

1. Einleitung

1.1. Klinische und morphologische Aspekte zum Nierenzellkarzinom

1.1.1. Epidemiologie und Ätiologie

Das Nierenzellkarzinom (NZK) als ein maligner epithelialer Tumor des Nierenparenchyms ist mit einem Anteil von über 80% der häufigste maligne Tumor der Niere und macht ca. 3% aller bösartigen Tumoren überhaupt aus (17, 19, 67, 194). In der Bundesrepublik Deutschland werden pro Jahr etwa 10.000 Neuerkrankungen registriert (23, 104). Die altersbezogene Inzidenz der Erkrankung steigt ab dem 35. Lebensjahr kontinuierlich an und erreicht ihren Höhepunkt im 6. Lebensjahrzehnt (225). Die Häufigkeit in der Krebsstatistik liegt für Männer an zehnter Stelle und für Frauen an vierzehnter Stelle (Verhältnis Männer:Frauen 2:1).

Das Nierenzellkarzinom tritt sporadisch sowie familiär auf. Die familiären Formen machen etwa 1 bis 2% aller Nierentumoren aus (136). Es sind mindestens zwei Unterformen zu unterscheiden, die mit dem von Hippel-Lindau Syndrom (VHLS) gekoppelte und eine ausschließlich auf die Niere beschränkte Form. Sehr häufig werden bei letzter Form bei Chromosomenanalysen aus Tumorgewebe Deletionen und Translokationen des Chromosoms 3 (3p14) sowie weitere unspezifische Aberrationen gefunden. Bei nahezu allen Patienten der ersten Form mit VHLS ist ein Funktionsverlust des von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgens in Tumorzellen nachweisbar (136).

Die Ätiologie des Nierenzellkarzinoms ist nicht vollständig geklärt. Für die Genese der klarzelligen bzw. der nichtpapillären Form gilt als vorherrschender Mechanismus der Verlust von genetischem Material vom kurzen Arm des Chromosoms 3 (3p). Zu den Genen, die bei der Entstehung klarzelliger Tumore eine Rolle spielen könnten, gehört das auf Chromosom 3p lokalisierte von Hippel-Lindau-Gen, ein vermeintliches Tumorsuppressorgen. Zytogenetisch ist ein Tumorprogress mit weiteren chromosomalen Aberrationen assoziiert (Abbildung 1). Auch für nichtklarzellige bzw. papilläre Tumore wurden charakteristische chromosomale Veränderungen beschrieben, wie z.B. eine Trisomie der Chromosomen 7, 8, 12 oder 17 sowie der Verlust des Y-Chromosoms (54, 118-120, 158). Sporadische Karzinome treten in der Regel unilateral auf, während hereditäre Tumore relativ häufig synchron oder metachron beide Nieren betreffen (29, 46, 101). Patienten mit kongenitalen polyzystischen Nieren haben ein deutlich

erhöhtes Karzinomrisiko. Zum Zeitpunkt der Detektion eines Tumors sind ca. 40% der Patienten in einem lokalisierten Stadium, ca. 30% in einem scheinbar lokalisierten Stadium mit Auftreten so genannter Spätmetastasen, und weitere ca. 30% weisen bereits eine Metastasierung auf (241).

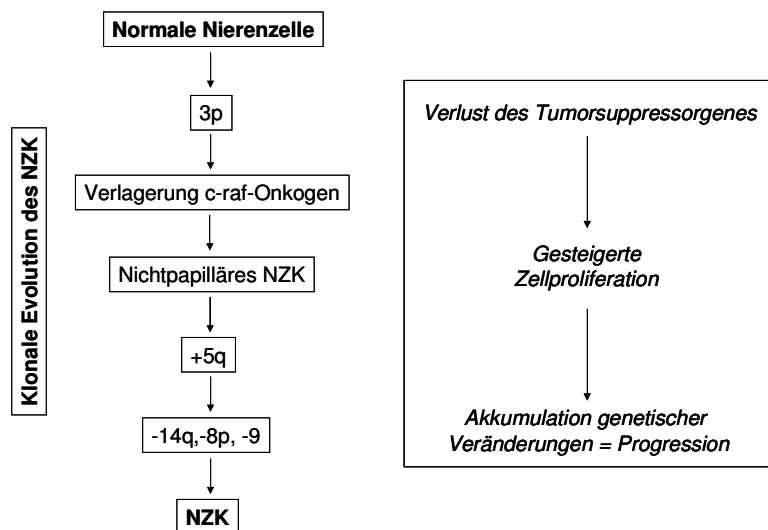


Abbildung 1.1. Klonale Entwicklung des klarzelligen (nichtpapillären) Nierenzellkarzinoms.

1.1.2. Histologie

Die neue pathologische Klassifikation entsprechend der internationalen *Workgroup on Renal Tumors* von 1997 unterteilt die Nierentumoren in zwei Gruppen benigner und maligner Neoplasien (224). Zu den benignen Tumoren zählen papilläre Adenome, Onkozytome, metanephridische Adenome und metanephridische Adenofibrome. Die malignen Neoplasmen werden sowohl zytomorphologisch und zytogenetisch, als auch nach Graduierung (*Grading*) und Stadium (*Staging*) klassifiziert.

1.1.2.1. Zytomorphologische Typisierung

Nach der Klassifikation von Thoenes et al. („Mainzer Klassifikation“) (239) werden Nierenzellkarzinome und das Onkozytom nach drei Hauptmerkmalen unterteilt: Zelltyp, Wachstumsmuster und *Grading*. Der Zelltyp wird als Primärmerkmal zur Typisierung festgestellt. Das Wachstumsmuster und das *Grading* sind Sekundärmerkmale. Beim Zelltyp werden folgende Typen unterschieden: klarzelliger, chromophiler und chromophober, onkozytischer, Ductus-Bellini-Typ, metanephroider und neuroendokriner Typ.

Der klarzellige Typ besteht aus transparenten zytoplasmatischen Zellen mit z.T. eosinophilem Zytoplasma. Er ist durch eine massive zytoplasmatische Akkumulation von Glykogen und Neutralfett als Ausdruck eines gestörten, tumortypischen Glykogen- und Lipidmetabolismus charakterisiert. Das Wachstumsmuster ist kompakt oder zystisch. Die Häufigkeit beträgt ca. 70%.

Der chromophile Typ wurde in der „Mainzer Klassifikation“ entsprechend seinem Wachstumsmuster „tubulo-papilläres“ Karzinom genannt. Das chromophile Karzinom zeichnet sich durch kleine Zellen mit gefärbtem Zytoplasma und wenigen Mitochondrien aus. Durch Lipideinlagerungen bildet sich ein helles, feinvaskularisiertes Zytoplasma. Die Häufigkeit beträgt ca. 10 bis 15%.

Der chromophobe Typ kann durch die positive Reaktion mit Hale'schem Eisenkolloid erkannt werden. Die Zellen zeichnen sich durch einen geringen Glykogen- und Lipidgehalt aus. Das Wachstumsmuster ist kompakt. Die Häufigkeit beträgt ca. 5%.

Der onkozytische Typ zeigt grosse Tumorzellen mit einer intensiven Eosinophilie ihres granulären Zytoplasmas, bedingt durch den Reichtum an Mitochondrien. Mikroskopisch fällt an den bräunlichen Zellen die Tendenz zur Kapselbildung auf. Das Onkozytom nimmt wegen seines benignen Wachstumsverhaltens eine Sonderrolle unter den Nierentumoren ein. Die Häufigkeit beträgt ca. 4%.

Der Ductus-Bellini Typ ist bezüglich Kernform, Zellgröße und Wachstumsmuster sehr variabel. Häufig kommt es zu einem Übergreifen auf das Nierenbecken. Die Häufigkeit beträgt weniger als 1%.

Der metanephoide Typ ist ein seltener Typ und entspricht dem Wilms-Tumor des Erwachsenen; er zeigt ein blastemisches Bild mit kleinen, strukturlosen Zellen und praktisch keinen Mitosen.

Der neuroendokrine Typ ist ebenso ein seltener, stark proliferierender Tumor mit entsprechendem Mitosereichtum und erinnert an das Bronchialkarzinom. Das Wachstumsmuster kann kompakt imponieren, dabei auch azinär auftreten, oder tubulopapillär oder schließlich zystisch erscheinen.

1.1.2.2. Zytogenetische Typisierung

Aufgrund zytogenetischer Untersuchungen lassen sich Nierenzellkarzinome in wesentlichen in klarzellige (nicht-papilläre), papilläre und chromophobe Formen einteilen (118, 119), mit jeweils charakteristischen zytogenetischen Phänomenen (Tabelle 1.1. (66)).

Tabelle 1.1. Zytogenetische Typen des Nierenzellkarzinoms

<i>Genotyp</i>	<i>Häufigkeit</i>	<i>Zytogenetische Phänomene</i>
Klarzellig	80 %	3p-Verlust, Trisomie (5q)
Papillär	10 %	Trisomie (7,17), Y-Verlust, u. a.
Chromophob	5 %	13-, 17-, 21-Verluste u. a.

1.1.2.3. Grading

Das Grading richtet sich nach der zellulären Entdifferenzierung (G1-3) und ist als solches auch als prognostischer Parameter von Interesse. Als Autopsiedaten (z.T. Mehrfachnennung) ergeben sich folgende Metastasierungsmuster, wie in der Tabelle 1.2. dargestellt.

Tabelle 1.2. Metastasierungspraedilektion für das Nierenzellkarzinom

• Lunge	55%	• Kontralaterale Niere	11%
• Lymphknoten	34%	• ZNS	5,7%
• Leber	33%	• Herz	5%
• Knochen	32%		

Die histopathologische Gradeinteilung der Tumoren erfolgt nach WHO-Richtlinien (81, 87, 93) und wird in drei Grade vorgenommen.

Grad 1: Die Zellkerne sind vorwiegend rund und etwa von der Größe der Kerne der Tubulusepithelzellen mit nur geringer Größenvarianz. Das Chromatin ist fein bzw. kondensiert bis pyknotisch. Nukleolen finden sich vereinzelt zentral, selten in Nähe der Kernmembran. Ihre Größe entspricht etwa jener der Nukleolen der Tubulusepithelzellen. Mitosen finden sich praktisch nicht.

Grad 2: Die Zellkerne in Tumorzellen dieses Malignitätsgrades sind nicht mehr nur rund, sondern variieren in der Form. Invaginationen sind nicht ungewöhnlich, ebenso wie eine

Größenzunahme im Vergleich mit den Kernen der Tubulusepithelzellen. Das Chromatin ist fein bis grob, gelegentlich kondensiert bis hyperchromatisch. Die Größe der Zellkerne untereinander schwankt leicht. Gelegentlich sieht man auch mehrkernige Zellen. Ein bis zwei etwas vergrößerte Nukleolen pro Zellkern finden sich zentral oder leicht exzentrisch. Mitosen sind vorhanden, aber nicht zahlreich.

Grad 3: Große bis riesige und in ihrer Form sehr unterschiedliche Zellkerne sind charakteristisch für diese Art der Tumoren. Die Gestalt der Kerne ist unregelmäßig, polyzyklisch und polymorph. Das Chromatin ist sehr grob, ungleich verteilt und immer hyperchromatisch. Die Anzahl der Nukleolen pro Kern reicht von einem Nukleolus bis hin zu mehreren Nukleoli welche sehr groß werden können. Mehrkernige Zellen finden sich häufig, hochgradig atypische und riesige Tumorzellen sind keine Seltenheit. Ebenso zahlreich sind atypische Mitosen. Die Form der Zellen folgt keinem Schema mehr, oftmals sind die Zellen spindelförmig bzw. pleomorph.

1.1.2.4. Staging

Beim Staging erfolgt eine Unterteilung der Tumore nach Ausbreitungsgrad und Größe. Es existieren mehrere Staging-Systeme, wobei heute das Tumorstadium- und das TNM-System der AJCC/UICC (*American Joint Committee on Cancer* bzw. *Union Internationale Contre le Cancer*) allgemein anerkannt und am gebräuchlichsten sind. Mit dem TNM-System wird das Staging in drei Komponenten unterteilt: T (Tumorgröße), N (Lymphknotenbefall) und M (Metastasen) (238), d.h. es werden einerseits die Ausdehnung des Primärtumors und andererseits der Lymphknoten-Status und das Vorliegen von Fernmetastasen zur Klassifizierung der insgesamt vier verschiedenen Tumorstadiengruppen berücksichtigt (Tabelle 1.3.).

Tabelle 1.3. Klassifikation des Nierenzellkarzinoms nach dem TNM-System (nach AJCC/UICC, 1997)

<i>TNM</i>	<i>Ausmass der Erkrankung</i>
<i>T – Primärtumor</i>	
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Tumor auf die Niere begrenzt, größte Ausdehnung: 7 cm oder weniger
T2	Tumor auf die Niere begrenzt, größte Ausdehnung: >7 cm
T3	Tumor breitet sich in größeren Venen aus oder infiltriert die Nebenniere oder perirenales Gewebe, jedoch nicht jenseits der Gerota-Faszie
T3a	Tumor infiltriert Nebenniere oder perirenales Gewebe, aber nicht jenseits der Gerota-Faszie
T3b	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in Nierenvene(n) oder Vena cava unterhalb des Zwerchfells
T3c	Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in Vena cava oberhalb des Zwerchfells
T4	Tumor infiltriert über die Gerota-Faszie hinaus
<i>N - Regionäre Lymphknoten</i>	
Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Solitär, 2 cm oder weniger / Metastase(n) in solitären regionären Lymphknoten
N2	Solitär oder multipel, Metastasen in mehr als einem regionären Lymphknoten
N3	Multipel, mehr als 5 cm
<i>M – Fernmetastasen</i>	
Mx	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Ebenso weit verbreitet ist die amerikanische Klassifikation nach Robson et al., 1969. Nach dieser Klassifikation wurde die Ausdehnung des Nierenzellkarzinoms in verschiedenen Stadien zusammengefasst. Demnach entspricht einem Stadium I ein kleiner Tumor (T1) ohne Lymphknoten- oder Fernmetastasen. Die Ausbreitung des Tumors entspricht dem Stadium II, wenn es sich um einen Tumor größer als 2,5 cm handelt, der ebenfalls noch nicht lymphogen oder hämatogen metastasiert ist. Eine Lymphknotenmetastasierung (N1) eines T1- oder T2-Tumors bzw. eines T3-Tumor mit oder ohne Lymphknotenbefall aber ohne Fernmetastasen gilt

als Stadium III. Eine Fernmetastasierung bzw. ein Lymphknotenbefall > N1 sowie ein T4-Tumor entsprechen immer einem Stadium IV nach Robson (Tabelle 1.4.).

Tabelle 1.4. Klassifikation des Nierenzellkarzinoms nach Robson

	<i>Ausmass der Erkrankung</i>	<i>TNM</i>
Ia	Tumor auf Niere beschränkt (< 2,5 cm)	T1
Ib	Tumor auf Niere beschränkt (> 2,5 cm)	T2
II	Tumor dehnt sich auf perirenales Fett oder Nebenniere aus	T3a
IIIa	Tumor dehnt sich auf Nierenvene (T3b) oder V. cava (T3c) aus	T3b, T3c
IIIb	Tumor dehnt sich auf regionale LK aus	N1-3
IIIc	Tumor dehnt sich auf lokale Gefässe und LK aus	T3b, N1-3
IVa	Ausdehnung auf benachbarte Organe (ausser ipsilaterale NN)	T4, M0-1
IVb	Fernmetastasen	M1, N1-3

1.1.3. Therapie

Die einzige kurative Therapie des Nierenzellkarzinoms ist die Diagnose und Entfernung des Primärtumors im Frühstadium. Das operative Verfahren der Wahl hierzu ist die radikale Tumornephrektomie unter Mitnahme der ipsilateralen Nebenniere sowie der Lymphknoten entlang des Nierenstiels. Bei geringer Größe des Primärtumors kann in besonderen Fällen, z.B. bei anatomischer oder funktioneller Einzelniere, um den Patienten vor dem Schicksal der Dialysepflichtigkeit zu bewahren, auf eine Entfernung der gesamten Niere verzichtet und statt dessen eine organerhaltende Nierenteilresektion durchgeführt werden (222, 223). Unter diesem Aspekt muss man jedoch die Eigenschaft der Nierenzellkarzinome berücksichtigen, multizentrisch, d.h. gleichzeitig an mehreren Stellen in einer Niere, aufzutreten. Cheng et al. beziffern in einer 1991 durchgeführten Untersuchung die Inzidenz eines Zweitkarzinoms in derselben Niere wie die des Primärtumors mit sieben Prozent (32). In einer Studie von Nissenkorn et al. in der die Multizentrität des Nierenzellkarzinoms untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass bei Tumoren mit einem Durchmesser von weniger als 3 cm die totale Nephrektomie in mindestens 96% der Fälle eine Übertherapie ist (173).

Untersuchungen zur Zytostatikasensibilität des Nierenzellkarzinoms erbrachten ernüchternde Ergebnisse. Nach heutigem Kenntnisstand gibt es keine wirkungsvolle Chemotherapie des Nierenzellkarzinoms. Sämtliche Therapieansätze mit verschiedenen Chemotherapieschemata,

welche *in vitro* eine Wirkung auf das Tumorzellwachstum durch Verringerung bzw. Abtötung von Zellen zeigten, führten *in vivo* zu keinem Effekt bezüglich einer Verlängerung der Überlebenszeit der Patienten. Einzig die immunmodulierende Therapie mit rekombinantem Interleukin-2 (263), Interferon oder Lymphokin-aktivierten Killer-Zellen (LAKC) stellt heute die Therapie der Wahl des metastasierten Nierenzellkarzinoms dar (23, 151, 163). Den Interleukinen, besonders Interleukin-2, kommt in diesem Zusammenhang die wichtigere Bedeutung zu, denn sie führen zu höheren Remissionsraten als die Interferone, welche in nur 2% bzw. 12% zu einer kompletten bzw. partiellen Remission führen. Eine Durchsicht der hierzu bis heute publizierten Ergebnisse lässt jedoch leider keinen Zweifel daran, dass nur 3% aller mit Interferon behandelten Patienten eine länger als 12 Monate andauernde Remission aufweisen (151).

1.1.4. Prognose

Die Prognose des Nierenzellkarzinoms ist abhängig von der Tumorgröße, dem Erkrankungsstadium sowie dem histomorphologischen Grading. Diese drei Faktoren sind die bis heute allgemein akzeptierten Prognoseparameter des Nierenzellkarzinoms. Demnach findet sich bei T1-Tumoren eine Letalität von 45% nach 10 Jahren Überlebenszeit, bei T2- und T3-Tumoren eine Letalität von 50% nach 5 Jahren Überlebenszeit und bei T4-Tumoren eine 50%ige Letalität bei einer Lebensdauer von 18 Monaten. Ein Veneneinbruch des Tumors erhöht die Letalität auf 62% nach 5-6 Jahren Überlebenszeit. Ebenso haben Patienten mit Lymphknotenmetastasen eine verkürzte Überlebenszeit von 3 Jahren (139, 140, 142, 225).

Entsprechend der Stadieneinteilung nach Robson ist, bezogen auf die 5-Jahresüberlebensraten von 95%, 75% und 35%, für das Stadium I eine mittlere Überlebenszeit von 137 Monaten bei einer Letalität von 4%, für das Stadium II eine mittlere Überlebenszeit von 84 Monaten bei einer Letalität von 16% und für das Stadium III eine mittlere Überlebenszeit von 80 Monaten bei einer Letalität von 33% sowie im Stadium IV eine mittlere Überlebenszeit von 38 Monaten bei einer Letalität von 59% bestimmt worden (225, 239). Nach dem histomorphologischen Grading findet sich bei G1-Tumoren eine mittlere Überlebenszeit von 130 Monaten bei einer Letalität von 5%, bei G2-Tumoren eine Überlebenszeit von 91 Monaten bei einer Letalität von 25% und bei G3-Tumoren eine Überlebenszeit von 34 Monaten bei 69% Letalität. Bezogen auf die 5-Jahresüberlebensraten finden sich Werte von 95% für G1-, 60% für G2- und 25% für G3-Karzinome (225). Unter Berücksichtigung der Wachstumsformen ist kompakten

Karzinomformen eine mittlere Überlebenszeit von 94 Monaten bei einer Letalität von 25% zuzuordnen, tubulopapillären Karzinomformen eine Überlebenszeit von 17 Monaten bei einer Letalität von 17% und zystischen Wachstumsformen eine mittlere Überlebenszeit von 59 Monaten bei einer Letalität von fast null Prozent. Die histopathologische Morphologie ergibt für klarzellige Karzinome eine mittlere Überlebenszeit von 86 Monaten bei einer Letalität von 25%, für chromophobe Karzinome findet sich eine mittlere Überlebenszeit von 79 Monaten bei einer Letalität von 17% und für chromophile eine mittlere Überlebenszeit von 119 Monaten bei einer Letalität von 14%. Prognostisch sind die klarzelligen Karzinome am ungünstigsten (226, 227).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Prognose eines im Frühstadium diagnostizierten und adäquat behandelten Nierenzellkarzinoms, insbesondere derer mit guter histopathologischer Differenzierung, günstig ist. Hingegen haben bereits metastasierte Nierenzellkarzinome, nicht zuletzt wegen mangelnder therapeutischer Möglichkeiten, eine vergleichsweise schlechte Prognose.

1.2. Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressorgene sind rezessive Gene. Erst der Funktionsverlust beider Allele führt zu unkontrollierter Zellteilung und Tumorwachstum. Häufig unterdrücken Tumorsuppressorgene die Zellproliferation und wirken sich regulierend auf das Zellwachstum aus. Sie sind Antagonisten der dominanten Onkogene, deren Genprodukte Zellteilung und -wachstum fördern.

Das bekannteste aller Tumorsuppressorgene ist das p53, das in bis zu der Hälfte der humanen Tumore verändert ist. Der Verlust des normalen p53 Proteins erleichtert die Entstehung maligner Tumore. Daher unterdrückt p53 den Tumor jedoch nicht alleine. Notwendig ist nach bisherigem Kenntnisstand ein Protein, das durch ein anderes Tumorsuppressorgen, *ING1*, kodiert wird (74).

1.2.1. p53 Tumorsuppressorgen

Das p53-Tumorsuppressorgen ist ein auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 lokalisiertes 20 kB-Gen, das für ein nukleäres 53 kD-Phosphoprotein kodiert, welches die Transkription einer

Vielzahl von Genen reguliert. Auf diese Weise inhibiert p53 das Wachstum genetisch alterierter und somit potentiell neoplastischer Zellen, indem es entweder den Zellzyklus durch transkriptionelle Aktivierung von p21 arretiert oder durch einem Inhibitor cyclinabhängiger Kinasen zur Reparatur der geschädigten DNA herbeiführt (219, 262). Bei irreparablen genetischen Schädigungen induziert p53 auch die Elimination der Zelle durch Apoptose (219, 240, 262). In letzterem Zusammenhang ist auch seine Fähigkeit, die Transkription des Apoptoseinhibitors Bcl-2 herabzuregulieren, von entscheidender Bedeutung (156, 191, 219). Eine p53-vermittelte Induktion einer Apoptose kann aber auch als Antwort auf eine hypoxische Zellschädigung eintreten (271).

Das Wildtyp (wt) p53 verhindert den Fortgang des Zellzyklus durch Aktivierung der cyclinabhängigen Kinase p21 und beeinflusst auch den Eintritt in den Zellzyklus aus der G0-Phase (175). Darüber hinaus ist es direkt an der Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität beteiligt, indem es an der Reparatur geschädigter DNA-Sequenzen beteiligte Gene induziert. Außerdem inhibiert p53 mittels Geninduktion die Neoangiogenese (77, 219, 220, 262).

Bei einer Vielzahl humaner Neoplasmen ist eine p53-Inaktivierung nachweisbar (219, 262), die entweder direkt durch Genmutationen oder aber indirekt durch Bindung an virale Proteine oder Alterationen interagierender Gene (z.B. verstärkte Expression von mdm-2) verursacht ist (219, 262). p53 stellt einen Knotenpunkt in einem komplexen Netzwerk interagierender Enzyme dar, das im zellulären „Normalzustand“ inaktiv ist. Dabei wird die Menge vorhandenen p53-Proteins weniger durch das Ausmaß seiner Synthese, als durch die Geschwindigkeit seines Abbaus und durch Azetylierung bzw. Phosphorylierung im C-terminalen Bereich reguliert (147, 262).

Eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Konzentration von nukleärem p53 spielt das mdm-2-Protein, dessen Expression im Rahmen einer autoregulatorischen Feedback-Schleife durch das p53-Protein stimuliert wird und das die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse von p53 bewirkt (88, 220, 262).

Durch drei heute bekannte Auslöser wird die Degradation des p53-Proteins gehemmt: (1) DNA-Doppelstrangbrüche wirken über die Induktion der Proteinkinasen ATM und Chk2, (2) aberrierende Wachstumssignale (z.B. durch Onkogene wie ras oder myc) vermitteln die p53-Aktivierung über p14ARF und (3) eine große Anzahl von Chemotherapeutika, UV-Strahlung,

und Proteinkinase-Inhibitoren, deren Wirkungsweise offenbar weitere Kinasen involviert (262) (Abbildung 1.2.).

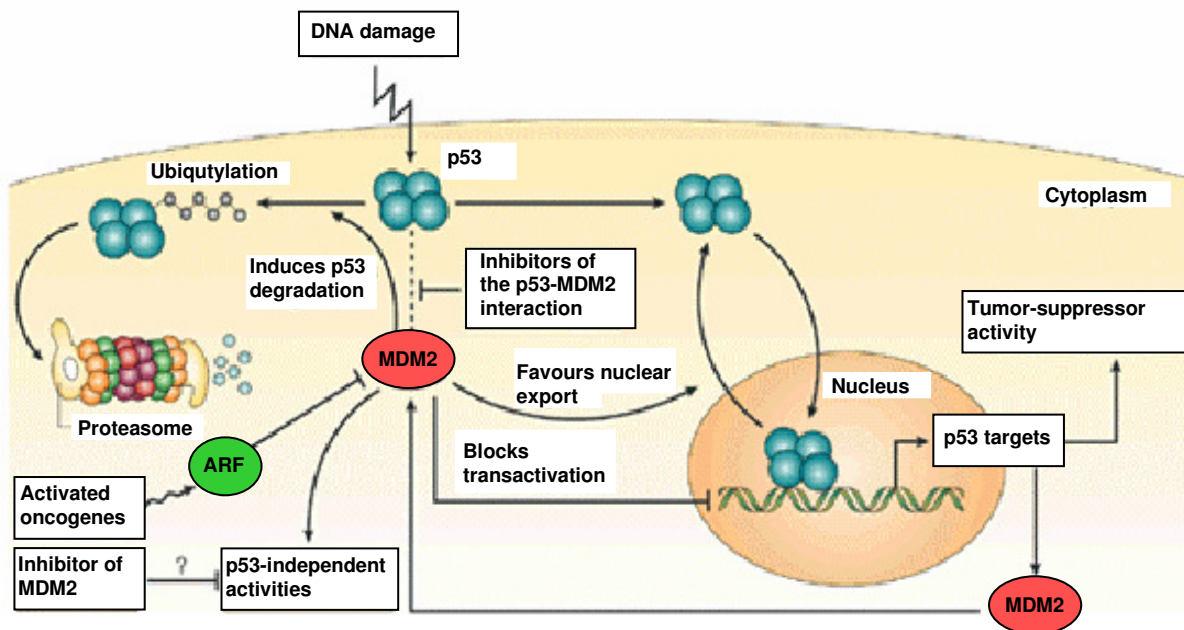


Abbildung 1.2. p53-Funktionsschema. Aus: Chene P: Inhibiting the p53-mdm2 interaction: An important target for cancer therapy. Nat Rev Cancer 3 (2003) 102-109 (Graphik verfügbar unter www.nature.com)

Das wt p53-Protein hat eine Halbwertszeit von weniger als 30 min und ist nur in sehr geringen Mengen im Normalgewebe vorhanden, wodurch eine immunhistochemisch basierte Detektion verhindert wird. Durch Alterationen des p53 (z.B. Genmutationen, Bindung an virale oder zelluläre Proteine) wird es stabilisiert und akkumuliert. Durch diese verlängerte Halbwertszeit kommt es zu einer immunhistochemisch nachweisbaren „Überexpression“ von p53 (219). Während für eine Vielzahl solider Neoplasmen, wie beispielsweise das Bronchialkarzinom (103) oder das Blasenkarzinom (220) p53-Mutationen nachgewiesen wurden, gibt es für das Nierenzellkarzinom in dieser Hinsicht zum Teil widersprüchliche Aussagen. Viele Autoren untersuchten eine p53-Überexpression immunhistochemisch. Abgesehen von der Tatsache, dass sie zu ausgesprochen divergenten Ergebnissen gelangten, ist der Rückschluss von dessen Expression auf den genetischen Status einer Zelle nicht uneingeschränkt möglich, da, wie oben erwähnt, auch andere Ereignisse als Mutationen des p53 zur Stabilisierung seines Genproduktes führen können.

Die Angaben über die Häufigkeit einer p53-Überexpression bei der klarzelliger Form sind bisher widersprüchlich (88, 89, 257). Einige Autoren beschreiben eine statistisch signifikante Korrelation zwischen einer p53-Überexpression und stärkerer histologischer Entdifferenzierung

(88, 89) sowie z.T. mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium (141, 251); ein statistisch unabhängiger Einfluss auf die Prognose ließ sich jedoch selten nachweisen (251).

1.2.2. Die ING-Tumorsuppressorfamilie

Frühe Studien des Wachstumsinhibitors 1 (Inhibitor of Growth, ING1) zeigten auf, dass dieses Gen eine bedeutende Rolle bei der Apoptose und zellulären Alterungsprozessen (*cellular senescence*) spielt. Vier weitere verwandte Gene sind seither identifiziert worden. Diese sind in verschiedene biologische Aktivitäten involviert, darunter den Stillstand des Zellzyklus, die Regulation der Gentranskription, die Reparatur der DNA und die Apoptose. Die biochemischen Funktionen der ING-Proteine als Histon-Acetyltransferasen und Histon-Deacetylasen Co-Faktoren binden diese neue Tumorsuppressorfamilie an die Regulation der Transkription, an Zellzyklus-Checkpoints, die DNA-Reparatur und die Apoptose.

Es wurden drei mögliche Transkripte des ING1-Gens gefunden; sie kodieren Proteinvarianten mit einer zu erwartenden Größe von 47, 33 und 24kDa (200). Zusätzlich zu ING1 wurden inzwischen die vier weiteren verwandten Gene (ING2, ING3, ING4 und ING5) identifiziert (215) (Abbildung 1.3.).

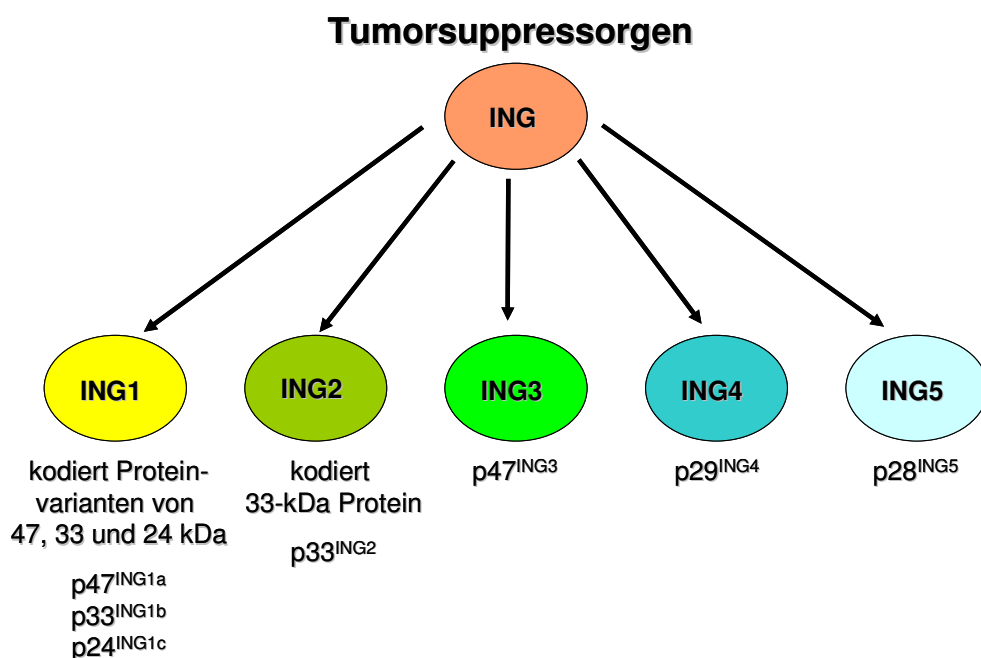


Abbildung 1.3. Die verschiedenen Formen des ING-Tumorsuppressorgens und seiner kodierten Proteine.

ING1b als häufigste untersuchte Isoform spielt bei der Pathogenese bestimmter Karzinome durch Modulation von p53 eine bedeutende Rolle. Die Bedeutung weiterer Mitglieder der ING-Suppressorgene ist noch überwiegend unbekannt.

ING2 kodiert ein 33-kDa-Protein und besitzt eine Homologie von 58,9% mit p33ING1b (215). ING3 wurde über eine Sequenz-homologe Suche identifiziert. ING4 und ING5 zeigen eine Homologie zu ING1 und ING2 auf. Beide Proteinprodukte, p29ING4 und p28ING5 sind hochgradig homolog und besitzen 72,8% gemeinsame Identität (217).

ING1 mRNA wird in verschiedenen humanen Geweben allgegenwärtig exprimiert (215). Die Northern-Blot-Analyse der spezifischen ING1-Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) -Produkte bestätigte, dass p33ING1b die in normalen Geweben vorherrschende Form mit variierenden Expressionsstufen in verschiedenen Gewebetypen ist. Die Expression von p24ING1c ist niedriger als die von p33ING1b, und alle untersuchten Gewebe exprimierten nur wenig, wenn überhaupt, p47ING1a (200). Die Northern-Analyse der murinen ING1-Homologe p31ING1 und p37ING1 zeigt ebenfalls eine allgegenwärtige Expression in allen adulten Geweben mit den höchsten Werten im Thymus auf (273). p33ING2 und p47ING3 Expressionswerte wurden in normalen Humangeweben mit verschiedenen Expressionswerten in verschiedenen Gewebetypen allgegenwärtig festgestellt. Die mRNA Expression z.B. von ING2 ist hoch im Hoden aber niedrig in der Lunge und nicht auffindbar in der Niere und Milz (215), während ING3 in der Milz stark exprimiert wird (166). ING4 wird in vielen Humangeweben mit den höchsten Werten im Hoden exprimiert (73).

Bisherige Studien verbanden die negative Regulation des zellulären Wachstums bei überexprimiertem ING1 in normalen Fibroblasten mit der Fähigkeit dieses Gens, eine G₀/G₁ Zellzyklusblockade zu initiieren (74). In anderen Untersuchungen verstärkte die Überexpression von ING1 die Apoptose in verschiedenen kultivierten Zellmodellen (33, 74, 92, 209, 210, 216). ING-Proteine werden als evolutionär konservierte Co-Faktoren der Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Deacetylase (HDAC) betrachtet, die die Acetylierung essentieller zellulärer Komponenten einschließlich der Kernhistone und des p53-Tumorsuppressors vermitteln. Ferner sind die ING-Proteine durch die Acetylierung dieser Komponenten an die Regulation der Transkription, Zellzyklus-Checkpoints, DNA-Reparatur und der Apoptose beteiligt und schließlich an die Tumorsuppressorproteine gekoppelt (Abbildung 1.4.).

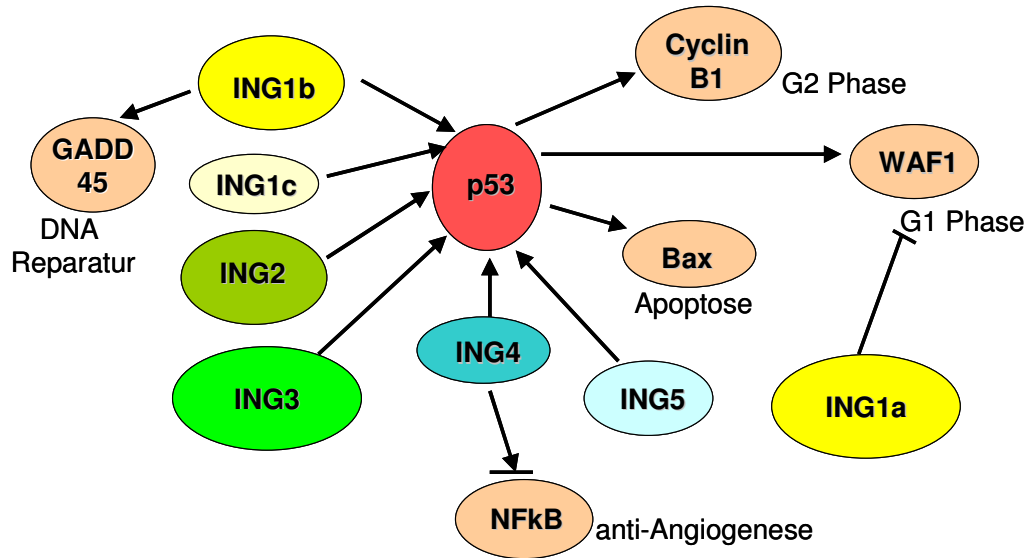


Abbildung 1.4. Funktion der ING Proteine als Tumorsuppressoren. Durch die Interaktion von ING mit p53, GADD und NFkB wird eine verstärkte DNA Reparatur und Apoptose ermöglicht sowie die Tumorangio-genese inhibiert.

1.2.2.1. Zellzyklusregulation

Die Aufrechterhaltung der Genomintegrität in einer Zelle nach genotoxischem Stress beruht auf der Fähigkeit der Zelle, den Zellzyklus für eine zelluläre Reparatur oder Apoptose anzuhalten. So wird die Vervielfältigung genetischer Veränderungen verhindert. Die Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53 während des Übertritts des Zellzyklus in die G₁/S-Phase ist dabei ein Schlüsselmechanismus, der von den Zellen zur Vermittlung einer zellulären Wachstumskontrolle benutzt wird (134). Verschiedene Zelllinien zeigten auf, dass ING-Proteine ebenso die Zellzyklusprogression beeinflussen können und aktiv in zelluläre *Checkpoints* involviert sind. Ein möglicher Mechanismus, der zuerst als verantwortlich für die ING-vermittelte Suppression des Wachstums gehalten wurde, ist das Zusammenwirken von p24ING1c mit dem p53-Tumorsuppressor zur Verstärkung der Transkription des Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitors (CDK1) p21^{Waf1} (72). Waf1 (ebenfalls bekannt als Cip1 und Sdi1) ist ein potenter Mediator des G1 zellulären *Checkpoints*, der Cyclin-CDK-Komplexe bindet und inaktiviert, was schließlich zur einer reduzierten Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb), der E2F-Sequestration und zu einem Zellzyklusstillstand am Übergang der T1/S-Phase führt (91). Außerdem führt die Überexpression von p29ING4 zu einer Reduzierung der S-Phase-Zellpopulation und einer Zunahme sowohl der G₁/S- als auch der G₂/M-Phasen-Zellpopulationen in wt p53 RKO-Zellen. Diese Effekte wurden nicht in p53 depletierten RKO-E6-Zellen festgestellt. Das deutet darauf hin, dass diese beiden ING-Mitglieder den

Zellzyklusstillstand p53-abhängig vermitteln. p29ING4 verstärkt die transkriptionale Regulation von p21^{Waf1} in einer p53-abhängigen Form (217).

Jüngste Ergebnisse zeigen verschiedene Mechanismen auf, die mit der Initiierung eines G₂-Zellzyklusstillstands und seiner Aufrechterhaltung assoziiert sind. Die Initiierung eines G₂-Zellzyklusstillstands erfordert eine Phosphorylierung der Cyclin abhängigen Kinase 1 (CDK1) und ist p53-unabhängig. p53 kann jedoch die Aufrechterhaltung dieses zellulären G₂/M Zellzyklusstillstands (4) durch die Unterdrückung von Cyclin B1 mRNA und Proteinwerten fördern (44, 102, 237). Cyclin B ist die regulatorische Teileinheit von CDK1 und ist erforderlich für einen mitotischen Start (195). Eine Mikroarray-Analyse von p33ING1b regulierten Genen identifizierte zufälligerweise *CCNB1* (Cyclin B1-Gen) als ein herunterregulierendes Ziel von p33ING1b (231), was die p53-abhängige Einbindung von ING-Proteinen im zellulären G₂/M Checkpoint andeutet. Die antiproliferativen Effekte von p33ING1b wurden durch eine erhöhte zelluläre Verdoppelungszeit nach der p53-Überexpression im Vergleich zur stark beeinträchtigten Proliferation nach der Expression beider rekombinanter p53 und p33ING1b Proteine bestätigt (248). Es ist vorstellbar, dass bestimmte ING-Mitglieder den G₂-Stillstand auch indirekt durch die Acetylierung von p53 verstärken. So wurde von einer Arbeitsgruppe berichtet, dass die p53 exprimierenden Zellen mit einem Mangel an Lysin-Rückständen eine nur geringe Auswirkung auf Cyclin B1 hatten und einem G₁- aber keinem G₂-Stillstand unterliegen könnten (170). Zusammengefasst zeigen diese Beobachtungen eine Rolle der ING-Proteine bei der Regulation der Zellzykluscheckpoints auf. ING-Proteine könnten auch in die Mitose und Meiose involviert sein, wie von Choy et al. vermutet (36).

1.2.2.2. Apoptose

Wie bei der Zellzyklusregulation ist die Kooperation mit p53 als wesentlich für die ING1-vermittelte Sensibilisierung gegenüber der Apoptose bekannt. Wichtiger noch erscheint, dass ING1-exprimierende Fibroblasten in Abwesenheit von p53 nur einen geringen Effekt auf das Zellüberleben hatten, während sowohl *ING1* als auch p53 erforderlich waren, um eine Koloniebildung zu supprimieren (72). In Übereinstimmung mit dieser Studie induzierte die adenovirale Bereitstellung sowohl von p33ING1b als auch p53 in kultivierten humanen Gliomzellen synergistisch eine Apoptose. Ähnliche Beobachtungen wurden bei Überexpression von p53 und p33ING1b in humanen Oesophagus-Karzinomzellen gemacht (214). Zusammen

inhibierten beide Tumorsuppressor-Proteine das Tumorzellwachstum, reduzierten die Lebensfähigkeit der Tumorzellen und verstärkten die Apoptose effizienter als dies bei p53 alleine der Fall war (214). Weitere Hinweise wurden für den Einfluss von ING1 in den p53-vermittelten intrinsischen apoptotischen Weg geliefert. p33ING1b verstärkte die Transaktivierung des proapoptotischen Bcl-2-Familienproteins Bax nach einer Ultraviolett (UV)-Bestrahlung und förderte die Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials. Wie erwartet war die Verstärkung der UV-induzierten Apoptose von Melanomzellen durch p33ING1b abhängig von der wt p53-Funktion (33).

Einige Beobachtungen deuten auf verschiedene Mechanismen hin, durch die unterschiedliche ING-Proteine wahrscheinlich die Apoptose verstärken. Die Wechselbeziehung zwischen p53 und verschiedenen ING-Mitgliedern könnte die apoptotische Antwort beeinflussen. Die Interaktion von ING-Proteinen mit dem proliferierenden Zellkern-Antigen (PCNA) und den Histon-modifizierenden Faktoren spielt möglicherweise ebenfalls eine große Rolle. Eine aktuelle Studie zeigte, dass durch Expression von p33ING1b, nicht jedoch von p47ING1a, Fibroblasten gegenüber der Apoptose sensibilisiert werden (260). Diese Unterschiede reflektieren die unterschiedlichen Amino-terminalen Sequenzen von ING-Proteinen. p33ING1b z.B. enthält im Gegensatz zu p47ING1a, eine PCNA-interagierende Protein (PIP)-Box, die es p33ING1b erlaubt, nach der UV-Exposition physikalisch mit PCNA zu interagieren und die Apoptose zu verstärken (209).

Andere ING-Mitglieder sind ebenso aktiv, ihre Beteiligung bei der Apoptose ist jedoch unterschiedlich. Die Überexpression von sowohl p33ING2 und auch p47ING3 induzierte eine Apoptose und einen G₁-Phasen-Zellruhestand in RKO-Zellen, jedoch nicht in einer p53-deaktivierten RKO-E6-Zelllinie (166). Das deutet auf überlappende Funktionen bei verschiedenen ING-Familienmitgliedern in einer negativen Regulation des Zellwachstums und der Apoptose als auch auf eine abhängige Beziehung zwischen verschiedenen ING-Mitgliedern und p53 hin.

1.2.2.3. DNA-Reparatur

Der p53-Tumorsuppressor spielt bekanntermaßen eine wesentliche Rolle bei der zellulären Stressantwort auf eine UV-Bestrahlung, darunter die DNA-Reparatur und die Förderung der Apoptose in Fällen, in denen die DNA-Beschädigung zu groß ist (2, 14, 137). Die Tatsache,

dass p33ING1b physikalisch an p53 bindet und ähnliche biologischen Funktionen wie p53 besitzt, führte zu der Hypothese, dass ING-Proteine möglicherweise auch direkt an der zellulären Stressantwort auf eine DNA-Schädigung beteiligt sind. In einer vorangegangenen Studie wurde gezeigt, dass die UV-Bestrahlung p53-unabhängig, aber zeit- und dosisabhängig eine zelltypspezifische p33ING1b-Expression induzierte. Sowohl erhöhte mRNA Werte als auch erhöhte Proteinexpressionen für p33ING1b wurden detektiert (2, 14, 137). Außerdem wurde beobachtet, dass die Überexpression des p33ING1b-Proteins die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) der UV-C-beschädigten exogenen Plasmid-DNA und der UV-B-geschädigten genomischen DNA verstärkte. Unter Verwendung eines Wirt-Zellreaktivierungs-Assays, bei dem ein UV-geschädigtes Transporterplasmid in eine Melanom-Zelllinie transfiziert wurde, führte die p33ING1b Überexpression im Vergleich zu Vektor- oder Antisensekontrollen zu einer zwei- bis vierfach erhöhten Reparaturwirksamkeit der UV-geschädigten Plasmid-DNA.

ING-Proteine könnten ebenfalls in frühe Reaktionen bei der zellulären Antwort auf DNA-Schäden involviert sein. Eine frühe Mobilisierung von p53 involviert die Acetylierung einer Reihe von Lysinrückständen an seiner C-terminalen regulatorischen Domäne durch CBP/p300. Die resultierenden konformationalen Veränderungen spielen eine Rolle bei der Verbreitung und Degradation von MDM2 (138), verstärken die Bindungsfähigkeit von p53 an die DNA und stimulieren die Transkription verschiedener für die DNA-Reparatur erforderlicher Gene (126, 146). Aktuelle Studien zeigten auf, dass p33ING1b und p29ING4 mit p300 kooperieren können, um die Acetylierung von p53 an Lys-382 (110, 165, 166, 217) zu fördern, was andeutet, dass die ING-Proteine nach der DNA-Schädigung möglicherweise schon früh in der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) agieren. Da es im p53 multiple Acetylierungsspunkte gibt, existieren wahrscheinlich feine Unterschiede zwischen den ING-Familienmitgliedern bei der Acetylierung von p53, die an der Definition der Spezifikation ihrer modulierenden Aktivitäten bei der DNA-Reparatur beteiligt sind.

1.2.2.4. Transkription

Unter Verwendung eines MDM2 Promotor-Luciferase-Reporters verstärkten sowohl p33ING1b und p24ING1c die Transkription auf eine p53-abhängige Art. Dies wurde jedoch nicht beobachtet, wenn ING1-Proteine zusammen mit p53-Mutanten koexprimiert wurden, die keine N-terminale Transaktivierungsdomäne besitzen (133). Dieses deutet an, dass eine

p33ING1b- und p24ING1c-vermittelte Aktivierung von p53 durch die Acetylierung für die Transkription von p53 Gentargets, wie Bax, MDM2 und p21WAF1, verantwortlich sein oder diese zumindest verstärken könnte. Murines p31ING1 zeigte auch ähnliche biologische Funktionen wie sein p33ING1b humanes Gegenstück. Anders als p53 inhibierte p31ING1 die Überexpression murinen p53 und die UV-induzierte Akkumulation von p53 und unterdrückte die p53-vermittelte Gentransaktivierung (273). Diese unterschiedliche Rolle stimmt mit Studien über die *WAF1*-Promotoraktivität überein. Diese ergaben, dass der *WAF1*-Promotor durch p47ING1a unterdrückt war, während p33ING1b und p29ING4 die *WAF1*-Promotoraktivität in einer p53-abhängigen Weise verstärkten (72, 110, 165, 166, 217). Bei p33ING1b wurde festgestellt, dass es die Promotoraktivitäten von Bax in wt p53 kolorektalen Karzinom-RKO-Zellen verstärken (110, 166). Außerdem war p33ING2 im Vergleich zu p33ING1b signifikant effektiver bei der Verstärkung dieser p53-Transaktivierung (165). Garkavtsev et al. demonstrierten vor kurzem, dass p29ING4 mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B co-immunpräzipitierte und die NF- κ B transkriptionale Aktivität abschwächte. p29ING4 schwächte die Expression verschiedener angiogener Faktoren, darunter die Interleukine IL-6 und IL-8, die Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2 und den Kolonie stimulierenden Faktor 2 ab, wodurch die Angiogenese von Hirntumoren in Mäusen inhibiert wurde (73). Die Autoren zeigten auf, dass p29ING4 direkt mit den transkriptionalen Aktivitäten von NF- κ B im Gelmobilitätsschicht-Assay assoziiert war und diese unterdrückt. Außerdem regulierte p29ING4 die Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) negativ.

1.2.2.5. Biologische Aktionen der ING-Proteine

Die ING-Familienmitglieder sind in verschiedene biologische Funktionen involviert, besitzen aber keine bekannte enzymatische Aktivität. Man kann daher annehmen, dass die ING-Proteine agieren, indem sie spezifische Protein-Protein-, möglicherweise auch Protein-DNA- und sogar Protein-Phospholipid-Interaktionen ermöglichen. Einige dieser Interaktionen wurden als wesentlich für ihre tumorsuppressiven Eigenschaften erachtet. Mit Ausnahme des p47ING1a und vielleicht p47ING3 interagieren alle anderen Familienmitglieder mit posttranslationalen Modifikationen, die das p53 Tumorsuppressor-Protein aktivieren oder dieses fördern. Diese Interaktionen resultierten in einer veränderten subzellulären Verteilung des p33ING2-Suppressors, veränderten p53-Interaktionen und einer zellulären Empfänglichkeit, der Apoptose zu unterliegen. Schließlich sind die ING-Mitglieder unterschiedlich mit HAT- und HDAC-Komponenten assoziiert. Diese Chromatin-regulativen Interaktionen sind für die ING-

vermittelte transkriptionale Regulation, die Apoptose und wahrscheinlich die DNA-Reparatur von grundlegender Bedeutung.

1.2.2.6. Abhängigkeit der p53-Antwort

Zwei Hauptmechanismen helfen möglicherweise bei der Erklärung, wie ING-Proteine die p53-Antwort verstärken: die Assoziation von ING-Mitgliedern mit p53 und die ING-vermittelte Acetylierung von p53. Leung et al. p33ING1b steht daher im Wettbewerb mit MDM2 um die Bindung an p53 (82). In Experimenten mit Cycloheximid zur Blockierung der *de novo* Proteinsynthese erhöhte die Überexpression von p33ING1b die Halbwertszeit von p53. Während die MDM2-Expression die Stabilität von p53 reduzierte, wurde diese Reduktion durch p33ING1b dosisabhängig außer Kraft gesetzt (133). Von Bedeutung ist, dass MDM2 und p33ING1b gegenseitig um denselben p53-Bindungsort in Wettbewerb stehen. Beide Proteine scheinen an die N-terminale Transaktivierungsdomäne von p53 zu binden. Auch wenn bestimmte ING-Proteine physikalisch nicht mit p53 assoziieren, so modulieren sie doch möglicherweise die p53-Aktivität durch die Verstärkung der Proteinstabilität (165, 166). Posttranslationale Modifikationen wie die Acetylierung und die Phosphorylierung innerhalb der C-terminalen Region von p53 erleichtern, so nimmt man an, die Aktivierung und stimulieren die p53 sequenzspezifische DNA-Bindungsaktivität (84, 202). Die Verbindung von ING mit p53 und die ING-vermittelte Acetylierung von p53 präsentieren diverse Mechanismen, durch die die ING-Proteine p53 stabilisieren und die p53-zellulären Antworten auf genotoxischen Stress und apoptotische Stimuli verstärken (82, 110, 150, 165, 166, 217).

1.2.2.7. Bedeutung der ING-Gene in humanen Malignomen

Verschiedene Berichte zeigen seltene Genveränderungen, aber eine vorherrschende Herunterregulierung der ING1-Genexpression in verschiedenen humanen Malignomen (34, 55, 175). Eine Übersicht aller berichteten ING1-Genmutationen ist in Tabelle 1.5. dargestellt.

Tabelle 1.5. Zusammenfassung der veränderten ING-Expressionswerte und Genemutationen in humanen Malignomen

Gene	Tumortypen	Expression			Mutation* (%)	Literatur- quelle
		↓ oder ↑	Rate (%)	Methode		
ING1	Basalzellkarzinom	↑	25,0	IHC	1,9	(28)
	Blasenkrebs	↓a	ND	IHC	ND	(203)
	Hirntumor	↓a	100	RT-PCR; WB.; ISH; IHC	3,4	(259)
	Hirntumor	↓	ND	RT-PCR	0,0	(233)
	Hirntumorzelllinien	↑	800	RT-PCR	ND	(234)
	Mammakarzinom	↓	43,8	RT-PCR; ISH; WB	0,3	(246)
	Mammakarzinom	↓	70,8	Q-PCR	ND	(242)
	Mammakarzinom	↓a	0,2	IHC	ND	(175)
	Mammakarzinomzelllinien	↓	100	RT-PCR; WB	0,0	(246)
	Kolorektales Karzinom	ND	ND	ND	0,0	(205)
	Ösophaguskarzinom	↓	54,8	RT-PCR	12,9	(31)
	Cardiakarzinom	↓	63,2	RT-PCR	5,3	(90)
	Gastrointestinale Tumoren	↓	75,0	RT-PCR	ND	(181)
	Gastrointestinale Karzinomzelllinien	ND	ND	ND	8,3	(181)
	Larynxkarzinom	ND	ND	ND	13,0	(85)
	Larynxkarzinom	ND	ND	ND	0,0	(204)
	Hämatologische Malignität	NC	ND	QC-PCR	0,0	(20)
	Hepatokarzinom	↓a	54,7	IHC	ND	(179)
	Lymphoblastische Leukämie	↓	76,5	IHC	ND	(177)
	Lymphatische Tumorzelllinien	↓	56,3	RT-PCR	0,0	(180)
	Malignes Melanom	↑↓b	80,0/47,5	IHC	ND	(176)
	Malignes Melanom	ND	ND	IHC	19,6	(26)
	Melanomzelllinien	↑	100	WB	ND	(115)
	Melanomzelllinien	↑	100	WB; RT-PCR	7,1	(25)
	Myeloide Leukämie	ND	ND	ND	0,0	(104)
	Bronchialkarzinom (NSCC)	↓	42,0	Q-PCR	0,0	(109)
	Mundbodenkarzinom	↑	93,0	RT-PCR	ND	(95)
	Mundbodenkarzinom	ND	ND	ND	0,0	(124)
	Ovarialtumor	ND	ND	ND	0,0	(246)
	ING2	Verschiedenen Tumorzelllinien	↓	41,7	WB	ND
ING3	Larynxkarzinom	↓↑	50,0/12,5	Q-RT-PCR	2,0	(86)
ING4	Glialtumor	↓a	100	RT-PCR	ND	(73)

* Mutationsraten beinhalten somatische Missense- und Nonsense-Mutationen.

a Mit fortschreitenden klinischen Stadien assoziiert.

b Erhöhte zytoplasmatische Expression bei 80% und verringerte nukleäre Expression bei 47% der Melanomfälle.

IHC, Immunhistochemie; WB, Western Blot; RT-PCR, Reverse Transcriptase Polymerase Kettenreaktion; ISH, *in situ* Hybridisierung; ND, nicht bestimmt; NC, keine Veränderung.

Autoren aktueller Studien sehen im Verlust der ING-Expression eine Erklärung für die Tumorprogression. ING1 wurde in Frühstadien sowie in invasiven Blasen Tumoren differenziell exprimiert. Ähnlich wie bei Hirntumoren wurde eine ING1-Expression im normalen Urothel und den meisten transitionalen Blasenkarzinomen entdeckt, war aber bei fortschreitender Tumorprogression weniger offensichtlich. Interessanterweise war die p33ING1b-Expression signifikant mit dem Überleben der Patienten assoziiert, da Patienten mit einer höheren p33ING1b-Expression eine schlechtere Entwicklung durchliefen als diejenigen, die nur geringe p33ING1b-Werte exprimierten (203).

Verschiedene Faktoren können zu einer Chemotherapieresistenz führen. Dieses kann von der Annahme des Medikaments in die Zelle bis hin zu intrazellulären Resistenzmechanismen, die eine Interaktion des Medikaments mit der DNA verhindern (218). Studien demonstrieren, dass chronische DNA-Läsionen, die durch Antitumor-Medikamente induziert wurden, direkt mit der Zytotoxizität korrelieren (52, 69, 218, 255). Die Verringerung des Ausmaßes der DNA-Schädigung durch DNA-Reparaturfaktoren wurde als Mechanismus geschildert. Tatsächlich korrelieren erhöhte DNA-Reparaturwerte oft mit einer Inhibition der medikamenten-induzierten Zytotoxizität in verschiedenen kultivierten Malignomen (218). Die Inhibition bestimmter DNA-Reparaturproteine erhöht außerdem die Radiosensitivität bestimmter kultivierter Tumorzellen (37, 180, 218). Es erscheint daher plausibel, dass der Verlust von ING Proteinen in frühen Stadien mit einer Progression des Tumors einhergeht, dass aber hohe ING Proteinwerte Chemo- und Radiotherapien möglicherweise beeinträchtigen. Dieser Gedanke deckt sich mit einem Bericht, der aufzeigt, dass der Verlust der p33ING1b nukleären Expression mit einer günstigeren Prognose für eine akute lymphoblastische Leukämie im Kindesalter einhergeht (177). Auch wenn die Chemoresistenz ein Konzept mit vielen Faktoren ist, so könnte doch eine weitere Auswertung des ING-prognostischen Werts und der vorhergesagten Chemoresistenz bei Tumorerkrankungen zur Erklärung der berichteten Korrelation höherer ING-Werte bei Patienten mit einer schlechteren Prognose beitragen.

Vorangegangene Berichte haben den Verlust der nukleären Lokalisation und eine erhöhte zytoplasmische Lokalisation von p33ING1b in bestimmten Malignomen demonstriert (26, 174, 176, 177). In Übereinstimmung mit einer nukleären Lokalisationssequenz (NLS) (55) stellte man fest, dass das p33ING1b Protein hauptsächlich im Nukleus lokalisiert ist (71, 82, 209).

Trotz einer aktuellen Studie, aus der hervorgeht, dass die ING4-Expression in Gliomen in Korrelation mit dem Ausmaß der Tumorprogression von hohen zu niedrigen Stadien reduziert ist (73), so sind doch bisher keine Studien durchgeführt worden, die die Expressionswerte des p29ING4 Proteins in verschiedenen Organen und in normalen und kanzerösen zellulären Stadien untersuchten. Eine solche Studie wird zusammen mit den Mutationsstatus-Analysen ein noch größeres Verständnis der funktionalen Bedeutung dieser ING-Familiengene ermöglichen.

Gegenwärtig werden vermehrte Anstrengungen unternommen, Gentherapien gegen Tumore zu entwickeln, die auf p53 basieren. Wenn p33ING1 für die effektive Aktion von p53 von grundsätzlicher Bedeutung ist, ist möglicherweise der Status von p33ING1 in jedem Tumor mit zu bestimmen, bevor die Patienten mit einer solchen Therapie behandelt werden. Man kann schon jetzt davon ausgehen, dass ING1 in einigen Mundbodenkarzinomen deletiert wird, die in Zukunft das erste Ziel für klinische Tests sein werden (10). Dringend benötigt wird dazu eine umfassende Einschätzung der Veränderungen von p33ING1 im Humantumor – sowohl auf der Gen- als auch Proteinebene. Werden Veränderungen in einem signifikanten Umfang festgestellt, könnte p33ING1 wie p53 ein wichtiges Thema in der biomedizinischen Forschung werden.

Mit Ausnahme von p47ING1a, agieren ING-Proteine mit p53, um die Stimulation von p21Waf1 zu fördern, was zu einer verringerten Phosphorylierung von Rubidium (Rb), einer Transkriptionsfaktor-E2F-Sequestration und einem G_1/G_0 Zellzyklus-Stillstand führt. p33ING1b ermöglicht weiterhin einen G2/M Zellzyklus-Stillstand durch die Unterdrückung der Expression von Cyclin B1, das für den mitotischen Ausbruch erforderlich ist. ING-Proteine können auch das pro-apoptotische Bcl-2 Mitglied Bax stimulieren, um die Apoptose zu fördern und mit verschiedenen DNA-Reparaturfaktoren zu interagieren.

1.3. Das Immunsystem

Das Immunsystem dient dazu, den menschlichen Körper vor Krankheitserregern zu schützen. Man unterscheidet zwischen einer angeborenen und einer erworbenen Immunantwort. In der frühen Phase nach einer Infektion reagiert der Organismus durch natürliche Immunabwehrmechanismen auf unspezifische Reize wie bakterielle Lipopolysaccharide, um pathogene Substanzen zu eliminieren. In einer späteren Phase nach der Infektion, der adaptiven

Immunantwort, entwickeln sich spezifisch gerichtete Lymphozyten. Nach erfolgreicher Abwehr der Infektion bleiben die so genannten Gedächtnis- (*Memory*-) Zellen übrig. Sie bilden das immunologische Gedächtnis. Dieses dient dazu, bei erneuter Infektion mit dem gleichen Erreger mit einer schnellen, spezifischen Antwort zu reagieren.

Bei der adaptiven Immunität wird zwischen der humoralen, von B-Lymphozyten vermittelten, und der zellulären, von T-Lymphozyten vermittelten Immunantwort unterschieden. Unter einer humoralen Immunität wird die Ausschüttung von pathogenspezifischen Antikörpern durch B-Lymphozyten verstanden. Diese können an die Pathogene binden, um diese damit unschädlich zu machen oder aber für Makrophagen zu markieren, damit sie phagozytiert werden können. Bei einer zellulären Immunantwort erkennen T-Lymphozyten direkt infizierte Zellen. Dabei wird zwischen zytotoxischen CD8+ T-Zellen und CD4+ T-Helfer Zellen unterschieden.

1.3.1. T-Zell-vermittelte Immunität

Vorläuferzellen der T-Zellen wandern aus dem Knochenmark in den Thymus, um dort auszureifen. Dazu müssen sie im Thymus zuerst eine positive Selektion, d.h. eine Bindungsfähigkeit an körpereigene, für die Präsentation von Antigenen zuständigen Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC Komplexen), durchlaufen. Im Anschluss folgt eine negative Selektion. Dabei werden die Zellen mit körpereigenen Proteinfragmenten über MHC konfrontiert. Zeigen sie für keine der körpereigenen Substanzen eine hohe Bindungsaffinität, werden sie als naive Zellen aus dem Thymus entlassen. Diese naiven T-Zellen zirkulieren durch periphere lymphatische Organe auf der Suche nach dem für sie spezifischen Antigen. In diesen peripheren lymphatischen Organen wird, wenn das entsprechende Antigen vorliegt, eine Immunantwort ausgelöst.

Zwei Hauptklassen von T-Zellen werden auf Grund ihrer verschiedenen Effektorfunktionen unterschieden. Zytotoxische CD8+ T-Zellen (CTL) töten Zielzellen, die Pathogene in ihrem Inneren tragen. CD4+ T-Helfer Zellen (Th-Zellen) aktivieren andere Leukozyten und lösen so eine Immunantwort aus. Bei den Th-Zellen unterscheidet man zwischen Th1-Zellen, die Makrophagen zur Eliminierung der von den Makrophagen selbst phagozytierten Pathogene stimulieren und Th2-Zellen, die B-Zellen zur Proliferation und zur Sezernierung von Antikörpern aktivieren.

1.3.2. Antigenerkennung von T-Zellen

Die Antigenerkennung während einer adaptiven Immunantwort setzt sich zusammen aus der spezifischen Erkennung des Antigens durch einen Rezeptor auf der Oberfläche von T-Zellen (TCR) und der Präsentation des Antigens über den MHC Komplex auf den antigen-präsentierenden Zellen (APC).

Es existieren in jedem Menschen bis zu 10¹⁸ verschiedene TCR, wodurch fast alle Peptide, die durch den Abbau eines beliebigen Proteins aus einem beliebigen Pathogen entstehen, erkannt werden können. Der TCR besteht aus einer α - und einer β -Kette, die sich jeweils aus einer konstanten und einer variablen Region zusammensetzen. Die enorme Vielfalt entsteht dadurch, dass die variable Region jeder Kette aus unterschiedlich kombinierten Segmenten zusammengesetzt wird. Jede variable Region trägt im Zentrum eine hypervariable Region, in der Punktmutationen die Zahl an möglichen TCR Spezifitäten noch erhöhen. Die Präsentation der Antigene erfolgt über membrangebundene Glykoproteine, so genannte MHC-Komplexe. Pathogene können im Inneren der Zelle in verschiedenen Kompartimenten vorliegen. So befinden sich Proteine viralen Ursprungs in der Regel im Zytosol, Pathogene wie Bakterien werden z.B. über Phagozytose von Makrophagen aufgenommen und befinden sich dadurch in Vesikeln innerhalb der Zelle. Es gibt zwei unterschiedliche MHC Komplexe: MHC-I und MHC-II. Sie unterscheiden sich durch die Herkunft der Peptide, mit denen sie beladen werden, und dem T Zelltyp, der sie erkennt.

Jeder Mensch besitzt pro Komplex zwei Allele, je eines vom Vater und der Mutter. Für manche humane MHC Komplexe sind mehr als 400 verschiedene Allele bekannt. Proteine, die im Zytosol der Zelle synthetisiert werden, werden von Proteasomen in Peptide geschnitten und über den *transporter associated with antigen processing* (TAP) in das endoplasmatische Retikulum (ER) gebracht. Dort werden sie in die Peptidtasche der MHC-I Komplexe gebunden und der Peptid-MHC Komplex wird an die Zelloberfläche gebracht. Bestimmte Allele des MHC-I werden als *human leukocyte antigen-A* (HLA-A) Typus bezeichnet. In der menschlichen Bevölkerung gibt es etwa 200 verschiedene HLA-A Allele. Dabei tragen etwa 40% der mitteleuropäischen Bevölkerung den HLA-A201 Locus als eines ihrer Allele. MHC-I Komplexe werden spezifisch von CD8+ T-Zellen über den entsprechenden TCR erkannt.

Proteine, die sich in Vesikeln innerhalb der Zellen befinden, oder von außen z.B. über Phagozytose in diese hineingelangen, werden von Proteasen in Peptide geschnitten. Die Peptide enthaltenden Vesikel fusionieren mit Vesikeln, die MHC-II Komplexe enthalten. Die Peptide binden an die Peptidbindungstasche des MHC-II Komplexes und dieser wird dann an der Zelloberfläche dem Immunsystem präsentiert. Die MHC-II Komplexe werden von CD4+ T-Zellen und deren spezifischem TCR erkannt.

Erkennt eine T Zelle auf einer Zelle im Körper den für ihren TCR entsprechenden MHC Peptid-Komplex, so kann diese Zelle je nach Spezifität verschieden reagieren. CD4+ Th Zellen aktivieren zytotoxische T-Zellen, B Zellen und Makrophagen. CD8+ T-Zellen schütten bei Aktivierung Interferon- γ (IFN- γ) aus, das u.a. die Reifung von T-Zellen fördert und ihre Proliferation unterstützt. Sie können auch direkt über eine Ausschüttung von Perforin oder Granzym die antigenträgende Zelle lysieren. Diese direkte lytische Funktion der CD8+T-Zellen kann man sich für Immuntherapien bei Krebserkrankungen zunutze machen, indem versucht wird, tumorspezifische CD8+ T-Zellen zu aktivieren.

1.3.3. Primäre Aktivierung von T-Zellen

Die meisten Zellen des Körpers besitzen auf ihrer Zelloberfläche MHC Komplexe, die mit Abbauprodukten von Proteinen aus dem Zellinneren beladen werden und somit Antigen präsentieren können. Eine primäre Aktivierung von T-Zellen ist jedoch nur möglich, wenn die naiven T-Zellen ihr Antigen auf einer professionellen APC, einer dendritischen Zelle (DC), erkennen und durch zusätzliche kostimulatorische Signale, wie z.B. die *Cluster of Differentiation* (CD40, CD80 und CD86) aktiviert werden. Die naive T Zelle beginnt zu proliferieren und bildet einen für ihr Antigen spezifischen Klon. Diese Effektor T-Zellen bekämpfen das für sie spezifische Pathogen. Ist die Infektion vorüber, überleben wenige dieser T-Zellen als *Memory* T-Zellen. Besitzt die Zelle, die der naiven T-Zelle das entsprechende Antigen präsentiert, keine kostimulatorischen Signale, stirbt die T-Zelle ab oder wird anergisch, d.h. inaktiv. Die primäre Aktivierung der naiven T-Zellen findet vor allem in den peripheren lymphatischen Organen statt. Bei einer Infektion nehmen DC Antigene in der Peripherie auf und wandern in die peripheren lymphatischen Organe und können dort eine adaptive Immunantwort induzieren. Es wurde gezeigt, dass auch im Knochenmark eine primäre Aktivierung naiver Zellen möglich ist (57).

1.3.4. *Memory* T-Zellen

Memory T-Zellen bilden das immunologische Gedächtnis und sind charakteristisch für die adaptive Immunantwort. Sie überleben nach einer erfolgreichen Bekämpfung einer Infektion und können bei einer erneuten Stimulation über ihren TCR ohne zusätzliche Kostimulation und bei einer sehr geringen Antigenpräsenz proliferieren und somit schnell und effektiv ein Pathogen, das wiederholt auftritt, bekämpfen (274, 275). Diese *Memory* T-Zellen können nicht nur durch eine Infektion mit Pathogenen, sondern auch durch die Existenz eines Tumors spontan entstehen (56).

1.3.5. Tumor-Immuninteraktionen

In einem wachsenden Tumor verändern sich die Zellen entsprechend einem „Evolutiondruck“, den unter anderem das Immunsystem ausübt. So versucht der Tumor z.B. mittels fehlender oder verringerter Expression von MHC Komplexen, fehlender Adhäsionsmoleküle oder eines auf Immunzellen inaktivierend wirkenden Zytokinmilieus, vom Immunsystem unerkannt zu bleiben. Dennoch gibt es im Körper tumorspezifische Zellen, die, wenn sie die negativen inhibitorischen Einflüsse des Tumors überwinden, Tumorzellen beseitigen können.

Spezifische T-Zellen für tumor-assoziierte Antigene (TAA), die keine genetischen oder posttranslationalen Veränderungen aufweisen, entkommen der negativen Selektion im Thymus, wenn sie nur eine schwache Bindungsfähigkeit für den entsprechenden MHC-Antigen Komplex aufweisen. Derartige TAA sind daher in der Regel nur schwach immunogen. Werden die T-Zellen, die eine Spezifität für ein auch in gesundem Gewebe exprimiertes TAA aufweisen, *ex vivo* oder über DC mit dem entsprechenden Antigen *in vivo* aktiviert, sind sie trotz der geringen Bindungsaffinität an das TAA Epitop in der Lage, Tumorzellen, die dieses Epitop tragen, zu eliminieren. Es konnte gezeigt werden, dass sich im Knochenmark von Patienten mehr tumorspezifische T-Zellen befinden als im peripheren Blut. Dies kann eventuell dadurch erklärt werden, dass sich bei Tumorpatienten oftmals aus dem Tumor abgewanderte Zellen im Knochenmark befinden. Diese können allerdings einen vom Immunsystem kontrollierten Ruhezustand oder „*dormancy state*“ aufweisen (56, 58). Da eine primäre Aktivierung von naiven T-Zellen auch im Knochenmark ablaufen kann, können hier tumorspezifische Effektor- und *Memory* T-Zellen entstehen.

1.4. Ziel der vorliegenden Arbeit

In der begrenzten Wirksamkeit chemo- und strahlentherapeutischer Interventionen zur Behandlung der Mehrzahl solider, menschlicher Tumore liegt der Bedarf zur Entwicklung komplementärer Behandlungsstrategien begründet. Die Identifizierung tumorspezifischer immunogener Antigene führte dazu, dass die Immuntherapie eine zentrale Rolle in der Entwicklung innovativer biotherapeutischer Behandlungskonzepte erhielt. Leider konnten aber bisher weder unspezifisch-immunmodulierende noch spezifische Ansätze die in die Immuntherapie gesetzten Erwartungen im klinischen Alltag erfüllen.

Das Konzept der therapeutischen Vakzinierung zur Tumorbehandlung hat zum Ziel, im kranken Organismus effiziente zytotoxische Immunantworten gegen Tumorzellen zu entwickeln. Molekularer Angriffspunkt sind Peptide, die sich von tumorassoziierten Antigenen ableiten und im Kontext mit MHC Klasse I-Molekülen präsentiert werden. Der Focus der meisten bisherigen Arbeiten war auf die Tumorzelle selbst gerichtet. Aufgrund ihrer Heterogenität und genetischen Instabilität stellen Tumorzellen für die Immuntherapie ein schwer zugängliches Ziel dar.

Ein maligner Tumor stellt nicht nur eine Ansammlung genetisch, phänotypisch und funktionell pathologisch veränderter Zellen dar, sondern ist ein komplexes Gewebe, dessen zelluläre und strukturelle Komponenten miteinander in Kommunikation stehen und sich gegenseitig beeinflussen. Tumor-infiltrierende Lymphozyten bilden mit ortständigen Zellen das Mikromilieu eines soliden Tumors. Die für Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung entscheidenden Vorgänge, wie Stromareaktion, Angiogenese und Ab- und Umbau extrazellulärer Matrix werden nicht nur durch die Tumorzellen selbst, sondern auch durch infiltrierende Entzündungszellen gesteuert.

In den letzten Jahren wurde deutlich, dass das Mikromilieu des Tumors immunologisch nicht inert ist, sondern wesentlich an der Modulation zellulärer Immunantworten beteiligt ist. Dabei wurden sowohl direkte als auch indirekte Mechanismen der Immunmodulation identifiziert. Erstere führen zu einer Inaktivierung bereits formierter zytotoxischer Zellen, letztere mittelbar über regulatorische immunkompetente Zellen zur Induktion einer Toleranz. Diese Mechanismen der peripheren Toleranzinduktion sind aber nicht Tumoren vorbehalten, sondern finden sich physiologisch in vielen Geweben. Unter Berücksichtigung dieser immunmodulierenden Wirkungen des Mikromilieus scheint es selbstverständlich, dass die

Evaluation gegen Tumore gerichteter Immunantworten im Tumor, also *in situ*, erfolgen sollte. Dies konnte aufgrund technischer Limitationen bisher nur unzureichend berücksichtigt werden. Ziel dieser Arbeit war nun, die Bedeutung von *in situ* ablaufenden Immunreaktionen sowie deren Interaktionen und Modulation durch das Tumormikromilieu zu untersuchen. Mittels innovativer zellulärer und molekularer Verfahren sollte ein Gesamtbild der immunologisch relevanten Prozesse im Tumor erarbeitet werden. Diese Erkenntnisse sollten es ermöglichen, die Effizienz immunologischer Tumorthapien zu erhöhen. Darüber hinaus sollten Voraussetzungen geschaffen werden, um spezifische Immuntherapien, welche sich gegen das Tumormikromilieu selbst richten, durchzuführen.

Die auf zelluläre Immunantworten zurückgreifende Therapie neoplastischer Erkrankungen beruht auf der Identifizierung immunogener Ziele sowie der Charakterisierung jener immunkompetenten Zellen, welche die Zerstörung der Tumoren direkt oder indirekt bewirken. Geeignete Ziele für eine Tumolvakzine 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.

Im letzten Jahrzehnt wurde nicht nur eine wachsende Anzahl von Antigenen auf menschlichen Tumorzellen identifiziert, sondern es konnten auch spezifische zelluläre Immunantworten gegen jene Antigene in Patienten, die an den entsprechenden Tumoren litten, induziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass für MAGE-6 und EphA2 Antigene, die im Nierezellkarzinom exprimiert werden, spezifische CD4+ und CD8+ T-Zellen im peripheren Blut gefunden werden und bei Patienten Th1/Tc1 Antworten vermitteln können (236).

Studien der ING Gene zeigten auf, dass diese in verschiedene zellbiologische Mechanismen involviert sind, darunter den Stillstand des Zellzyklus, die Regulation der Gentranskription, die Reparatur der DNA und die Apoptose. Die biochemischen Funktionen der ING-Proteine als Histon-Acetyltransferasen und Histon-Deacetylasen Co-Faktoren binden diese neue Tumorsuppressorfamilie an die Regulation der Transkription, Zellzyklus-Checkpoints, DNA-Reparatur und die Apoptose. Unklar ist bislang ob Mitglieder der ING-Tumorsuppressorfamilie möglicherweise gewebespezifische bzw. stadienspezifische TAAs darstellen. Dieses wurde in der vorliegenden Arbeit am Beispiel des Nierenzellkarzinoms untersucht. Darüber hinaus war es ein Ziel dieser Arbeit, die Rolle der ING-Familie p33ING1b und p29ING4 auf ihre

Antigenaktivität am Beispiel des Nierenzellkarzinoms zu untersuchen. Verschiedene Berichte zeigen seltene Genveränderungen, aber eine vorherrschende Herunterregulierung der ING1-Genexpression in verschiedenen humanen Malignomen. Daneben finden sich Berichte über eine Überexpression des ING1-Gens in humanen Melanomen und in Astrocytomen (WHO Grad I und II). Die Expression des ING4 Gens in verschiedenen Melanomen wurde noch unzureichend untersucht.

Das Nierenzellkarzinom stellt eine Tumorentität dar, die durch eine relativ hohe Frequenz an spontanen Remissionen charakterisiert ist (184). Häufig wird das Nierenzellkarzinom von einer großen Anzahl mononukleärer Zellen, einschließlich T-Zellen, infiltriert (60, 161, 269). Die Eigenschaften dieser tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) sind jedoch so stark beeinträchtigt, dass sowohl ihre Proliferation als auch ihre Zytotoxizität inhibiert ist (5). Darüber hinaus wird auch eine Einleitung der Apoptose von *in vitro* aktivierten T-Zellen in Form eines *activation induced cell death* (AICD) beobachtet (184). Infolgedessen bleibt die Induktion einer zellulären, inflammatorischen Th1-Immunantwort in der Tumordinvasionsfront aus (155). Trotzdem werden unter den TILs in Nierenzellkarzinomen eine große Anzahl aktivierter CD3+ T-Zellen beobachtet, die selektiv durch immunsupprimierende Zytokine gehemmt werden. Diese werden von den Tumorzellen in das umgebende Milieu sezerniert (6).

Parallel dazu wurden in vergleichenden immunhistochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen von Nierenzellkarzinomen sowohl inter- als auch intratumorale Expressionsveränderungen von Komponenten der Antigenprozessierung und -präsentation beschrieben. Davon betroffen sind die Untereinheiten des TAP-Peptidtransporters, die Proteasomenuntereinheiten LMP2, LMP7, MECL 1, die Chaperone Tapasin und Calretikulin und schließlich die Zelloberflächenexpression von HLA Klasse I-Molekülen (212). Außerdem wurde auch eine veränderte Proteinexpression nichtklassischer HLA-G-Moleküle für das Nierenzellkarzinom *in situ* beschrieben (97).

Die Unfähigkeit der TILs eines Nierenzellkarzinoms, eine effektive Antitumorzytotoxizität *in vivo* zu generieren, könnte die Folge eines Defektes an der Seite der durch CTLs vermittelten Immunantwort sein. Es wurden einige Mechanismen vermutet, die die Vernichtung der Tumorzellen durch das Immunsystem verhindern. Folgende Mechanismen wurden dazu beschrieben: (a) eine Immunsuppression durch die Zytokinsekretion von Tumorzellen (230); (b) die Expression von *Death Factor* Molekülen wie Fas Ligand; (c) eine reduzierte Expression

von MHC und costimulatorischer Moleküle an der Oberfläche von Tumorzellen (106, 245) und (d) eine defekte Signaltransduktion in TILs, darunter auch eine veränderte IL-2/IL-2R Signaltransduktion, die die Aktivierung und Proliferation von TILs hemmt (65).

Obwohl die Existenz einer zellulären Immunantwort gegen solide Tumoren unbestritten ist, konnten die Abläufe *in vivo* beim Menschen bisher nur unvollständig aufgeklärt werden. Die Analyse peripherer Blutlymphozyten gibt nur einen geringen Aufschluss über die *in situ* ablaufenden Vorgänge der Initiierung und Aufrechterhaltung tumorspezifischer Immunreaktionen. Deshalb wurde in dieser Arbeit auf der Basis kürzlich entwickelter Methoden zur *ex vivo* und *in situ* Charakterisierung tumorspezifischer T-Lymphozyten am Modell des Nierenzellkarzinoms die Frage bearbeitet, welche Rolle den TILs für das *Priming* und den Erhalt einer tumorspezifischen T-Zellantwort zukommt. Die vergleichende Analyse von TILs im Primärtumor und peripheren Blutlymphozyten könnte die Frage des *Homing*-Potentials tumorspezifischer T-Zellen weiter klären. Dieses erscheint von großer klinischer Relevanz im Hinblick auf tumorspezifische Vakzinierungstherapien.

Der Nachweis tumor-reaktiver T-Zellen im peripheren Blut mittels ELISPOT-Analysen und Färbungen mit Peptid/MHC-Klasse I Komplexen stellt derzeit den Standard für das Immunmonitoring von Tumorpatienten dar. Trotzdem wird die Relevanz dieses Kompartiments für die immunologischen Vorgänge im Tumor-Mikromilieu kontrovers diskutiert. Eigene Vorarbeiten zeigten die Präsenz und Persistenz von tumorreaktiven T-Zellen im Blut eines Tumorpatienten, ohne dass diese T-Zellen in gleichzeitig entnommenen Metastasen des Patienten zu detektieren waren.

In den vergangenen Jahren wurde in der eigenen Arbeitsgruppe die Präsenz von T-Zellen in mehreren, in Bezug auf Ort und Zeitpunkt der Exzision verschiedenen Metastasen demonstriert. Demzufolge sollten im Tumor vorhandene klonal expandierte T-Zellen über das Blut zirkulieren. Ob die Fähigkeit tumor-spezifischer T-Zellen, durch den Körper zu rezirkulieren, bereits nach initialer klonaler Expansion, bzw. nach sekundärer Expansion und Reifung nach Antigenkontakt im Tumor vorhanden ist, oder ob erst die therapeutische Intervention ein entsprechend geändertes Zirkulationsverhalten tumor-reaktiver T-Zellen bewirkt, lässt sich mit den bisherigen Ergebnissen nicht beantworten. Gegenstand dieser Arbeit war auch die Bearbeitung dieser Frage. Über eine detaillierte Charakterisierung zirkulierender tumor-reaktiver T-Zellen hinsichtlich ihres funktionellen Status und Vergleich mit dem von TILs wäre

es möglich, obige Hypothesen zu überprüfen. Zu diesem Zweck sollten antigen-spezifische T-Zellen mittels Peptid detektiert werden und bezüglich der Expression von Aktivierungsmarkern untersucht werden. Diese Charakterisierung erfolgte auf der Ebene von Zellen über eine *Real Time* PCR.

Darüber hinaus war es ein Ziel der vorliegenden Arbeit, die Verteilung verschiedener Lymphozytenpopulationen im peripheren Blut und im Tumorgewebe sowie das Zytokinprofil dieser Lymphozyten bei Patienten verschiedener Tumorstadien zu untersuchen. Insbesondere sollte die apoptotische Wirkung der Expression von TNF- α und TNFR I bzw. -II durch T-Lymphozyten im peripheren Blut und im Tumor stadienabhängig geklärt werden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es herauszufinden, in wie weit sowohl HLA Klasse Ia (HLA-A, -B, -C) und -II (HLA-DRB1, -B3, -B4, -B5) Moleküle als auch HLA-G Moleküle im Tumorgewebe und in PBLs stadienabhängig eine spezifische Expression beim Nierenzellkarzinom zeigen.

Ferner war der Status der p33ING1b- und p29ING4-Proteine im Nierenzellkarzinom verschiedener Stadien zu bestimmen. Ihre mögliche Rolle bei der Aktivierung der T-Zell-vermittelten Antitumor-Immunität und der Apoptose supprimierender T-Zellen wurde in dieser Arbeit überprüft.

In dieser Arbeit sollten p33ING1b- bzw. p29ING4-HLA-restringierte T-Zellen, die sich von onkogenen Proteinen der Tumorzellen ableiten, identifiziert werden. Dazu wurde hier eine Reihe von Methoden zur *ex vivo* und *in situ* Charakterisierung spezifischer zellulärer Immunantworten, wie der Peptid/MHC Klasse I-Doppelimmunfärbung individueller T-Zellen erarbeitet. Das Immunmonitoring dieser Studie umfasste dabei neben der Analyse des peripheren Blutes in ausgewählten Patienten mit einem Nierenzellkarzinom auch die Charakterisierung der Immunantworten *in situ*.