I und II statt. In der normalen Niere dagegen konnte keine solche Präsentation nachgewiesen werden.

Bei der Berechnung der Korrelationskoeffizienten nach Pearson stellte sich heraus, dass es sowohl für HLA-A und beide ING Gene als auch für HLA-B, -C und p29ING4 eine signifikante Korrelation besteht.

**Tabelle 3.3. Korrelation nach Pearson zwischen ING1b bzw. ING4 und HLA-A, B, -C und DRB1 Genexpression**

		<b>ING1b</b>	<b>ING4</b>
<b>HLA-A</b>	Korrelation	0,369	0,779
	Signifikanz (2-seitig)	<b>0,034</b>	<b>0,000</b>
	n	39	39
<b>HLA-B</b>	Korrelation		0,421
	Signifikanz (2-seitig)		<b>0,015</b>
	n		39
<b>HLA-C</b>	Korrelation		0,475
	Signifikanz (2-seitig)		<b>0,006</b>
	n		39