

## 4. Diskussion

### 4.1. Immuntherapie von Tumoren

Immunologische Therapieansätze stellen bei der Behandlung von Tumoren ein attraktives Konzept dar, vor allem wegen der Möglichkeit eines selektiven Angriffs auf Tumorzellen. Neue Erkenntnisse in der Tumormunologie ermöglichen heute die Entwicklung erfolgreicher Therapiestrategien. Die Konzepte der adoptiven Immuntherapie beinhalten den adoptiven Transfer von *in vitro* aktivierten zytotoxischen Killerzellen (LAK-Zellen) oder tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs), welche zum Teil zusätzlich mit Immunstimulantien wie z.B. IL-2 kombiniert werden (228). Der Vorteil dieses Ansatzes liegt in der *ex vivo* Aktivierung der Effektorzellen, wodurch eine bei Tumorpatienten häufig vorhandene Immunsuppression umgangen werden kann. Die Aufwendigkeit dieses Verfahrens und seine Individualisierung für jeden Krebspatienten sind jedoch nachteilig. Daneben existieren unspezifische Ansätze mit Immunstimulantien wie Bacillus-Calmette-Guérin (BCG) oder mittels systemischer Zytokintherapie, bei der physiologisch vorkommende Zytokine wie IL-2, IFN- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  bereits mit klinischem Erfolg (9, 113, 114, 131) sowie IL-4, IL-12 oder M-CSF (8, 144, 268) mit bislang keiner oder nur geringer Wirksamkeit als Therapeutika eingesetzt werden.

Eine weitere Therapiestrategie stellt die aktive spezifische Immuntherapie mittels Vakzinierung dar, die darauf abzielt, eine spezifische Immunantwort gegen Tumorzellen zu induzieren. Zunächst wurden Tumorzellen bzw. Zelllysate als Vakzine eingesetzt (228, 258). Die Charakterisierung tumor-assoziiertes Antigene (TAA) seit Anfang der 90er Jahre war die Voraussetzung für die Entwicklung von definierten Antigenvakzinen unter Verwendung von Peptiden bzw. Proteinen. Da Peptide relativ einfach für den klinischen Einsatz herzustellen sind, könnten Peptid-Vakzine einen wirksamen und einfach auszuführenden immuntherapeutischen Ansatz zur Bekämpfung von Tumoren darstellen.

### 4.2. Immunogenität des Nierenzellkarzinoms

#### 4.2.1. Zytokinspiegel im Serum von Patienten mit einem Nierenzellkarzinom

Die Analyse des immunologischen Status der Patienten bei der Entwicklung und Progression eines NZKs erfolgte anhand der Messung von Zytokinen im Serum, welches aus präoperativ entnommenem Blut der Patienten verschiedener Stadien gewonnen wurde.

Zytokine dienen bei der immunologischen Abwehr eines Tumors als Regulatoren der Interaktionen mit dem Organismus. Yoshida et al zeigte beispielsweise im peripheren Blut von Patienten mit einem NZK, dass der Anteil an IL-2-, IFN- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$  exprimierender CD4+ T-Zellen (Th1-Typ) und IL-4-, IL-5- und IL-10 exprimierender CD4+ T-Zellen (Th2-Typ) deutlich höher war als bei gesunden Probanden. Dabei zeigten IFN- $\gamma$  und IL-4 eine signifikante Korrelation der Expression bei gesunden Probanden aber keine Korrelation bei Patienten mit einem NZK (272).

In eigenem Patientenkollektiv wiesen Patienten mit einem NZK im Vergleich zu gesunden Probanden eine erhöhte Serumkonzentration von IL-2, IL-2R, IL-4, -5, -6, -10, -13, IFN- $\gamma$ , und TNF- $\alpha$  auf. Eine deutlich geringere Konzentration fand sich für IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  bei Progression der Krankheit von frühen zu späten Stadien. Für IL-2R, IL-6, IL-10 und TNF- $\alpha$  war die Konzentration im Serum fortgeschrittener Patienten niedriger als bei gesunden Probanden. Die Daten deuten auf einen aktivierten Immunstatus während der frühen Stadien der Tumorentwicklung hin, der wesentlich durch Anstieg von IL-2 und IL-2R charakterisiert ist. Ein deutlicher Anstieg in der Expression von IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  im Serum der eigenen Patienten, wie auch Yoshida et al. gesehen, deutet in erster Linie auf eine Aktivierung von Th1- und zytotoxischen Tc1 Zellen hin. Im Gegensatz dazu war die Expression von Th2 Zytokinen wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 nur geringfügig verändert. Die erhöhte Expression von IL-10 könnte auf einen Anstieg von Th3/Treg suppressor-Zellen hinweisen, die möglicherweise die Funktion von Effektorzellen (zytotoxische, Th und NK Zellen) inhibieren.

In den eigenen Untersuchungen fand sich IFN- $\alpha$  im Serum sämtlicher Tumorpatienten im Vergleich zu gesunden Probanden in geringerer Ausprägung. Als Funktion von IFN- $\alpha$  sind die Induktion von MHC Klasse I Antigenen, die Aktivierung von NK-Zellen und

zytotoxischen T-Zellen und die antivirale Aktivität zu nennen (178). Als therapeutischer Ansatz beim metastasierten NZK wirkt IFN- $\alpha$  positiv auf die IL-2 Produktion und IL-2R Expression durch Lymphozyten und infolgedessen auf deren Proliferation (249). Die eigene Ergebnisse aus Patienten früher und fortgeschrittener Stadien weisen auf die Rolle von IFN- $\alpha$  bei Stimulation der Immunantwort hin.

TNF- $\alpha$  und IL-6 sind Zytokine mit überlappender biologischer Funktion. Sie bewirken ein kompliziertes Netzwerk interaktiver Signale (129). TNF- $\alpha$  wird von Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, T-Zellen und NK-Zellen sezerniert und hat eine Vielzahl biologischer Effekte (16). Als nekrotisierender Faktor für bestimmte Tumoren beschrieben erhöht TNF- $\alpha$  die Phagozytose und Zytotoxizität von Granulozyten und beeinflusst die Produktion von IL-1 und IL-6. Zusammen mit IL-2 erhöht TNF- $\alpha$  die Proliferation von T-Zellen. Miki et al haben gezeigt, dass frisch isoliertes Nierentumorgewebe IL-6 mRNA exprimiert und IL-6 aktiv sezerniert und dass IL-6-Antiserum spezifisch das Tumorwachstum *in vitro* inhibiert (157). Eine andere Arbeit demonstrierte, dass primäre NZK und NZK-Zelllinien IL-6 und IL-6 Rezeptor mRNA exprimieren. Die Tumorpatienten mit erhöhter IL-6 Expression wiesen eine signifikant höhere Inzidenz von Metastasen auf als die Patienten ohne IL-6 Expression (232). Daher vermuteten die Autoren, dass IL-6 die Rolle eines autokrinen Wachstumsfaktors für Tumorzellen hat. Blay et al. detektierten IL-6 im Serum von 48% der Patienten mit einem NZK (15). Ferner wurde gezeigt, dass Tumorzellen eines NZK TNF- $\alpha$  exprimieren (79). Im Gegensatz dazu berichtete Waase et al, dass Monozyten und Makrophagen TNF- $\alpha$  exprimieren, nicht jedoch Tumorzellen (264).

In dieser Arbeit zeigten Patienten mit einem NZK früher Stadien im Luminex eine hohe TNF- $\alpha$  und IL-6 Konzentration im Serum. Wegen der Vielzahl von Zellen, die in der Lage sind, TNF- $\alpha$  und IL-6 zu produzieren, kann deren Quelle nicht bestimmt werden. Zu vermuten ist aber, dass die gemessenen Werte mit der Anti-tumorantwort im Zusammenhang stehen. Bei Patienten später Stadien wurden geringere Konzentrationen an TNF- $\alpha$  und IL-6 als bei gesunden Probanden gefunden. Dies könnte als Ausdruck eines zunehmend ineffektiven Immunsystems in fortgeschrittenen Tumoren angesehen werden.

#### 4.2.2. Immunreaktivität peripherer Blutlymphozyten

In Patienten mit einem NZK wurde ein variierendes Aktivitätsmuster an peripheren CD3+ Blutlymphozyten gezeigt. Verschiedene dominierende Expressionsniveaus von IL-1, IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  wurden *in vitro* nachgewiesen (51). Während einige Autoren mRNA proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  aber nicht IL-2, -3, -4 und immunsuppressive Zytokine wie IL-10 berichteten (149, 169), demonstrierten andere IL-4 und -10 positive periphere Blutlymphozyten in diesen Patienten (51, 182). Ferner war im peripheren Blut der Patienten die Proportion CD8+ /TNF- $\alpha$  versus CD8+ /IFN- $\gamma$  bzw. CD4+ / IL-10 doppelt positiver T-Zellen höher als im Tumorgewebe (50).

Eigene Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen ergaben eine deutlich höhere Anzahl CD8+/CD28+ T-Zellen (typisch für CTLs) und CD56+ Zellen (NK) im peripheren Blut der Tumorpatienten verglichen mit gesunden Probanden. Eine besonders erhöhte Anzahl wurde für CD4+/CD25+ Zellen gesehen, unter denen T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften vermutet werden. Für alle drei Zellpopulationen zeigte sich bei Progression des Tumors ein Abfall in der Zellzahl. Mit Ausnahme IL-2-, IL-10- und IFN- $\gamma$ -positiver CD8+ T-Zellen, deren Anteil im peripheren Blut keinen signifikanten stadienabhängigen Unterschied aufwies, fand sich in fortgeschrittenen Tumorstadien eine deutliche Reduktion IL-2-, IL-10-, IFN- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$ -positiver T-Lymphozyten. Unter den CD4+ T-Zellen überwogen in frühen Tumorstadien IL-2- (36,3 $\pm$ 4,1%) und IL-10-positive Zellen (35 $\pm$ 5%) über IFN- $\gamma$ - (18,8 $\pm$ 5,5%) und TNF- $\alpha$ - (16,3 $\pm$ 6,5%) positiven Lymphozyten. Dieselbe Tendenz wurde für CD4+ T-Zellen der 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% an der Gesamtanzahl der CD4+ T-Zellen.

Die Verteilung der CD8+ T-Zellpopulation im peripheren Blut der Tumorpatienten zeigte ein entgegengesetztes Bild. 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 ( $5 \pm 1,5\%$ ). Beim Vergleich der untersuchten T-Zellpopulationen zeigte sich, dass die CD4+ Zellen während der Tumorentwicklung signifikant anstiegen, während die CD8+ Zellen in der Zahl leicht abfielen. Eine hohe Anzahl proliferierender CD4+ Zellen während der Tumorentwicklung korrelierte mit einer angestiegenen IL-10 Expression. Dies lässt T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften vermuten, die trotz erhöhter Anzahl an CTLs, NK- und Th1- Zellen die Tumorerstörung hemmen können.

### 4.2.3. Immunreaktivität in Tumorgewebe

Mit der Beobachtung einer zumeist deutlichen Infiltration von Lymphozyten in der Tumordinvasionsfront wurde zugleich auf eine aktivierte T-Zell vermittelte Tumormunreaktivität geschlossen. In der überwiegenden Mehrzahl handelte es sich um CD3+ T-Zellen (159). Tumordinfiltrierende Lymphozyten erkennen spezifisch Tumorzellen und werden durch diese aktiviert (21, 24, 61, 62, 207). Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist die Beobachtung, dass frisch aus Nierentumoren isolierte T-Zellen ihre zytotoxische Aktivität *in vitro* im Gegensatz zu naiven T-Zellen teilweise oder komplett verlieren. Dieses deutet auf eine unterdrückte Anti-Tumoreaktivität hin (256, 269). Die Unfähigkeit dieser T-Zellen eine effektive Anti-Tumorantwort *in vivo* zu generieren, könnte Folge eines Defektes in der durch CTL vermittelten Immunantwort sein. Es wurden dazu verschiedene Mechanismen vermutet, wie die Sekretion immunsupprimierender Zytokine durch Tumorzellen selber (230), die Expression von *Death Factor*-Molekülen wie Fas Ligand, die verminderte Expression von MHC und costimulatorischen Molekülen an der Oberfläche von Tumorzellen (106, 245) und die defekte Signaltransduktion in den T-Zellen selber (65).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verteilungsmuster verschiedener Lymphozytenpopulationen im peripheren Blut und im Tumorgewebe betroffener Patienten und deren Zytokinprofil stadienabhängig für das Nierenzellkarzinom untersucht. Analysiert wurde das Expressionsmuster des für seine apoptotische Wirkung bekannten Zytokins TNF- $\alpha$  zusammen mit seinen Rezeptoren TNFR I und II, die von peripheren T-Lymphozyten (PBL) sowie tumordinfiltrierenden T-Lymphozyten exprimiert werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es zu klären, wie ausgeprägt Tumorzellen und PBLs HLA Klasse I (HLA-A, -B, -C) und HLA Klasse II (HLA-DRA, -B1, -B3, -B4, -B5) sowie HLA-G Moleküle stadienabhängig exprimieren.

#### 4.2.3.1. Immunreaktivität tumor-infiltrierender Lymphozyten

Häufig wird das Nierenzellkarzinom von einer großen Anzahl mononukleärer Zellen einschließlich T-Zellen infiltriert (60, 161, 269). Bei zahlreichen Tumorentitäten konnten TILs aus dem Tumorgewebe isoliert und *in vitro* unter Zugabe von IL-2 expandiert werden. Ein Grossteil dieser vornehmlich CD3+CD8+ T-Zellen besaß gegenüber autologen und zum Teil auch gegenüber allogenen, in bestimmten HLA-Allelen übereinstimmenden Tumorzellen *in vitro* lytische Eigenschaften (94, 244). Auch wenn die Rolle der HLA-A2 Präsentation für die Erkennung eines Tumorantigen durch lytische CTLs für NZK aufgezeigt wurde, konnten doch nur einige allogene NZKs so lysiert werden (45, 207). Obwohl *in vitro* zytotoxische T-Zellen generiert werden können, die autologe humane Tumorzellen erkennen und lysieren, wurden nur bei einer kleinen Anzahl von Patienten mit einem NZK tumorspezifische CTLs nachgewiesen (24).

CD4+ T Helferzellen (Th) unterteilen sich in Abhängigkeit derer Zytokinprofilen in Th1 (IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) und Th2 (IL-4, -5, -6, -10 und -13) Typen. Daneben existieren auch immunsuppressive Th3 Zellen mit der Sekretion von TGF- $\beta$ , IL-4 und IL-10 und Treg (Tr1) Zellen, die auch TGF- $\beta$  und IL-10 exprimieren (162, 199). Th2 Zellen fördern typischerweise eine humorale Immunantwort, wohingegen Th3/Treg Zellen durch ihre immunsuppressiven Zytokine (IL-10 und TGF- $\beta$ ) sowohl die Th1- als auch Th2 Immunantwort abschwächen können (1, 27, 38, 135). Die T-Zellantwort wird zu einem grossen Teil durch diese Zytokine bestimmt. Die Th1-Antwort führt zu einer Aktivierung von Makrophagen und Hypersensitivitätsreaktionen vom verzögerten Typ und spielt eine wichtige Rolle bei der Abwehr intrazellulärer Pathogene. Die Th2-Antwort dagegen führt zu einer hohen Antikörperproduktion, wodurch sie zur Abwehr extrazellulärer Pathogene beiträgt. Darüber hinaus wurde die Zytokinproduktion durch Th2-Zellen in Verbindung mit der Immunsuppression gebracht und kann eine Th1-Immunantwort unterdrücken (199). Das Zytokin IL-10 der Th2/Th3/Treg Zellen unterdrückt die Antigenpräsentation durch Herunterregulierung der MHC II Expression, wodurch die T-Zellproliferation vermindert wird (42). Es wurde aber auch berichtet, dass das Zytokin TGF- $\beta$  der Th3/Treg Zellen einen antiproliferativen Effekt auf Zellen des Immunsystems hat (112).

Die lokale Zytokinproduktion spielt eine wesentliche regulatorische Rolle bei der Aktivierung infiltrierender Lymphozyten und hat möglicherweise einen Einfluss auf die Entwicklung einer

wirksamen Reaktion gegen Tumore (13). Es wurde gezeigt, dass TILs in NZK größtenteils aus CD3<sup>+</sup> T-Zellen mit klarer Dominanz von CD8<sup>+</sup> über CD4<sup>+</sup> Lymphozyten bestehen. Es wurde ebenso eine auffällige Population CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen. Auch NK-Zellen waren mit über 25% in 75% der Tumorproben stark vertreten (256).

Verschiedene Studien haben das Verhältnis von Th1 zu Th2 Zellen bei Nierentumorpatienten untersucht. Obwohl in einem Fall über eine Dominanz der Th1-Zellen in Tumorgewebe berichtet wurde, wiesen die meisten Studien auf ein Th2 gerichtetes Zytokinprofil *in situ* (6, 49, 68, 80, 208, 266). In der Literatur finden sich nur wenige Studien über die Zytokin mRNA Expression in TILs. Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten hohe Expressionsraten an IL-4 und IL-10 mRNA in TILs auf (50, 149, 266). Eine gleichzeitig bestehende hohe Expressionsrate des Th2 typischen Zytokins IL-10 und des Th1 Zytokins IFN- $\gamma$  wurde in isolierten CD3<sup>+</sup> TILs festgestellt (48). In einem syngenem Mausmodell wurde dazu gezeigt, dass TILs, die *in vitro* mit Tumorzellen des ursprünglichen Tumors stimuliert wurden, relativ hohe Mengen an IFN- $\gamma$  ausschütteten (167, 168). Daher wäre bei einer hohen Expression von IFN- $\gamma$  mRNA in CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> TILs im Nierentumor auf eine tumorspezifische Aktivierung dieser Zellen *in vivo* zu schließen. Dennoch weist eine hohe IFN- $\gamma$  mRNA Expression in TILs nicht unbedingt darauf hin, dass dieses Zytokin auch tatsächlich synthetisiert und sezerniert wird, was als notwendig für die Anti-Tumorimmunantwort angesehen wird.

Der Nachweis einer Zytokinsynthese in Lymphozyten auf Proteinebene ergibt in der FACS-Analyse nur nach *in vitro* Stimulation reproduzierbare Messwerte, was sich in vielen Studien manifestierte (104, 185). Es wurden immundefiziente TILs in Tumorpatienten gefunden, im denen keine IL-2 oder TNF- $\alpha$  Expression nachweisbar war (247). Zusätzlich wurde gezeigt, dass TILs in NZK vornehmlich ein Th1-ähnliches Differenzierungsmuster mit ausgeprägter Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2 aufwiesen. Sie standen dabei unter dem Einfluss des herunterregulierenden Zytokins IL-6, das von Tumorzellen produziert und sezerniert wird, sowie IL-10 (6). Es wurde auch gezeigt, dass nach adoptiver Immuntherapie bei Mäusen CD4<sup>+</sup> Zellen drei- bis sechsmal mehr IL-2 mRNA und sechs bis acht mal mehr IL-6 mRNA exprimierten als CD8<sup>+</sup> Zellen. Gleichzeitig exprimierten CD8<sup>+</sup> TILs drei bis sechs mal mehr IL-2 Rezeptor mRNA und vier bis sechs mal mehr IFN- $\gamma$  mRNA als CD4<sup>+</sup> Zellen (53). Isolierte TILs wiesen nach *in vitro* Stimulation mit anti-CD3 Antikörper oder Mitogenen eine normale Fähigkeit zur Synthese von Zytokinen auf (6, 51). Zytotoxizitätsdaten aus frisch

isolierten CD8+ TILs legen aber auch den Schluss nahe, dass diese Zellen möglicherweise keine

Effektorfunktion *in vivo* ausfüllen. Zusätzlich weisen die nachgewiesenen niedrigen TNF- $\alpha$  mRNA Expressionswerte, die in CD8+ TILs gefunden wurden, darauf hin, dass möglicherweise eine Anergie dieser Zellen oder eine Subpopulation dieser TILs mit niedriger lytischer Kapazität existiert (256). Dieses stimmt mit der Tatsache überein, dass die Zusammensetzung der TILs vom Tumorstadium abhängt. Der Anteil der CD8+ Zellen korrelierte dabei positiv mit dem Tumorstadium und einer schlechteren Prognose (99, 121). Die Anergie der TILs wird möglicherweise entweder durch den Einfluss anderer immunregulatorischer Zytokine wie IL-10 und IL-6 in der Tumorumgebung oder infolge unvollständiger Stimulation durch Tumorzellen, denen costimulatorische Moleküle fehlen, herbeigeführt (30).

Da nur wenig über den immunologischen Aktivierungszustand von TILs in NZK bekannt ist, war es ein Ziel in der vorliegenden Arbeit CD4+ und CD8+ TILs anhand der Expression Th1 und Th2 typischer Zytokinmuster (IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ ) zu charakterisieren. Es wurden folgende Populationen im Tumor nachgewiesen: IL-2- und IFN- $\gamma$ -, IL-10- und TNF- $\alpha$  positive CD4 Zellen. Für diese Zellpopulationen zeigte sich ein stadienabhängiger Anstieg in der Zellzahl. Dabei ging im Vergleich früher und später Stadien die Gesamtzahl an CD4+ Zellen zurück. Die gesunde Niere wies die gleiche Anzahl jeder der CD4+ Zellpopulationen auf, während im Tumor diese Zellpopulationen in verschiedenen Massen auftraten. So stieg die Anzahl von Th2 und Treg 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 erreichen 35 $\pm$ 4,5% in frühen Stadien und 26 $\pm$ 4,9% in späten Stadien. Dagegen betrug die Reduktion für IFN- $\gamma$  positive CD4+ Zellen bei Progression des Tumors von frühen zu fortgeschrittenen Stadien nur 6% und für TNF- $\alpha$  positive CD4+ Zellen nur 3%. Der Anteil an IFN- $\gamma$  positiven CD4+ T-Zellen war signifikant niedriger in Tumorpatienten als der Anteil an IL-10 positiven CD4+ Zellen. Daher ist einen *Shift* einer Th1 zu einer Th2 Immunantwort während der Entwicklung eines Nierenzellkarzinoms zu vermuten.

CD8+ tumor-infiltrierende Lymphozyten lagen im Tumorgewebe aller Stadien und in der gesunden Niere in deutlich geringerer Anzahl als CD4+ T-Zellen vor. Immunhistologisch wurden IL-2-, IL-10-, IFN- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$  positive CD8+ Zellen gesehen. Diese Zellpopulationen fanden sich in frühen Stadien in erhöhter Zellzahl im Tumorgewebe im



Vergleich zum Normalgewebe. Stadienabhängig nahm die Zellzahl dieser Populationen bei Progression des Tumors ab. CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigten eine geringere Aktivierung für IL-2-, TNF- $\alpha$ -, IFN- $\gamma$ - und IL-10. Im Vergleich zu IL-10 positiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Tc2 Suppressorzellen) nahmen die IFN- $\gamma$  positive CD8<sup>+</sup> T-Zellen (zytotoxische Tc1) leicht zu. Im teilweisen Gegensatz dazu wurden in Lungen- und Ovarialkarzinomen aber auch Nierenzellkarzinom sowohl eine hohe IL-10 als auch IFN- $\gamma$  mRNA Expression in CD8<sup>+</sup> TILs von anderen Autoren festgestellt (7, 48, 193). Beim Vergleich der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> TILs wäre daher zu schlussfolgern, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowohl in der potentiellen Suppression der Immunantwort gegen den Tumor als auch in der Krebsabwehr einen größeren Beitrag leisten als CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Ebenso wurde festgestellt, dass die IFN- $\gamma$ - und IL-10 mRNA Expression in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> TILs vergleichbar hoch zu deren Expression in PBLs derselben Patienten war (48). Eine andere Studie zeigte, dass die IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  mRNA Expression in der Tumorumgebung und in PBLs beim NZK vergleichbar hoch war. Dahingegen wurde IL-10 nur im Tumor und IL-2 gar nicht gefunden (169). Die Expression sowohl proinflammatorisch (IL-2 und IFN- $\gamma$ ) als auch immunsuppressiv (IL-10) wirkender Zytokine wurde in TILs und PBLs beim NZK gesehen. Die IFN- $\gamma$  Expression war im Gegensatz zu IL-10 erhöht im Tumor als im normalen Nierenparenchym (183). Dabei wurden NK-Zellen in einem signifikant höheren Anteil in TILs als in PBLs gefunden (39).

Die eigene Experimente zeigen eine mäßig gesteigerte Infiltration sowohl IL-10 positiver CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen als auch IL-2 positiven CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrierender Zellen im Vergleich zu PBLs. Diese Daten könnten für eine ausgeprägte TILs Aktivierung im Vergleich zu PBLs sprechen. Möglicherweise wird aber durch ein verändertes Zellverhältnis zwischen T Helfer Zellen, zytotoxischen und NK-Zellen sowie regulatorischen T-Zellen, ein für Tumorwachstum vorteilhaftes Milieu geschaffen, dass eine effektive zytotoxische Immunantwort supprimiert.

### 4.2.3.2. Zytokinexpression in Tumorumgebung

Zusätzlich zur Zytokinproduktion durch T-Zellen werden Zytokine (besonders immunsuppressive Zytokine) möglicherweise auch durch andere immunkompetente Zellen, wie mononukleäre Makrophagen und Tumorzellen, produziert (230). Einige Autoren berichteten über hohe Expressionsraten von IL-10 mRNA in Biopsien von NZK (59, 169, 183). Dagegen berichtet eine andere Studie, dass aus NZK gewonnene Zelllinien negativ für IL-2, IL-10 und IFN- $\gamma$  waren, zeigten aber Positivität für TNF- $\alpha$  und IL-6 (149).

Die lokale Produktion von Zytokinen durch NZK beeinflusst möglicherweise die zytotoxische Wirksamkeit von TILs. Es ist daher zu vermuten, dass in NZK ein immunsuppressives Zytokinprofil gegenüber einem pro-inflammatorischen vorherrscht, was zu einer Immunsuppression der TILs beiträgt.

Eigene Analyse ergab eine erhöhte mRNA Expression von CD4, CD8, CD25, CTLA4, Foxp3, CD56, IFN- $\gamma$  und IL-10 in Tumorumgebung verglichen zu normalem Gewebe (ausgenommen Foxp3 und CD56 in den Stadien III/IV). Dabei wurde eine erniedrigte Anzahl an CD4+ Zellen bzw. Th Zellen und Treg Zellen sowie NK Zellen in fortgeschrittenen Stadien der Krankheit festgestellt. Dieselbe Tendenz konnte für die Produktion von IFN- $\gamma$  und IL-10 nachgewiesen werden. CD8+ Zellen waren dagegen in späten Stadien verstärkt nachweisbar und wies eine erhöhte Proliferation von zytotoxischen T-Zellen auf.

Bei der immunhistologischen Auswertung von 10 Tumorpatienten wurde der prozentuale Anteil von Tumorzellen und tumor-infiltrierende Lymphozyten mit Positivität für spezifische immunologische Marker 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. Im Vergleich mit frühen Stadien (Robson I/II) fand sich in späten Stadien (III/IV) eine deutlich verminderte Anzahl CD4+, CD8+, CD25+, CTLA4+, Foxp3+ und CD56+ Zellen zusammen mit einer abgeschwächten Expression an IFN- $\gamma$  und IL-10 im Tumor.

### **4.3. p33ING1b und p29ING4 Proteine als tumor-assoziierte Antigene des Nierenzellkarzinoms**

#### **4.3.1. Expression von p33ING1b und p29ING4 Proteinen im Nierenzellkarzinom**

Um Tumorstoffe zu entwickeln, ist es unabdingbar, geeignete Tumorstoffe zu kennen oder neu zu identifizieren. Geeignete Ziele für eine Tumorstoffung sind grundsätzlich überexprimierte Genprodukte. Solche Genprodukte können Onkogene sein, sowie mutierte Genprodukte, virale Gene und alle anderen Strukturen, welche von Tumorzellen im Vergleich zu normalem Gewebe im Übermaß exprimiert werden. Wesentlich ist das Expressionsmuster eines solchen Tumorstoffes, auf das die Immunprävention ausgerichtet werden soll. Das Tumorstoff sollte besonders früh im prämaligen Stadium exprimiert werden und hochspezifisch für kanzeröses oder prämaliges Gewebe sein. Dies ist notwendig, damit das gesuchte Tumorstoff keine Autoimmunität hervorrufen kann. Weiterhin ist es günstig, wenn das Tumorstoff einen zytolytischen Effekt hat. Dadurch kommt es zu einer entzündlichen Kaskade im Zielgewebe, was wiederum zur Folge hat, dass Zelldebris zusammen mit weiteren Tumorstoffen durch ortständige APCs präsentiert werden kann. Verschiedene Arbeiten zeigen in verschiedenen humanen Malignomen seltene Genveränderungen aber eine vorherrschende Herunterregulierung der ING1-Genexpression (34, 55, 175). Auf der Grundlage eines allgemeinen Verlusts der ING-Expression im Tumor bringen aktuelle Studien den Verlust der ING-Expression mit einer Tumorstoffung in Zusammenhang. Vieyra und Kollegen (260) zeigten im Rahmen einer semi-quantitativen RT-PCR Analyse von ING1 mRNA Expressionswerten in humanen Hirntumoren eine signifikant höhere Expression in pilocytischen Astrocytomen (WHO Grad I) und in diffusen Astrocytomen (WHO Grad II) als in anaplastischen Astrocytomen und Glioblastomen (WHO Grade III und IV), was auf eine Rolle der ING1-Herunterregulierung bei der Progression von Astrozytomen niedrigeren Grades zu höheren Malignitätsgraden hinweist (233).

Dieselbe Tendenz haben wir für die p33ING1b- und p29ING4-Expression in Nierenzellkarzinomgewebe nachgewiesen. Beide ING1- und ING4-Gene wurden in frühen Tumorstadien hochreguliert. Die Genexpression von ING4 erreichte dabei viel höhere Werte als die des ING1. Die Expression der beiden Gene im Tumorgewebe fortgeschrittener Karzinomen wiesen eine Herunterregulation auf. 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; in späteren Stadien waren es 40% und entsprechend 33%.

Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass bei einer Vielzahl humaner Neoplasien eine p53-Inaktivierung nachweisbar ist, die entweder direkt durch Genmutationen oder aber indirekt durch die Bindung an virale Proteine oder Alterationen interagierender Gene (z.B. verstärkte Expression von mdm-2) verursacht wird (88, 95, 191, 219, 262). Einigen Studien zufolge sind ING-Proteine daran beteiligt, verschiedene Zelltypen gegenüber der Apoptose auf eine Art und Weise zu sensibilisieren, die von p53-abhängig ist (72, 73, 90, 92). Zwei Hauptmechanismen erklären möglicherweise, wie ING-Proteine die p53-Antwort verstärken: die Assoziation von Mitgliedern der ING-Familie mit p53 und die ING-vermittelte Acetylierung von p53. p33ING1b assoziiert mit den p53 zugehörigen p63 $\alpha$  und p73 $\alpha$  Tumorsuppressoren (248). Dies deutet auf eine Interrelation und Interdependenz zwischen verschiedenen Mitgliedern der p53- und ING-Tumorsuppressor-Familien hin.

In unseren Experimenten war das p53 Gen schon in frühen Stadien der Tumorentwicklung herunterreguliert. Dagegen konnte eine Herunterregulierung der ING1b und ING4 Gene erst in fortgeschrittenen Stadien des NZKs nachgewiesen werden. Dabei stellte sich bei unseren immunhistochemischen Untersuchungen heraus, dass einige Patienten mit einem NZK in höherem Stadium eine Anreicherung von p53, p33ING1b und p29ING4 Proteinen aufwiesen. p53 konnte nur in 15% der Gewebeproben von NZKs im Stadium III/IV der Krankheit detektiert werden und war in normalem Gewebe und in frühen Stadien nicht nachweisbar. Dagegen wurden beide ING Proteine sowohl in 5% der normalen Nierenzellen als auch in deutlich erhöhtem Maß im Tumorgewebe nachgewiesen. Die Anzahl p33ING1b positiver Tumorzellen betrug 13,2% in frühen Stadien und 22,2% in späten Stadien, wobei die Anzahl p29ING4 positiver Tumorzellen bei 21% bzw. 38,4% lag.

Der Verlust der nukleären Lokalisation und einer erhöhten zytoplasmatischen Lokalisation von p33ING1b in bestimmten Malignomen wurde bereits von einigen Arbeitsgruppen im Rahmen verschiedener Studien demonstriert (26, 174, 176, 177, 259). Unsere Auswertung der immunhistochemischen Darstellung von ING Proteinen im Gewebe des NZKs ergab sowohl ein zytoplasmatisches als auch ein nukleäres Expressionsmuster. Im normalen Nierengewebe wurde dabei eine ING Proteinexpression mit nukleärem Färbemuster nachgewiesen. Bei

Patienten mit einem NZK waren beide p33ING1b und p29ING4 Proteine auch zytoplasmatisch gefärbt. Die Proteinexpression beider ING unterschied sich in allen Stadien der Karzinogenese. Sowohl die Immunfluoreszenz als auch die immunhistologische Färbung des p29ING4 Proteins war im Tumorgewebe von Patienten mit einem NZK sowohl früher als auch später Stadienwesentlich intensiver als die Färbung von p33ING1.

Unsere Daten deuteten darauf hin, dass das NZK eine breite entweder individuumabhängige oder stadiumabhängige Heterogenität der p33ING1b und p29ING4 Expression aufweist. In früheren Stadien zeigten 41% der Patienten eine signifikante Überexpression von p33ING1b und 31% der Patienten eine signifikante Überexpression von p29ING4; in späten Stadien waren es 40% bzw. 33% der Patienten. Für die Patienten mit den Nierentumoren, in denen p33ING1b und p29ING4 überexprimiert wird, stellen beide Proteine möglicherweise ein geeignetes TAA für eine Vakzinierungsstrategie dar.

### **4.3.2. HLA Klasse I und II Expression im Tumorgewebe**

HLA-Moleküle (HLA-I bzw. HLA-II) sind Erkennungselemente, die auf der Zelloberfläche nahezu aller somatischen Zellen exprimiert werden. Diese Moleküle präsentieren Peptide, die in der Zelle generiert werden, und signalisieren T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen (NK) den physiologischen Status der Zelle (261). Analog zu den HLA Klasse Ia-Molekülen stellen auch die HLA Klasse Ib-Moleküle Liganden für ILT-, KIR- und KLR-Rezeptoren dar, die von NK-Zellen und T-Zellen exprimiert werden und deren zytotoxische Aktivität inhibieren (3, 76, 160, 190).

Veränderungen der HLA-Ia und -II Antigenexpression erfolgen häufig in Tumoren und stellen wahrscheinlich einen Tumor *Escape* Mechanismus vor der Überwachung durch das Immunsystem dar (152). Abnormalitäten klassischer HLA Klasse I Moleküle wurden dabei bei verschiedenen Arten von Tumoren beschrieben. Dadurch werden diese Tumore der CTL vermittelten Lyse unzugänglich gemacht, sind im Gegenzug aber anfällig für die Lyse durch NK-Zellen (22). Eine reduzierte HLA-I Expression wurde in fortgeschrittenen NZK (meistens bei T3, T4 und M1) beobachtet. Dies lässt vermuten, dass eine aggressivere Progression eines NZK mit einer geringeren HLA-I Expression zusammenhängt (18).

Die quantitative Analyse zeigte, dass die Anzahl an tumor-infiltrierenden mononukleären Zellen in den NZK Fällen signifikant niedriger war, wenn die HLA-I Expression an den Tumorzellen im Vergleich zu normalem Nierenparenchym herunterreguliert war. Dies lässt einen Einfluss des Expressionsniveaus von MHC Klasse I Antigenen durch NZK-Zellen auf Immunantwort gegen den Tumor vermuten (243).

Im Gegensatz zu der weit verbreiteten Beobachtung, dass es in vielen Tumoren zu einer Herunterregulierung von HLA Klasse Ia Antigenen kommt (8, 22) demonstrierte eine Studie eine allgemeine Hochregulierung der HLA-Ia Expression in NZK unabhängig vom histologischen Subtyp. Eine andere Studie ergab eine, auch in fortgeschrittenen NZK erhaltene, hohe HLA-I Expression. Die Expression von HLA-II im normalen Nierenparenchym und im NZK war sowohl in primären als auch in fortgeschrittenen Tumoren weniger ausgeprägt (75).

Unter inflammatorischen Bedingungen kann die MHC II Expression in den meisten Zelltypen und im Gewebe durch IFN- $\gamma$  induziert werden. (132). Dengjel et al berichteten über den Überfluss an MHC II Molekülen in Tumoren von Patienten mit einem NZK und stellten dabei fest, dass MHC II positive Tumorzellen sich überwiegend am Rand des resektierten Tumors befinden. Dies weist daraufhin, dass Leukozyten unter Tumoreinfluss IFN- $\gamma$  produzieren, was sich auf die malignen Zellen in der Nachbarschaft auswirkt (43). Es wurde auch gezeigt, dass IFN- $\gamma$  produzierende CD4 positive Th1-Zellen und NK-Zellen den NZK infiltrieren (39). IFN- $\gamma$  kann Tumor assoziierte Makrophage aktivieren, was in der Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen (TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ ) resultiert, die die Tumorangio-genese unterstützen (100). Somit konnten wir den Überfluss von CD4 positiven T-Zellen und die Überexpression von IFN- $\gamma$  im Tumorgewebe vergleichbar zu normalem Gewebe feststellen.

Anders als die weit verbreiteten klassischen HLA-Ia Moleküle (HLA- A, -B, -C) wird das nichtklassische HLA-Ib (HLA-G) physiologisch größtenteils nur auf Plazentagewebe, im peripheren Blut und Amnionflüssigkeit exprimiert (128, 198). Es wurde über das Auftreten von HLA-G Molekülen in verschiedenen Tumoren (Melanom, Mama- und Lungenkarzinom sowie Hautlymphom) berichtet, in denen es häufig zu einer Herabregulation von HLA-A Antigenen kam (130, 188, 252, 253, 265). Über das NZK wurde geschrieben, dass HLA-G ausschliesslich auf Tumorzellen beschränkt war (97).

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass spezifisch der Transformation in malignen klarzelligem NZK zugrunde liegende Mechanismen der HLA-G und in einem geringeren Maß der HLA-II Moleküle hochregulieren. Unter Berücksichtigung der Immuntoleranz induzierenden Funktion von HLA-G führt dieser Mechanismus vielleicht zu einer zusätzlichen Möglichkeit des NZKs der Überwachung durch das Immunsystem zu entgehen (98).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, in wie weit sowohl HLA Klasse Ia (HLA-A, -B, -C) und -II (HLA-DRA, -B1, -B3, -B4, -B5) Moleküle als auch HLA-G Moleküle eine stadienabhängig spezifische Expression bei NZK zeigen. Für HLA Moleküle konnte ein stadienabhängiges Expressionsmuster nachgewiesen werden. Für HLA Klasse I und II Moleküle wiesen die Tumorgewebe von Patienten früherer 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 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. Eine Ausnahme stellte HLA-A Expression in fortgeschrittenen Tumoren dar, die überexprimiert wurde bei  $n=5/7$  (71,4%). 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 im Normalgewebe der Niere herabreguliert. HLA-G zeigte deutlich signifikante Überexpression in 100% aller Tumoren der Stadien I/II und in 75% aller fortgeschrittenen Tumoren.

Die immunhistologische Untersuchung der Expression von MHC Klasse I Molekülen hatte folgendes Ergebnis: im Normalgewebe wird MHC Klasse I Antigen, nicht aber MHC Klasse II exprimiert. Im Tumorgewebe früherer Stadien steigt die Anzahl MHC I und -II positiver Zellen signifikant an und geht in späteren Stadien wieder zurück.

Die oben beschriebenen Erkenntnisse und unsere Daten sprechen für die Heterogenität des MHC Expressionsmusters in den Patienten mit einem NZK. Die Tendenz zur stadienabhängigen Hochregulation von HLA Molekülen in einigen Patienten deutet auf die Möglichkeit einer Antigenpräsentation direkt durch Tumorzellen hin, was den Tumorangriff auslösen könnte. Diese Hypothese wurde in dieser Arbeit untersucht, und in den weiteren Kapiteln diskutiert.

Die Rolle der Hochregulation von HLA-G in der Protektion von Target-Zellen mit fehlerhafter HLA Klasse I Expression von NK-zellvermittelter Lysis konnte aufgezeigt werden. Es existieren kontroverse Arbeiten über die klinische und funktionale Bedeutung der Hochregulation von HLA-G Molekülen für die Entwicklung von soliden Tumoren (40, 197, 211). Es wurde ein signifikanter Unterschied in der HLA-G Expression sowohl in verschiedenen Tumoren als auch in den Tumoren derselben Art festgestellt (188, 189, 270).

In unseren Experimenten zeigte sich eine eindeutliche HLA-G Überexpression im Tumorgewebe, die sie mit der Progression des Tumors abschwächte. Genauso konnten eine geringere T-Zell-Infiltration und eine schwächere Aktivierung von TILs in Tumoren später Stadien verglichen zu den frühen Stadien aufgezeigt werden. Daher schliessen unsere Ergebnisse die immuntoleranzinduzierende Funktion der HLA-G Molekülen nicht aus. Die durch das NZK hervorriefene Veränderungen in der HLA Expression in peripheren Blutlymphozyten von Patienten mit einem NZK wurden bisher nur gering untersucht. Es wurde gezeigt, dass infiltrierte Monozyten möglicherweise den Tumorzellen ähnlich unter dem Einfluss von IFN- $\gamma$  die HLA Klasse II Moleküle exprimieren. Wir demonstrierten, dass alle HLA-I und -II Moleküle eine erhöhte Expression in mononukleären Zellen des peripheren Blutes aus Patienten mit einem NZK im Vergleich zu gesunden Probanden aufwiesen. Dies spricht einerseits für die Aktivierung von APCs und T-Zellen bei der Tumorentwicklung. Andererseits erhöhte die HLA Klasse II Expression, die Apoptoseinduktion in T-Zellen, was im Kapitel 4.3.7. erläutert wird. Die HLA-G Expression in PBLs stellte eine Ausnahme dar. Die Tumorprogression beeinflusste die signifikante Absenkung der HLA-G Expression in Patienten mit einem NZK. Wie die HLA-G Herunterregulation die Funktion von T-Lymphozyten beeinflusst, ist noch nicht klar.

### **4.3.3. Tumorzellen präsentieren p33ING1b und p29ING4 Peptide durch MHC Klasse I und II Moleküle**

Im Gegensatz zu HLA Klasse I Molekülen wurde nur eine kleine Anzahl TAA bindender HLA Klasse II Moleküle beschrieben. Aufgrund der konstanten HLA Klasse II Expression nur auf APCs des Immunsystems ist bis jetzt die Möglichkeit der Tumorantigenpräsentation über HLA Klasse II direkt durch Tumorzellen nicht berücksichtigt worden (148, 267).

Wie schon oben erläutert, exprimiert das NZK Tumorgewebe HLA Moleküle beider Klassen in größerem Maße als ein normales Nierenparenchym. Dabei ist häufig das



Nierenzellkarzinom von einer großen Anzahl mononukleärer Zellen, einschließlich T-Zellen, infiltriert (60, 161, 269). Ein Großteil dieser vornehmlich CD3+CD8+ T-Zellen besitzt *in vitro* lytische Fähigkeiten gegenüber autologen und zum Teil auch gegenüber alloge- nen, in bestimmten HLA-Allelen übereinstimmenden Tumorzellen (94, 244). Außerdem wurde gezeigt, dass NZK Zellen überexprimierte TAAs über HLA-DR Moleküle präsentieren. Einige solcher direkt aus dem NZK isolierte MHC Klasse II Moleküle enthielten Epitope von CD4 T-Zellen (43, 172).

Mittels Immunhistologie haben wir die p33ING1b und p29ING4 Proteine im Tumorgewebe von Patienten mit einem NZK analysiert. Unsere Untersuchung hat ergeben, dass die Präsentation von beiden ING Proteinen prinzipiell über die beiden Komplexe MHC 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). Die p29ING4 Präsentation über MHC II war nur unbedeutend geringer ausgeprägt. Eine rückläufige Tendenz beim weiteren Tumorwachstum ist für alle drei Fälle charakteristisch. Die p33ING1b Präsentation über MHC II steigte dagegen stadienabhängig von  $22\pm 4,1\%$  in Stadien I/II des NZK bis auf  $30\pm 3,2\%$  in Stadien III/IV. In der normalen Niere konnte keine solche Präsentation nachgewiesen werden.

Für die Präsentation des ING1 Proteins durch Tumorzellen sprechen auch die Daten von Jäger et al. Er konnte die Produktion des anti-ING1 Antikörpers im Serum von Patientent mit einem Mamakarzinom, nicht aber in gesunden Probanden zeigen (105). Zusätzlich erläutern unsere Daten eine mögliche Rolle der p33ING1b und p29ING4 Präsentation über MHC I und -II Moleküle für die Auslösung der CD8+ oder CD4+ T-Zell-vermittelten Immunantwort.

#### **4.3.4. p33ING1b- und p29ING4 Expression auf peripheren und tumor-infiltrierenden Lymphozyten**

Da CD4+ Zellen eine wichtige Rollen bei der Orchestrierung der Effektor-Funktionen der T-Zell vermittelten Antitumorantwort spielen, ist die Identifikation der Epitope von den TAA, die durch CD4+ T-Zellen erkannt werden, von grossem Interesse (78, 117). Neben ihrer zytotoxischen Funktion waren TILs in der Lage, nach Tumorerkennung eine Reihe von Zytokinen wie GM-CSF, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  freizusetzen (94). Darüber hinaus gelang der

Nachweis spezifischer T-Zellen für TAA in einigen Tumor infiltrierten Lymphknoten sowie im peripheren Blut von Melanompatienten (111, 154, 187).

In unseren Experimenten exprimierten sowohl T-Lymphozyten aus dem Blut gesunder Probanden als auch aus dem Blut der Tumorpatienten verschiedener Stadien 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 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. Mittel der ING/CD4 sowie ING/CD8 Doppelfärbungen konnten wir zeigen, dass es keine wesentliche Unterschiede in der Anzahl p33ING1b- oder p29ING4-exprimierender CD4+ und CD8+ T-Zellen im peripherem Blut vorliegt.

Diese Daten deuten darauf hin, dass ein deutlich höherer Anteil von ING positiven T-Zellen in TILs als in PBLs vorkam. Dabei stieg die Anzahl ING-exprimierender Lymphozyten in peripherem Blut mit der Tumorprogression an. Dagegen zeigten die TILs eine niedrigere Anzahl solcher T-Zellen in späten Stadien des NZK und nur eine geringe Anzahl bei gesunden Probanden. Diese Daten deuten darauf hin, dass Expression beider ING Proteinen in T-Zellen mit der Tumorprogression zusammenhängt und möglicherweise für die ineffektive Tumorummunantwort beibringt. Die Rolle von ING Proteinen in TILs muss noch genau untersucht werden.

#### **4.3.5. Immunreaktivität peripherer Blutlymphozyten nach Stimulation mit p33ING1b und p29ING4 Peptiden**

Eine Anzahl von Studien deutet darauf hin, dass eine Th1/Tc1 Antwort eine wesentliche Rolle bei der Abstoßung von Tumoren spielt. CD4+ Th1-Zellen sezernieren IFN- $\gamma$  und IL-2, was die zelluläre Immunität fördert, zum Teil durch Bereitstellung von Hilfssignalen für die

zytotoxischen CD8+ T-Lymphozyten, die auch die Fähigkeit haben, IFN- $\gamma$  als Antwort auf Antigene zu produzieren (70, 107, 153, 186).

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Immunantwort auf NZK die Patienten gegen eine Progression der Erkrankung schützt und in eingeschränkten Fällen zu Tumorregression führt. Diese Beobachtung wird durch das seltene jedoch detektierbare Auftreten spontaner Regressionen von NZK und von der höheren Inzidenz von Nierenzelltumoren bei Patienten, die eine immunsuppressive Therapie nach Nierentransplantation erhalten, unterstützt (47, 116, 125). Im NZK besteht außerdem ein deutliches T-Zell-Infiltrat, und bei einigen Patienten konnten tumorspezifische T-Zelllinien und Klone aus den Tumoren gewonnen werden (12, 60, 207). Es wurde gezeigt, dass für MAGE-6 und EphA2 Antigene spezifische CD4+ und CD8+ T-Zellen, die in NZK exprimiert werden, im peripheren Blut gefunden werden und bei Patienten ohne Anzeichen für die Krankheit Th1/Tc1 Antworten vermitteln können. Es ist allerdings auch evident, dass bei Patienten mit einem aktiven NZK die Entwicklung einer effektiven Th1/Tc1 Antwort gestört ist. Ein Überwiegen der CD4+ Th2 Zellen gegen MAGE-6 Antigen ist nicht auf Patienten mit einem NZK beschränkt. Eine defektive CD4+ IFN- $\gamma$  Antwort auf MAGE-6 wurde bei Patienten mit Melanom berichtet (235, 236).

Eine CD4+ Th1 Defizienz gegenüber tumor-spezifischen Antigenen wurde festgestellt (196). In Übereinstimmung mit einer Studie, die die IL-4 Produktion durch T-Zellen von Patienten mit einem NZK als Antwort auf eine polyklonale Aktivierung untersuchte, wurde demonstriert, dass bei Patienten mit einer fortgeschrittener Erkrankung der Anteil an IL-4 produzierenden CD4 positiven Zellen signifikant höher und das Th1/Th2 Verhältnis niedriger war (63). Tierstudien am B16 Melanom Modell haben bei der Tumorprogression einen Shift von der gemischten Th1/Th2 Typ CD4+ T-Zell Antwort zu einer Th2/Treg bestimmten Antwort ergeben. Durch Zugabe von anti-IL-4 und anti-IL-10 wurden die Th2 Zellen blockiert (164, 171, 213).

Man geht davon aus, dass IFN- $\gamma$  eine wichtige Rolle in der T-Zell-vermittelten Tumorlyse spielt, da bei CD8+ TIL Linien aus NZKs, die spezifisch für autologe NZK Zellen lytisch waren, gezeigt werden konnte, dass sie IFN- $\gamma$  in Antwort auf autologe aber nicht auf allogenetische NZK Zellen produzierten (64). In einem syngenem Mausmodell wurde gezeigt, dass TILs, die *in vitro* mit Tumorzellen des ursprünglichen Tumors stimuliert wurden, relativ hohe Mengen von IFN- $\gamma$  ausschütteten (167, 168). Eine hohe Expression von IFN- $\gamma$  mRNA in

CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> TILs aus NZK deutet auf eine tumorspezifische Aktivierung dieser Zellen *in vivo* hin.

Um die Möglichkeit einer durch ING Peptide induzierten T-Zell-Antwort in Patienten mit einem NZK nachzuweisen und um zu überprüfen, ob dabei vorwiegend eine CD4- oder CD8 Antwort vorliegt, untersuchten wir die Immunreaktivität der PBLs in Antwort auf ING Antigene. Um die für die Immunaktivierung entscheidenden p33ING1b bzw. p29ING4 Epitope zu identifizieren, wurde die Stimulation mit einzelnen 19 aa langen Peptiden durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die Sequenzen aa 109-118, aa 149-158 und aa 259-268 des p33ING1b Proteins bzw. aa 149-158 und aa 209-218 des p29ING4 Proteins eine besonders hohe IFN- $\gamma$  Expression in PBLs von Patienten aller Tumorstadien, jedoch nicht gesunder Probanden, hervorrufen. Die Sequenzen aa 109-118 des p33ING1b Proteins bzw. aa 129-138 und 139-148 des p29ING4 Proteins wiesen dabei eine erhöhte Expression des immunsupprimierenden Zytokins IL-10 bei Patienten früher Stadien auf. Für Patienten später Stadien wirkten zusätzlich die Sequenzen aa 209-218 und 239-248 von p29ING4 stimulierend. Eine geringe Stimulation der IL-10 Expression in PBLs zeigten die Sequenzen aa 149-158 und 209-228 von p29ING4 bei Patienten in den Stadien I/II des NZKs. Es wurde auch festgestellt, dass die Sequenzen aa 149-158 von p29ING4 eine besondere Rolle für die Stimulation der IL-2 Expression spielten. Unter anderen Sequenzen war sie auch für die Aktivierung der IL-2R, IL-4, -5, und -13 bedeutsam. Dies deutet auf eine stimulierende Wirkung dieses p29ING4 Epitops auf die Typ 1- bzw. Th2-Zell-vermittelte Immunität in den PBLs der Patienten mit einem NZK. Das gilt aber nicht für gesunde Probanden.

Die stimulierende Wirkung dieses p29ING4 Epitops auf die CD4- bzw. CD8 depletierte PBLs wurde in weiteren Experimenten untersucht. Bei Patienten früher Stadien des NZKs konnte ein Shift zur Th1-Immunantwort (IFN- $\gamma$  Expression) gegen den Peptidpool aa 209-248 von p29ING4 gezeigt werden. Das aa 109-158 Epitop enthaltene p29ING4 Pool wies eine leicht angestiegene Aktivierung der Tc1- ( $72,7 \pm 8,1\%$ ) im Vergleich zu den Th1-Zellen ( $67,8 \pm 8,9\%$ ) bei Patienten in fortgeschrittenen Stadien auf. Interessanterweise stimulierten andere Pools nur Tc1-Zellen. Sowohl in frühen als auch in fortgeschrittenen Stadien des NZKs war die suppressive Funktion durch das aa 209-248 p29ING4 Epitop bei den CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Tc2) ausgeprägter als bei denen die durch CD4 Zellen (Th3/Treg) hervorgerufen wurden. Die mit dem aa 209-248 p29ING4 Epitop stimulierten und nicht stimulierten depletierten T-Zellen wiesen keine Expressionsunterschiede von IL-2, -4, -5 und -13 auf. Diese Tatsache spricht für

eine unbekannte Rolle der CD4+ und CD8+ T-Zell-Interaktion für die T-Zellreaktivität und die Expression von IL-4, -5 und -13. Die IL-6 Expression in PBLs von Patienten und gesunden Probanden zeigte höhere Stimulations-Indizes bei CD4 T-Zellen, was darauf hindeutet, dass die Stimulation mit dem aa 209-248 p29ING4 einen Shift zu den Th2-Zellen in der CD4 Zellpopulation hervorruft.

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 Th1/Tc1 Zellen erreicht wird. Eine suppressive Funktion bei der Stimulation mit der aa 209-248 Sequenz von p29ING4 erfüllen bei Patienten aller Tumorstadien überwiegend die Tc2-Zellen.

Es werden nun vermehrt Anstrengungen unternommen, Tumorgentherapien zu entwickeln, die auf p53 basieren (10). Da p33ING1b und p29ING4 für die effektive Anti-Tumor-Aktion von p53 von grundsätzlicher Bedeutung sind, untersuchten wir in dieser Arbeit, ob diese Proteine in einem NZK als TAA wirken und als Target für eine Immuntherapie eingesetzt werden könnten. Diese Daten deuten darauf hin, dass Nierenzellkarzinome eine breite entweder individuumabhängige oder stadiumabhängige Heterogenität der ING1b und ING4 Expression aufweisen. Über 40% der Patienten zeigten eine signifikante Überexpression von ING1b und über 30% der Patienten eine signifikante Überexpression von ING4.

Unsere immunhistochemischen Auswertungen deuten auf ein sowohl zytoplasmatisches als auch nukleäres Expressionsmuster von ING Proteinen im Tumorgewebe eines NZKs hin. Ferner zeigten wir auf, dass die Präsentation beider ING Proteine über die beiden Komplexe MHC I und II möglich ist. In der gesunden Niere dagegen konnte keine solche Präsentation nachgewiesen werden.

Aufgrund dieser Daten und der deutlich gezeigten Rolle des p29ING4 Epitops aa 149-158 bei der T-Zell vermittelten Immunaktivierung in einem NZK vermuten wir, einen geeigneten TAA für eine Vakzinierung nach Tumorresektion entdeckt zu haben. Bevor die Patienten mit einer auf p29ING4 basierten experimentellen Therapie behandelt werden können, müsste präzise in jedem Tumor der Status dieses Proteins bestimmt werden.

#### 4.3.6. Immunmodulatorische p29ING4 Therapie

Die Immuntherapie des Nierenzellkarzinoms basiert auf der nachgewiesenen Immunität dieses Tumors. Durch die Verfügbarkeit rekombinanter Zytokine seit Mitte der 80er Jahre, wurde die Immuntherapie entscheidend beeinflusst. Nachdem erste Ergebnisse von Monotherapien mit Interferonen, IL-2 und Tumornekrosefaktor vorlagen, wurden Kombinationen verschiedener Zytokine, Zytokin-Chemotherapie-Kombinationen und IL-2 mit lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK), bzw. tumor-infiltrierenden Lymphozyten klinisch getestet, in der Hoffnung hierdurch bessere Ansprechraten zu erzielen. LAK und TIL-Therapien stehen für den Begriff der adoptiven Therapien und beruhen auf der *ex-vivo* Expansion und Aktivierung von Lymphozyten aus peripherem Blut bzw. aus autologem Tumorgewebe mit Hilfe von IL-2 mit anschließender Reinfusion der expandierten und aktivierten autologen Zellen (178). Die beiden am häufigsten zur Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms eingesetzten Zytokine sind IFN- $\alpha$  und IL-2. Es handelt sich dabei um Botensubstanzen der interzellulären Kommunikation. Untenstehende Tabelle zeigt in einer Übersicht die wichtigsten Funktionen von IFN- $\alpha$  und IL-2.

**Tabelle 4.1. Übersicht der onkologisch wichtigsten Funktionen der Zytokine IFN- $\alpha$  und IL-2**

<b>Zytokin</b>	<b>Funktion</b>
IFN- $\alpha$	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Induktion von MHC Klasse I Antigenen</li> <li>- Aktivierung von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen</li> <li>- Antiproliferative Effekte, z.B. Hemmung der Angiogeneese</li> <li>- Antivirale Aktivität</li> </ul>
IL-2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Steigerung der Proliferation von Lymphozyten</li> <li>- Steigerung der Zytotoxizität von NK-Zellen, LAK und Tumor infiltrierenden Lymphozyten</li> <li>- Induktion der Lymphokinproduktion von Lymphozyten</li> </ul>

Für beide Substanzen sind inzwischen gängige Behandlungsschemata vorhanden. Die Applikation erfolgt in der Regel subkutan und kann ambulant durchgeführt werden. Hierbei konnten objektiv reproduzierbare Remissionsraten von 26% der behandelten Patienten gezeigt werden (178).

In dieser Arbeit wurde die stimulierende Rolle eines p29ING4 Epitopes (aa 149-158) sowohl bei der Aktivierung von Th1- als auch Th2-Zell vermittelter Immunität in PBLs der Patienten mit einem NZK jedoch nicht bei gesunden Probanden gezeigt. Dabei bewirkte dieses Epitop enthaltende Sequenz aa 209-248 von p29ING4 eine Aktivierung der Th1- und Th2-Zellen bei Tumorpatienten früher Stadien und die Entstehung eines Gleichgewichts der Th1/Tc1 Zellen bei Tumorpatienten später Stadien. Eine suppressive Funktion bei der Stimulation mit der aa 209-248 Sequenz von p29ING4 erfüllen bei Patienten aller Tumorstadien überwiegend die Tc2-Zellen. Diese Daten deuten darauf hin, dass die p29ING4 Stimulation die Th-Immunreaktivität in Patienten früher Stadien hervorruft aber auch Tc1 Zellen in Patienten vorgeschrittener Stadien aktiviert. Dabei stimuliert der aa 149-158 p29ING4 Epitop in Patienten aller Tumorstadien die IL-2 und IFN- $\gamma$  Produktion. Aufgrund dessen, sollte die auf p29ING4 basierte Immuntherapie in Kombination mit CTLs aktivierenden Zytokintherapien (z.B. IFN- $\alpha$ ) durchgeführt werden.

### **4.3.7. Die Apoptose im Immunsystem der Tumorpatienten**

#### **4.3.7.1. Untersuchung der Apoptose von T-Lymphozyten**

Die Apoptose, definiert als programmierter Zelltod, ist ein genetisch regulierter, aktiver biochemischer Prozess. Die Apoptose unterscheidet sich von der Nekrose durch morphologische und biochemische Kriterien wie Zellschrumpfung, Chromatinkondensation, Kernfragmentation, DNA-Fragmentation und Degradation des Zytoskeletts.

Die Apoptose spielt eine fundamentale Rolle im Immunsystem (122). Das T-Zell-Repertoire wird im Thymus durch Apoptose und „Überlebens-Signale“ (*Survival*-Signale) geformt. Die Zahl der T-Zellen, die den Thymus verlassen und in die Peripherie gelangen, beträgt nur etwa 2-3 % der zunächst generierten Zellen. Auch periphere T-Zellen werden durch die Apoptose deletiert (11). Nach Aktivierung durchlaufen T-Zellen mehrere Phasen: (a) eine klonale Expansions- und Effektorphase nach Antigenstimulation, (b) eine Phase, in der die Immunantwort wieder abgeschaltet wird, indem die meisten Antigen spezifischen T-Zellen schließlich eliminiert werden – ein Prozess, der Aktivierungs-induzierter Zelltod (AICD) genannt wird, und (c) eine Phase, in der einige überlebende T-Zellen zu Gedächtniszellen werden.

Für die erhöhte Apoptose von Lymphozyten werden sowohl das Fas/FasL-System als auch das TRAIL/APO 2-L-System verantwortlich gemacht, deren Rezeptoren auf Oberflächen von Lymphozyten hochreguliert werden (108). CD4+ und CD8+ Subpopulationen zeigen signifikante Unterschiede bei den Apoptoseraten von peripheren Blutzellen (96-140). Sloan et al. fanden eine erhöhte Expression des Fas-Rezeptors auf CD4+ und CD8+ Zellen HIV-infizierter Personen und stellten fest, dass CD4+ Zellen mehr Fas-vermittelte Apoptose zeigten (221).

Neben infizierten Zellen können auch nicht infizierte Zellen (sowohl Lymphozyten als auch Monozyten), einen apoptotischen Zelltod sterben. Nur wenige der im peripheren Blut vorhandenen CD4+ Zellen sind wirklich infiziert, in der Apoptose sterben viele einen durch fremde Zellen (CD8+ T-Zellen oder Makrophagen) ausgelösten Tod (145). Bei Patienten mit einem NZK überwogen bei der Stimulation mit TAAs (MAGE-4 und EphA2) *in vivo* die Th2/Tc2 peripheren Blutzellen. Denselben Effekt hatte die Stimulation peripherer Blutlymphozyten mit den Mitogenen *in vitro*. Als Hauptmechanismus dafür könnte die Apoptose der Th1/Tc1-Zellen vermutet werden. Ausserdem könnten aus einem Tumor abgeleitete Produkte, darunter Ganglioside, in die Apoptoseentstehung der Th1 T-Zellen involviert sein. Es konnte gezeigt werden, dass aus den apoptogenen für T-Zellen Tumorüberständen isolierte Ganglioside eine Aktivierung apoptotischer Wege hervorrufen. Dabei waren die Ganglioside bei der Induktion der Apoptose in aktivierten T-Lymphozyten effektiver. Aufgrund ihrer vorlaufenden Exposition zu den Tumorantigenen (direkt oder durch eine Cross-Präsentation an den APCs) sind aktivierte T-Zellen in Tumorpatienten möglicherweise eins der sensitivsten Angriffsziele für die durch Ganglioside induzierte Apoptose. Einige Arbeitsgruppen zeigten, dass sowohl TILs als auch PBLs von Tumorpatienten sensitiver in Bezug auf Apoptose als T-Zellen gesunder Individuen sind (201, 254). In der Tumorumgebung sind die Ganglioside in die Vermittlung der T-Zell Apoptose involviert. Es ist möglich, dass in Serum ausgeschüttete Ganglioside bei Patienten mit einem NZK eine größere Anzahl Th2-Zellen mittels eines apoptotischen Effekts hervorrufen. Daher stellt die Inhibition der Th1/Tc1 Immunantwort bei Patienten mit einem NZK einen möglichen relevanten Mechanismus dar, der die Anti-Tumorimmunantwort inhibiert und dadurch zur Tumortoleranz und Progression beiträgt (196).

Proteine der TNF Familie spielen bei der Apoptoseinduktion eine wichtige Rolle. Sowohl membranintegrierte TNF (mTNF) als auch seine löslichen TNF-Formen binden an zwei



homologe Membranrezeptoren, TNFR I und TNFR II, die auf den meisten Zellen koexprimiert vorliegen. Zahlreiche Untersuchungen an humanen Zelllinien, aber auch mit normalen T-Lymphozyten, haben ergeben, dass TNFR I eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung apoptotischer zellulärer TNF-Effekte zukommt (83). TNFR II dagegen erwies sich als verantwortlich für präapoptische Sensitivierung und Proliferation von T-Zellen (123). Bei der HIV-Infektion wurde eine TNFR I und TNFR II vermittelte Apoptoseinduktion der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> peripheren Blutlymphozyten festgestellt (41).

In eigenen Experimenten zeigte sich eine erhöhte Konzentration von TNF- $\alpha$ , TNFR I und TNFR II im Serum der Patienten mit einem NZK im Vergleich zu gesunden Probanden. Bei der Progression der Krankheit von frühen in die späten Stadien konnte ein deutlicher Konzentrationsrückgang von TNF- $\alpha$ , TNFR I und -II detektiert werden. Der größte Anstieg der TNFR I und -II Expression im Serum von Tumorpatienten gibt noch eine mögliche Erklärung von Mechanismen, durch welche Tumore der Immunantwort entgehen.

In unseren Experimenten gewonnene CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Tumorpatienten und gesunden Probanden wurden auf Apoptose hin untersucht. Mittels Immunfluoreszenz wurde sowohl der TNFR I gefärbt als auch ein TUNEL Assay durchgeführt. In beiden Färbungen wies die CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation einen größeren Anteil an TNFR I und TUNEL positiven Zellen verglichen mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf. Der Anteil an TNFR I exprimierenden Zellen in beiden T-Zellpopulationen zeigte einen stadienabhängigen Charakter mit einer höheren Anzahl TNFR I positiver Zellen in frühen Stadien ( $25\pm 6\%$  für CD4<sup>+</sup> T-Zellen und  $16,3\pm 4,1\%$  für CD8<sup>+</sup> T-Zellen) im Vergleich zu fortgeschrittenen Stadien ( $17\pm 4,5\%$  für CD4<sup>+</sup> T-Zellen und  $12\pm 2,5\%$  für CD8<sup>+</sup> T-Zellen). Die TNFR I Expression manifestierte sich nur in  $5\pm 2,5\%$  der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und aber nicht in CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus peripherem Blut gesunder Probanden.

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

Weiterhin wurden CD4+ und CD8+ T-Zellen im Tumorgewebe auf ihrer Zelloberfläche auf eine Apoptose und Expression des TNFR I hin untersucht. CD4+ T-Zellen wiesen in beiden Färbungen verglichen mit der CD8+ T-Zellpopulation einen größeren Anteil TUNEL positiver Zellen auf. Der Anteil TNFR I exprimierender Zellen in beiden T-Zellpopulationen zeigte einen stadienabhängigen Charakter. T-Lymphozyten in Tumoren früher Stadien demonstrierten eine höhere Apoptoserate ( $27,5\pm 3\%$  für CD4+ T-Zellen und  $20\pm 2,8\%$  für CD8+ T-Zellen) als in fortgeschrittenen Stadien ( $20\pm 1,7\%$  für CD4+ T-Zellen und  $17,5\pm 2\%$  für CD8+ T-Zellen). Keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl TNFR I positiver TILs wurden in Tumoren später Stadien festgestellt. Der TUNEL Assay ergab bei Tumorprogression ähnliche stadienabhängige Tendenz bei TUNEL positiven T-Zellen. CD4+ Zellen zeigten eine wesentlich höhere Anzahl TUNEL positiver Zellen ( $30\pm 3\%$ ) als CD8+ Zellen ( $22,5\pm 2,8\%$  bei Patienten früher Stadien). Tumoren frühen Stadien wiesen eine höhere Anzahl an TUNEL positiven TILs als an TNFR I positiven TILs. Dagegen ergaben sich bei den TILs im Tumorgewebe später Stadien keine signifikanten Unterschiede in beiden Färbungen.

TILs wiesen eine leicht angestiegene Anzahl TNFR I- und TUNEL positiver CD4+ und CD8+ Zellen im Vergleich zu peripheren Blutzellen auf. Dies deutet darauf hin, dass die Tumorumgebung zwar eine apoptotische Wirkung auf die T-Zellen hat, dabei aber keine entscheidende Rolle für die Auslösung der Apoptose spielt.

Es wurde auch demonstriert, dass aktivierte T-Zellen von vielen Spezies MHC Moleküle Klasse II aller Isotypen (HLA-DR, DQ, DP) an deren Oberfläche exprimieren. Die Rolle von solchen MHC Klasse II exprimierenden T-Zellen konnte bis jetzt nicht genau definiert werden. Die meisten Arbeiten zeigen, dass die MHC II vermittelte Antigenpräsentation durch T-Lymphozyte mittels der Apoptoseinduktion bzw. einer klonaler Anergie in den aktivierten T-Zellen die Immunantwort inhibiert (127, 143, 192, 206, 229). Andere Studien zeigten auf, dass humane MHC Klasse II positive Thymozyten die Entwicklung und Differenzierung von unreifen doppelt-positiven Thymozyten in die reifen single-positive Thymozyte begünstigen (35).

In dieser Arbeit wurden mittels Real Time PCR mononukleare Zellen aus peripherem Blut von Patienten mit einem NZK (n=7) und gesunden Probanden (n=7) auf die Expression von HLA Molekülen untersucht. Getestete HLA Moleküle Klasse II (HLA-DRA, -DRB1, -DRB3,

-DRB4, und -DRB5) wiesen eine erhöhte Expression in peripheren Blutlymphozyten von Patienten mit einem NZK im Vergleich zu gesunden Probanden auf. Unsere Daten bestätigen die Aussage, dass die HLA Klasse II durch T-Zellen exprimiert wird und eine apoptotische Wirkung hat.

### **4.3.7.2. Apoptotische Wirkung von p33ING1b und p29ING4 Peptiden**

In unseren Experimenten konnten wir eine durch eine Stimulation mit ING Peptidpools verglichen mit Zellen ohne Stimulation eine unveränderte TNFR I Expression in depletierten CD4+ bzw. CD8+ Zellen zeigen. Dies deutet darauf hin, dass sowohl CD4+ als auch CD8+ depletierte Zellen nicht in der Lage sind, unter dem Einfluss von ING Proteinen in die durch TNFR I vermittelte Apoptose zu gehen. Dagegen zeigten nicht depletierte PBLs diese Fähigkeit bei 56% der Patienten früher Stadien und 52% der Patienten fortgeschrittener Stadien. Die die TNFR I Expression aktivierenden ING Epitope unterschieden sich bei den Patienten verschiedener Stadien. In PBLs der Patienten mit den Stadien I/II riefen alle p33ING1b und p29ING4 Epitope eine ähnliche TNFR I Expression hervor. Beim Patienten später Stadien des NZKs ergab sich die TNFR I Expression durch die Sequenzen aa 269-273 von p33ING1b und durch alle Sequenzen von p29ING4. Dies spricht für eine mögliche Rolle von untersuchten ING Peptiden für die Entstehung von TNFR I. Diese Funktion der ING Proteine ist stadienunabhängig und tritt etwa bei der Hälfte der Patienten mit einem NZK auf.

Welchen Beitrag die durch p33ING1b und p29ING4 Präsentation stimulierte TNFR I Expression in der Apoptose von ING spezifischen Lymphozyten leistete, wurde nicht untersucht. Es wurde aber demonstriert, dass in TILs und in PBLs nicht alle TNFR I positive T-Zellen in die Apoptose gehen.

Außerdem zeigte sich, dass TNFR II, der eine T-Zell proliferative Funktion erfüllt, nach der Stimulation mit ING Peptiden durch PBLs aller Tumorpatienten sezerniert wird. Unsere Experimente ergaben, dass TNFR II durch depletierte sowohl CD4+ als auch CD8+ PBLs exprimiert wird. Beide Zellpopulationen zeigten jeweils einen leichten Anstieg (maximal bis auf  $2,9 \pm 1,3\%$ ) bei Patienten früher Stadien. Die CD8+ PBLs von Patienten später Stadien wiesen eine signifikant erhöhte TNFR II Expression ( $19,4 \pm 5,8\%$  im Falle aa 259-273 von p33ING1b und  $4,5 \pm 3,3\%$  im Falle aa 209-248 von p29ING4) auf, wohingegen die ING

Pepidpools bei den CD4+ positive PBLs nur einen unbedeutenden Anstieg der TNFR II Expression bewirkten.

Diese Daten sprechen für eine hohe induzierbare Proliferation der CD8+ Lymphozyten der Patienten mit vorgeschrittenen Tumoren gegenüber p33ING1b und p29ING4. Eine effektive Stimulation von PBLs der Patienten aller Stadien ergab sich für die Peptide p33ING1b aa 269-273, p29ING4 aa 129-138 und aa 149-158. Die höchsten TNFR II Stimations-Indizes wurden durch p33ING1b aa 109-118 in PBLs der Patienten früher Stadien ( $70,6 \pm 5,9\%$ ) und p29ING4 aa 239-248 in PBLs der Patienten später Stadien ( $61,4 \pm 5,4\%$ ) erreicht. PBLs gesunder Probanden reagierten dagegen auf diese Sequenzen nicht. Die Sequenz p29ING4 aa 149-158 hat sich bei Patienten aller Stadien durch ihre stimulatorische Wirkung auf die Expression von IL-2 und IFN- $\gamma$  als stark proliferationsfördernd für die Tc1/Th1-Zellen erwiesen. Dabei bewirkte sie nur eine geringe Expression von IL-10, dem Zytokin der Tc2/Th2/Th3/Treg Zellen.

Die TNF- $\alpha$  Antwort war nach der Stimulation von PBLs der Patienten im Vergleich zu der gesunder Probanden moderat ausgebildet. In allen Stadien war sie überwiegend durch CD8+ Zellen geprägt. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Stimulation mit dem p29ING4 Epitop aa 149-158 die Induktion einer Apoptose in CD4+ Zellen (darunter auch Th3/Treg) bewirken kann.

#### **4.4. Ausblick**

Das Nierenzellkarzinom ist das dritthäufigste urologische Malignom und macht ca. 3% aller bösartigen Tumoren aus. Die einzige kurative Therapie des Nierenzellkarzinoms ist die Diagnose und Entfernung des Primärtumors im Frühstadium. Nach heutigem Kenntnisstand gibt es keine wirkungsvolle Chemotherapie des Nierenzellkarzinoms. Sämtliche Therapieansätze mit verschiedenen Chemotherapieschemata, welche sich *in vitro* als wirksam gegen ein Tumorzellwachstum erwiesen, führten *in vivo* bislang zu keinem Effekt bezüglich einer Verlängerung der Überlebenszeit der Patienten.

Häufig wird das Nierenzellkarzinom von einer großen Anzahl mononukleärer Zellen, einschließlich der T-Zellen, infiltriert. Die Entdeckung relevanter tumorassoziierter Antigene

im Nierenzellkarzinom und die Entwicklung einer gegen sie gerichteten spezifischen T-Zell-Immunantwort könnten daher einen viel versprechenden therapeutischen Ansatz darstellen.

Abgesehen von der Beobachtung, dass offensichtlich eine breite individuelle oder aber stadienabhängige Heterogenität der p33ING1b und p29ING4 Expression für das Nierenzellkarzinom vorliegt, wiesen etwa 40% der Patienten früher Stadien eine signifikante Überexpression des p33ING1b und über 30% der Patienten eine signifikante Überexpression des p29ING4 auf. In späten Stadien war dieses Expressionsmuster nicht signifikant verändert. Beide Proteine werden über MHC Klasse I und II Komplex-Moleküle selektiv im Tumorgewebe, wie anschaulich in dieser Arbeit aufgezeigt, präsentiert. Insofern stellt besonders die hier nachgewiesene stimulierende Rolle des p29ING4 (aa 149-158) Epitops gegenüber T-Zellen aus den Tumorpatienten einen sehr interessanten Ansatz für eine immunbasierte Tumorthherapie in Patienten mit einem Nierenzellkarzinom dar. Eine p29ING4-basierte Immuntherapie (z.B. Vakzinierung) in Kombination mit einer bereits klinisch eingesetzten Zytokintherapie (IFN- $\alpha$  und IL-2) in Patienten mit einem p29ING4-überexprimierenden Nierenzellkarzinom erscheint somit als eine viel versprechende immuntherapeutische Strategie für die Zukunft.