

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. J. Langner)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Immunphänotypisierung von tumorinfiltrierenden Lymphozyten
mittels Durchflusszytometrie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg

von Katrin Eisert
geboren am 21.01.1971 in Dresden
Betreuer Dr. med. habil. D. Riemann

Gutachter:

1. Frau PD Dr. D. Riemann
2. Prof. Dr. G. Metzner
3. PD Dr. D. Reinhold (Magdeburg)

eingereicht am: 08.10.2002

verteidigt am: 04.04.2003

urn:nbn:de:gbv:3-000005546

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005546>]

Referat

In dieser Arbeit wurden die phänotypischen Eigenschaften von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) aus frischen Gewebeproben von Patienten mit Tumoren unterschiedlicher Herkunft untersucht. Dabei galt die Suche prognostischen Zusammenhängen zwischen bestimmten Expressionsmustern von Oberflächenantigenen und der Überlebenszeit von Patienten mit nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) gesucht. Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit dem Vergleich phänotypischer Eigenschaften von TIL verschiedener maligner Primärtumoren und Metastasen.

Die gesamte Untersuchungsgruppe umfasste 303 Patienten mit Tumordiagnose (125 Lungen-, 116 Nierenzell-, 21 Magen-, 4 Mamma-, 10 Harnblasen-, 7 Ösophagus- und 5 Kolon-/Rektumkarzinome, 20 Lungenmetastasen, 5 Hirntumore), welche sich an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg einer chirurgischen Therapie unterzogen. Nach Gewinnung und Aufbereitung der frischen Tumorsektate erfolgten die Immunfluoreszenzfärbung mit einer Kombination aus Fluorescein (FITC)- und Phycoerythrin (PE)-markierten monoklonalen Antikörpern (mAK) und Analyse mittels Durchflusszytometer. Die resultierenden Daten wurden mit Hilfe univariater und multivariater Analysemodelle (Kaplan-Meier-Modell, Cox-Regressionsmodell, Allgemeines lineares Modell) statistisch ausgewertet.

Ein Zusammenhang zwischen der Überlebenswahrscheinlichkeit und der Höhe des Anteils der B-Zellen, T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) an den TIL konnte statistisch nicht nachgewiesen werden. Dies gilt ebenfalls für $CD4^+$, $CD8^+$, $HLA-DR^+$, $CD56^+$ und/oder $CD16^+$, $CD13^+$, $CD25^+$, $CD57^+$, $CD45RO^+$, $CD69^+$, $CD49a^+$ tumorinfiltrierende T-Zellen (TITL) sowie das Verhältnis $CD4^+/CD8^+$ TITL. Für Lungentumorpatienten war eine moderate Expression von $CD11b$, $CD26$ bzw. $CD54$ gegenüber einer geringen $CD11b^-$, $CD26^-$ bzw. $CD54^-$ -Expression mit einem signifikant geringeren Sterberisiko ($p < 0,05$) assoziiert. Im Ergebnis dieser Untersuchung ist es bisher nicht möglich, aus den hier in der Flowzytometrie gewonnenen Daten zum T-Zellphänotyp und zur lymphozytären Zusammensetzung eindeutige Aussagen zur Prognose der NSCLC-Patienten abzuleiten.

Es war nachzuweisen, dass die Expression der untersuchten Oberflächenantigene in den 125 Lungen- und 116 Nierenzellkarzinomen wesentlich von der Tumorentität abhängt. Die Faktoren Alter und Geschlecht der Patienten und der Tumorsubtyp zeigten hier eine geringe Relevanz. Metastasen und ihre Primärtumoren scheinen sich in ihrem TIL-Profil zu ähneln. Dies konnte am Beispiel der Lungenmetastasen von Nierenzellkarzinomen und primären Nierenzellkarzinomen, sowie Lungenmetastasen von Mammatumoren und primären Mammatumoren belegt werden. Bei der vergleichenden Gegenüberstellung der Magen-, Harnblasen-, Ösophagus-, Kolon-/Rektumkarzinome und Hirntumore ließen sich aus den phänotypischen Eigenschaften der TIL charakteristische Muster ableiten.

Eisert, Katrin: Immunphänotypisierung tumorinfiltrierender Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie. 80 Seiten, 2002

Halle/S., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät, Dissertation

Abstract

Tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) of different kinds of tumor were characterized with respect to their expression of cell surface molecules (immunophenotype). The aim of this study was to look for significant correlations between the patterns of surface molecules and the survival of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). Furthermore, we compared the immunophenotype of different primary tumors and/or metastases.

303 tumor probes resected at the Martin Luther University Halle-Wittenberg were investigated (125 lung cancers, 116 renal cell carcinomas, 21 tumors of the stomach, 4 of mamma, 10 of bladder, 7 of oesophagus, 5 of colon, 5 of brain, and 20 of lung metastases). After preparation of lymphocytes by density centrifugation, cells were stained with a combination of a fluorescein (FITC)- and a phycoerythrin (PE)-labeled monoclonal antibody specific for different surface molecules and analysed in a flow cytometer. The statistical analyses included uni- and multi-variate models (Kaplan-Meyer Method, Cox regression Model, General Linear Model).

We found no significant correlation between survival of lung cancer patients and the percentages of tumor-infiltrating B lymphocytes, T cells and natural killer (NK) cells. Similarly, no significant correlation could be found between survival and CD4+, CD8+, HLA-DR+, CD56+ and/or CD16+, CD13+, CD25+, CD57+, CD45RO+, CD69+, CD49a+ TIL or the ratio CD4+/CD8+ TIL. We found only an association with patients survival of the percentage of CD11b+/-, CD26+/- and CD54+ tumor infiltrating T cells (significant only in case of moderate expression). Summarizing our results, we cannot give a clear prediction for the patient's prognosis with the surface molecules investigated in this study.

Comparing TIL of renal cancer und lung cancer, we found several peculiarities of immunophenotype. Age and gender of patients as well as the histological subtype of a tumor had a smaller influence on the surface molecules of TIL. We found similarities between phenotype of metastases and the appropriate primary tumor. Last not least, specific patterns were described for the TIL's immunophenotype of tumors of stomach, bladder, oesophagus, colon and brain.

Keywords: tumor-infiltrating lymphocytes, immunphenotype, non-small cell lung cancer, flow cytometer

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	1
2. Einleitung und Problembehandlung	2
2.1. Tumorerkrankung und Immunkompetenz	3
2.1.1. Lymphozytenvermittelte Tumorabwehr	3
2.1.2. Funktionsassoziation der Oberflächenmoleküle auf Lymphozyten	5
2.2. Therapie und Prognose des Lungenkarzinoms	8
3. Material und Methoden	10
3.1. Patientenrekrutierung	10
3.2. Gewinnung und Präparation der TIL	10
3.3. Durchflusszytometrie	12
3.4. Statistische Analysen	15
3.4.1. Überlebensstatistik	15
3.4.2. Weitere vergleichende Analysemodelle	16
3.4.3. Grafische Darstellung der Ergebnisse als Boxplots	17
4. Ergebnisse	19
4.1. Überlebensanalyse bei Lungenkarzinomen	19
4.2. Vergleichende Aufbereitung von Tumorproben mit und ohne Kollagenase	29
4.3. Vergleiche des T-Zellphänotyps verschiedener Tumore	30
4.3.1. Primäre Lungen- und Nierenzellkarzinome	30
4.3.2. Sonstige Primärtumore und Lungenmetastasen	37
5. Diskussion	40
5.1. Epidemiologie der häufigsten Tumorerkrankungen	40
5.2. Genese und Immunologie der Tumoren	42
5.3. Prognostische Relevanz von Lymphozyteninfiltraten in Tumoren	44
5.3.1. Lymphozyteninfiltrate und Prognose von Lungentumorpatienten	44
5.3.2. T-Zellphänotyp und Prognose von Lungentumorpatienten	46
5.4. Gegenüberstellung von TIL-Phänotypen unterschiedlicher Tumore und Lungenmetastasen	52
5.5. Zusammenfassende Bewertung	56
6. Tabellen und grafische Darstellungen	58
7. Literaturverzeichnis	71
8. Thesen	80

1. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Ag	-	Antigen(e)
AIM	-	activation inducer molecule (CD69)
APC	-	antigenpräsentierende Zellen
CCR	-	Chemokinrezeptor
CD	-	Cluster of Differentiation
DP IV	-	Dipeptidylpeptidase IV (CD26)
GLM	-	Allgemeines Lineares Modell
GM-CSF	-	Granulozyten- Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
FITC	-	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	-	forward light scatter
HLA	-	Human Leucocyte Antigen
ICAM	-	interzelluläres Adhäsionsmolekül
Ig	-	Immunglobulin
IFN	-	Interferon
IL	-	Interleukin
LAG-3	-	Lymphozytenaktivierungsgen-3
LFA	-	Lymphozytenfunktions-assoziiertes Antigen
mAk	-	monoklonaler Antikörper
NCAM	-	neurales Zelladhäsionsmolekül (CD56)
MCP-1	-	Monozyten-chemotaktisches Protein-1
MHC	-	Major Histocompatibility Complex
NK-Zellen	-	natürliche Killerzellen
NSCLC	-	Non Small Cell Lung Cancer
PE	-	Phycoerythrin
PBS	-	phosphatgepufferte Saline
PBL	-	peripheral blood lymphocytes
RR	-	relatives Risiko
SCLC	-	Small Cell Lung Cancer
SD	-	Standardabweichung
SSC	-	side scatter
TCR	-	T-Zell-Rezeptor
TGF	-	transforming growth factor
TNF	-	Tumornekrosefaktor
TIL	-	tumorinfiltrierende Lymphozyten
TITL	-	tumorinfiltrierende T-Lymphozyten
VLA	-	very late activation antigen (CD49a)

2. Einleitung und Problembehandlung

Die moderne Medizin bedient sich verschiedener apparativer Diagnostikverfahren, mit deren Hilfe sie heute so erfolgreich wie nie zuvor in der Medizingeschichte Tumorerkrankungen nachweisen kann. Dieser Nachweis gelingt aufgrund der ständigen Weiterentwicklung der Medizintechnik und der diagnostischen Verfahrensweisen immer früher. Heute können viele Patienten einer Tumorthherapie zugeführt werden, bei denen man noch vor wenigen Jahren die Erkrankung erst in einem weit fortgeschrittenen Stadium oder postmortal festgestellt hätte.

Die etablierten Methoden der Tumorbehandlung hingegen haben ihr Spektrum mit nachgewiesener Wirksamkeit nicht wesentlich erweitern können. Die chirurgische Entfernung des Tumors bzw. seine Massenreduktion, Chemotherapie und Radiatio bilden auch heute noch die Hauptpfeiler in der modernen Tumorthherapie. Bezüglich ihrer Optimierung stoßen sie inzwischen auf Grenzen. Eine erfolgreiche Behandlung bedarf eines hohen Maßes an Radikalität, was den Allgemeinzustand des Patienten zusätzlich zu seiner Grunderkrankung negativ beeinflusst. Um das Therapieregime an der individuellen Situation des Patienten auszurichten und eine therapiebegleitende iatrogene Beeinträchtigung des Patienten auf ein Minimum zu reduzieren, sind prognostische Informationen von großer Bedeutung. Die Suche gilt dabei biologischen Parametern, die unabhängig von pathologischen und histologischen Daten zuverlässige Informationen über den Krankheitsverlauf geben, den Behandlungserfolg widerspiegeln und neue therapeutische Ansatzpunkte bieten. Immunologische Methoden tragen wesentlich zur Aufdeckung der Tumorcharakteristika im Zusammenhang mit der Abwehrlage des Patienten bei. Ein Ziel unserer Untersuchung war es, durch eine Lymphozytenphäotypisierung möglicherweise Aussagen über die Immunkompetenz des Patienten zu treffen, um die so gewonnenen Erkenntnisse in die Therapieentscheidungen mit einfließen zu lassen.

Wir untersuchten Material aus 303 resezierten Tumoren und Metastasen. Unter Nutzung verschiedener in der immunologischen Praxis etablierter mAk erfolgte über die Durchflusszytometrie eine Charakterisierung der TIL. Ergebnisse vergangener Studien legten die Vermutung nahe, starke oder unter Umständen sogar signifikante Unterschiede in der Präsenz einzelner Lymphozytenpopulationen bei verschiedenen Tumorentitäten zu finden (11, 24, 25, 34, 120). Versteht man die Ergebnisse als Momentaufnahme des Immungeschehens innerhalb des Tumors zum Zeitpunkt seiner chirurgischen Entfernung, so lässt die Analyse der Überlebenszeiten der Tumorkranken unter Berücksichtigung der histologischen Untersuchungsergebnisse eventuell eine Einschätzung der Immunkompetenz der Patienten zu. Dies könnte einer Prognoseabschätzung dienlich sein und möglicherweise Ansatzpunkte künftiger immunologischer Therapieverfahren aufzeigen. Unter diesen Gesichtspunkten untersuchten wir das Tumormaterial von 119 Patienten mit Lungenkarzinomen und betrachteten deren Überlebenszeiten in Assoziation mit den vorgefundenen immunhistologischen Tumorcharakteristika. Würden sich zusätzlich Zusammenhänge mit den im Tumor befindlichen Lymphozyten nachweisen lassen? Können quantitative Analysen der einzelnen Lymphozytensubpopulationen

Aussagen zur Prognose und der Effizienz der zellulären Tumorabwehr treffen, und decken sich diese mit den Prognoseabschätzungen, die nach bisher üblichen statistischen Verfahren anhand der TNM-Klassifikation vorgenommen werden?

2.1. Tumorerkrankung und Immunkompetenz

Die meisten Tumoren induzieren Reaktionen des Immunsystems auf zellulärer und/oder humoraler Ebene. Die ausgelösten Abwehrmechanismen im Wirtsorganismus zielen auf die Eliminierung der entarteten, mit Neoantigenen ausgestatteten Zellen. Das zunehmende Verständnis dieser komplexen immunologischen Vorgänge bietet ein großes Potential für neue Strategien einer effizienteren Tumorbehandlung. Erste Erfolge in der Immuntherapie bestimmter Tumoren (z. B. Melanom, kolorektales Karzinom) sind bisher nur unzureichend bei anderen Tumoren reproduzierbar. Die Ursachen für abweichende Therapieergebnisse müssen in spezifischen Tumormerkmalen aber auch der individuell unterschiedlichen Immunkompetenz des betroffenen Patienten vermutet werden. Begreift man die Immunkompetenz eines Patienten vereinfacht als die Fähigkeit zur Erkennung und Bekämpfung eines Tumors, so muss bei der Etablierung eines Tumors zumindest eine der Komponenten versagt haben. Die Identifizierung von Tumorzellen und die Interaktion des Organismus mit dem veränderten Gewebe ist an Antigen-Antikörper-Reaktionen gebunden. Neben antigenpräsentierenden Zellen (APC: dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen), NK-Zellen und kostimulierenden Faktoren spielen vor allem T-Lymphozyten eine wesentliche Rolle. Die Entwicklungen auf dem Gebiet der Gewinnung von mAk, die Möglichkeiten einer gezielten Isolierung, Klonierung und weiterführenden Analyse am Immungeschehen beteiligter Zellpopulationen führten zum Nachweis funktioneller und phänotypischer Unterschiede zwischen den in die Immunabwehr involvierten Zellen. In dem Maße, wie es der immunologischen Forschung gelingt, phänotypische Merkmale mit funktionellen Eigenschaften zu verknüpfen, wird es möglich sein, die komplexen pathophysiologischen Prozesse im Ablauf maligner Tumorerkrankungen zu entschlüsseln. Parallel werden immunologische Methoden im Rahmen der Diagnostik Aussagen zur Prognose und zu adäquaten Therapiekonzepten liefern.

2.1.1. Lymphozytenvermittelte Tumorabwehr

Die Effektivität zellulärer Immunreaktionen steht in unmittelbarem Zusammenhang mit der Funktion der T-Lymphozyten. Ihr Aktivitätsspektrum umfasst in Abhängigkeit von ihrer Differenzierung unterschiedliche Funktionen und charakteristische Eigenschaften, wie Zytotoxizität, Zytokinsynthese und -sekretion. Nach ihrer Entwicklung im Thymus zirkulieren die zunächst naiven T-Zellen zwischen Blut und peripheren lymphatischen Organen und differenzieren sich nach einem Antigenkontakt zu sog. Effektorzellen. Mit Hilfe spezifischer mAk lassen sich CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen markieren, welche zwei funktionell unterschiedliche Klassen repräsentieren. CD8⁺-T-Zellen erkennen mit Hilfe ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) Tumor-Antigen-

bruchstücke. Dabei müssen die Zielzellen das Antigen in Verbindung mit MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche exprimieren. Unter dem Einfluss von Zytokinen laufen klonale Expansions- und Reifungsprozesse der Antigen-sensibilisierten T-Zellen ab. Interleukin(IL)-2 gilt als Wachstums- und Differenzierungshormon für Lymphozyten (T-, B- und NK-Zellen) und aktiviert die zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen. IL-2 wird von CD4⁺-T-Helfer-Zellen produziert, nachdem sie Komplexe aus MHC-Klasse-II-Molekülen und Tumorantigenfragmenten auf APC registriert haben. Nach ihrer Aktivierung stimulieren sie B-Zellen zur Immunglobulin(Ig)-Produktion und induzieren zytotoxische Reaktionen von Makrophagen. MHC-Klasse-II-Moleküle werden hauptsächlich von APC exprimiert. MHC-Moleküle der Klasse I befinden sich dagegen auf allen kernhaltigen Zellen.

Das Auftreten von TIL könnte auf die Erkennung tumorspezifischer Antigene durch T- und B-Lymphozyten zurückzuführen sein. Bei einigen Tumorentitäten, wie malignen Melanomen, Nierenzell- oder Lungenkarzinomen wurde die Antigenerkennung durch Lymphozyten nachgewiesen (11, 24, 25, 34, 43, 120). Wie oben bereits beschrieben, synthetisieren und sezernieren aktivierte Lymphozyten nach Antigenkontakt Zytokine als immunmodulatorisch wirkende Substanzen. Anhand der Zytokinfreisetzung und der Bestimmung an der Zelloberfläche exprimierter Adhäsions- und Aktivierungsmarker ist eine Beurteilung der TIL-Aktivität möglich. Die dabei gemessenen Aktivitätsparameter belegen starke Differenzen sowohl im Vergleich einzelner Lymphozytenpopulationen als auch zwischen Lymphozyten verschiedener Tumorentitäten (11, 41, 85, 101). Nach den Ursachen für diese Unterschiede wird intensiv geforscht, um die komplexen Abläufe der Tumorbekämpfung besser zu verstehen und regulierend beeinflussen zu können.

Die Expression bestimmter Zytokine kennzeichnet weitere funktionelle Subpopulationen der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen. Die Produktion von IFN- γ und IL-2 ist für T-Helfer-Zellen und zytotoxische T-Zellen vom Typ 1 (Th1, Tc1) charakteristisch. Von Th2- und Tc2-Zellen werden vor allem IL-4, IL-5 und IL-10 freigesetzt (42, 43). Letztere fördern so die humorale Immunität und blockieren zudem die Typ-1-Reaktion, bei welcher die zelluläre Immunität im Vordergrund steht (42, 49, 93). Es konnte gezeigt werden, dass die Mehrheit der TIL aus NSCLC dazu fähig ist, Typ-1-Zytokine zu sezernieren (71). Des Weiteren scheint das Verhältnis der Typ-1- zu Typ-2-T-Zellen ein Hinweis auf den lokalen Aktivierungsstatus im Tumor zu sein. Im Verlauf der Tumorerkrankung und -progression könnte sich ein Missverhältnis der Zellpopulationen einstellen und mit einer schlechteren Prognose assoziiert sein. Palmer et al. berichteten, dass ein erhöhtes Niveau der Typ-2-Zytokine für die Fähigkeit der Tumorzellen, der Immunsurveillance zu entkommen, mit verantwortlich ist (73). Noch existiert das Problem, eine Zytokinexpression einer Zellpopulation innerhalb des Tumormikromilieus (TIL, Tumorzellen, Stromazellen) zuzuweisen. Man kann davon ausgehen, dass diese, den Tumor infiltrierenden T-Zellklone eine wichtige immunmodulatorische Rolle spielen. Die Option zur weiteren T-Zell-Charakterisierung und daraus resultierende Kenntnisse der funktionellen Eigenschaften

eröffnen neue Perspektiven zur Beurteilung des lokalen Immunstatus im Tumorgewebe. Die gezielte Tumormilieubeeinflussung und Induktion des Typ-1-Weges ist ein vielversprechender Ansatz für therapeutische Strategien mit dem Ziel einer effektiveren Antitumorreaktion.

Die für die humorale Immunität verantwortlichen B-Zellen tragen an ihrer Oberfläche membranständige Immunglobuline (B-Zell-Rezeptoren). Der Kontakt zwischen B-Zell-Rezeptor und passendem Antigen, sowie meist zusätzliche Aktivierung durch T-Helfer-Zellen, führt zur Proliferation und Differenzierung in antikörpersezernierende Plasmazellen sowie B-Gedächtniszellen, die die Erinnerung an die Antigene speichern. Die freigesetzten Antikörper markieren die erkannten Antigene als Angriffsziel für andere, zerstörende Abwehrsysteme, wie das Komplementsystem.

NK-Zellen sind große granuläre Lymphozyten, die weder der B- noch der T-Lymphozytenreihe zugeordnet werden können. Sie exprimieren F_C -Rezeptoren (CD16 und CD56) und erkennen darüber den F_C -Teil von Immunglobulinen auf der Zielzelle. NK-Zellen entfalten ihre zytotoxische Wirkung über Perforine (Lyse der Zielzelle), CD95L (Apoptoseinduktion in der Zielzelle) und Zytokine (Tumornekrosefaktor(TNF)- α und - β) unabhängig von einer Antigenpräsentation. Eine verringerte MHC-Klasse-I-Moleküloberflächenexpression oder deren komplette Suppression ist ein häufiges Phänomen von Tumoren unterschiedlicher Histologie (90). Aufgrund ihrer Fähigkeit, Tumorzellen ohne vorherige Sensibilisierung und in Abwesenheit des MHC-Komplexes zu zerstören, gelten NK-Zellen als wichtige Effektoren (82). In diesem Zusammenhang konnte festgestellt werden, dass die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen in der Lunge bei Patienten mit Bronchialkarzinomen im Vergleich zu NK-Zellen aus dem peripheren Blut und aus gesundem Lungengewebe signifikant reduziert ist (116).

2.1.2. Funktionsassoziation der Oberflächenmoleküle auf Lymphozyten

Gruppen monoklonaler Antikörper, die die gleichen Leukozytendifferenzierungsantigene erkennen, definieren nach internationaler Terminologie sogenannte Differenzierungscluster (Cluster of Differentiation, CD) und erhielten eine fortlaufende Nummerierung. Basierend auf der Existenz dieser Differenzierungscluster lassen sich Lymphozyten durch mAk, die Moleküle auf der Zelloberfläche erkennen, in Subpopulationen unterteilen (z. B. $CD3^+$ für T-Zellen), bestimmten Reifestadien zuordnen (z. B. $CD34^+$ für Stammzellen) und hinsichtlich ihrer Funktionen beurteilen (z. B. $CD45RO$ für Zellen nach stattgefundenem Antigen-Kontakt).

Die von uns untersuchten Oberflächenantigene werden nachfolgend kurz beschrieben. Obwohl die molekularen Strukturen weitestgehend bekannt sind, fehlen teilweise Informationen zu Funktionen und Wirkungen im Bereich tumorreaktiver Abwehrmechanismen.

- CD3: Diese Oberflächenmoleküle finden sich in Verbindung mit dem T-Zell-Rezeptor auf allen T-Lymphozyten und dienen der Signalübertragung in das Innere der Zellen.

- CD4: Das Molekül setzt sich aus vier Immunglobulinähnlichen Domänen in Form einer Einzelkette zusammen und ist für T-Helfer-Zellen charakteristisch. CD4⁺-T-Zellen binden an ein Antigenfragment in Assoziation mit einem MHC-Klasse-II-Molekül und greifen nach Kontakt und Aktivierung regulatorisch in den Abwehrprozess ein. Sie regen B-Zellen zur Synthese von Immunglobulinen an und induzieren zytotoxische Reaktionen von Makrophagen.

- CD8: Das Heterodimer setzt sich aus einer α - und β -Kette zusammen, welche über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Das für zytotoxische T-Zellen spezifische Oberflächenprotein nimmt mit MHC-Klasse-I-Molekülen Kontakt auf. Als Korezeptor hat CD8 ähnliche Funktionen wie CD4 inne und erhöht die Sensibilität von T-Zellen für durch MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiertes Antigen um das Hundertfache (50).

- CD11b: Das Oberflächenantigen ist Bestandteil eines Molekülkomplexes, welcher sich aus CD11b und CD18 zusammensetzt und zur Familie der Integrine gehört. Seine Funktionen bestehen in der Rezeptorwirkung für die Komplementkomponente C3b und in der Bindung von CD54 (ICAM-1). Welche Aufgaben der auf allen Zellen der myeloischen Reihe anzutreffende Rezeptor bei T-, B- und NK-Zellen übernimmt, bedarf noch einer genaueren Klärung.

- CD13: Dieses auch als Aminopeptidase N bezeichnete Protein galt lange Zeit als ein Differenzierungsmolekül für Zellen der myeloischen Reihe. T-Zellen aus Tumoren, wie z. B. Lungen- und Nierenzellkarzinomen, sowie aus Exsudaten entzündeter Gewebe, wie Synovialflüssigkeit bei Arthritis, sind jedoch ebenfalls in der Lage CD13 zu exprimieren (78, 80, 81). Erst seit kurzem weiß man, dass CD13 auf Monozyten direkt in Signaltransduktionsvorgänge involviert ist (88). CD13 wird auf T-Zellen nach direktem Zell-Zell-Kontakt mit verschiedenen Zellen induziert (79). Da die Aminopeptidase N biologisch aktive Peptide aus der Gruppe der Neuropeptide, Kinine und Chemokine spaltet, könnten CD13⁺-TIL deren Signalübertragung und Regelmechanismen beeinflussen (79).

- CD16: CD16 ist der F_C-Rezeptor für IgG vom Typ III und wird von einem Teil der NK-Zellen, der Makrophagen und von neutrophilen Zellen exprimiert. Seine Funktionen betreffen die Vermittlung der Phagozytose und antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (50).

- CD25: Dieses Antigen wird von aktivierten T-Zellen und B-Zellen exprimiert. Als α -Kette ist es

ein Baustein des IL-2-Rezeptors, dessen Synthese nach spezifischem Antigenkontakt der T-Zellen oder nach IL-2-Gabe induziert wird. Erst die Verbindung der α -Kette mit den beiden anderen Ketten β und γ führt zu einer erhöhten IL-2-Affinität des Rezeptors (50).

- CD26: Die Aminopeptidase CD26 heißt auch Dipeptidylpeptidase IV und wird unter anderem auf aktivierten T-Zellen exprimiert. Ihre Funktionen bestehen in der Abspaltung aminoterminaler X-Prolin oder X-Alanin-Dipeptide von Oligopeptiden (Neuropeptiden, Chemokinen) und in der Beteiligung an Signaltransduktions- und Adhäsionsvorgängen (44, 50).

- CD45RO: Die plasmamembranintegrierte Tyrosinphosphatase CD45 (LCA, leukocyte common antigen) wird von allen hämatopoetischen Zellen exprimiert und tritt in mehreren Isoformen auf, welche sich durch den Besitz oder das Fehlen der Exone A,B und/oder C unterscheiden. Ihre Funktion besteht in der Beeinflussung der Signalvermittlung über den Antigenrezeptor von T- und B-Lymphozyten. CD45RO ist mit 180 kDa die kürzeste Form und kann an der Oberfläche von T- Zellen nach einem stattgefundenem Antigenkontakt nachgewiesen werden. In Geweben und auch in Tumoren finden sich zu > 90 % CD45RO⁺ T-Zellen. Im peripheren Blut ist die Zahl geringer, steigt jedoch mit zunehmendem Alter an (1, 110, 123).

- CD49a: Das Antigen gehört zu den "very late activation antigens" (VLA) und wird an der Oberfläche von aktivierten T-Zellen, Monozyten, aber auch glatten Muskelzellen und Nervenzellen gefunden. Das an CD29 gekoppelte Molekül CD49a zählt zu den Integrinen und fungiert als Adhäsionsmolekül für die Proteine Laminin und Kollagen. Einige VLA sind bei der Wanderung von Leukozyten an ihre Zielorte von Bedeutung und durch Signalübertragung an der Proliferation und IL-2-Rezeptor-Expression von Subpopulationen der T-Lymphozyten beteiligt (50, 59).

- CD54: Das interzelluläre Adhäsionsmolekül (ICAM-1) zählt zur Gruppe der Immunglobulin-superfamilie und ist sowohl auf hämatopoetischen als auch nichthämatopoetischen Zellen anzutreffen. Neben der Bindung der Integrine CD11a/CD18 (LFA-1) und CD11b/CD18 (Mac-1) dient CD54 als Rezeptor für Rhinoviren. Seine Bedeutung liegt unter anderem in der Vermittlung von Interaktionen zwischen APC und Lymphozyten, so auch bei der Erkennung und Aktivierung CD4⁺ TIL-Klone (43, 50).

- CD56: Es handelt sich um eine Isoform des neuralen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM) und wird von einem Teil der NK-Zellen, sowie in einigen neuralen Geweben und Tumoren exprimiert (12).

- CD57: Das HNK-1-Antigen (human natural killer cells-1-Antigen) ist als ein Oligosaccharid mit Proteinen und Lipiden verknüpft und auf NK-Zellen und T-Zell-Subpopulationen präsent. Bei

bestimmten viralen Erkrankungen (HIV, CMV) sind erhöhte Anteile CD57⁺-T-Lymphozyten nachweisbar (111, 114). Auf humanen T-Zellen wird CD57 in einem späten Differenzierungsstadium erworben (26) und es gibt Hinweise dafür, dass CD57⁺-T-Zellen zu einer Suppression der T-Zell-Reaktionen führen (9, 112).

- CD69: Das Molekül (AIM, activation inducer molecule) trägt auf seinem extrazellulären Teil eine Domäne vom Lectin-Typ und dient wahrscheinlich als Signalrezeptor bei der Aktivierung von T-Zellen. Auf letzteren ist das Oberflächenantigen bereits 30 bis 60 min nach Stimulation nachweisbar. Die Expression von CD69 kann auf Thymozyten, B- und NK-Zellen sowie Neutrophilen ebenfalls induziert werden. Bei Rheumatoidarthritis regen CD69⁺-Lymphozyten in der Synovialis Makrophagen zur Sekretion von TNF- α und IL-1 an und stimulieren Synoviozyten zur Produktion von Metalloproteinasen (20, 74).

- HLA-DR: HLA (Human Leucocyte Antigen) ist die Bezeichnung für humane Haupthistokompatibilitätskomplexe. Einzelne Genloci sind durch Großbuchstaben, die Allele durch Zahlen gekennzeichnet. Es werden MHC-Klasse-I-Moleküle (HLA-A, -B, -C) mit Vorkommen auf kernhaltigen Körperzellen von MHC-Klasse-II-Molekülen (HLA-DR, -DP, -DQ) mit Vorkommen auf APC, wie dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen unterschieden. Von Bedeutung ist der Komplex bei der Antigenerkennung durch T-Zellen, der Entwicklung der T-Zellen im Thymus, sowie Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen (50).

2.2. Therapie und Prognose des Lungenkarzinoms

Das Lungenkarzinom ist bezüglich der Inzidenz der zweithäufigste maligne Tumor beim Mann und der fünfhäufigste maligne Tumor bei der Frau (5, 13). Die Entstehung des Lungenkarzinoms beeinflussen bekannte Risikofaktoren wie die Inhalation exogener Karzinogene entscheidend. Eine ansteigende Inzidenz unter der weiblichen Bevölkerung innerhalb der letzten zehn Jahre korreliert mit der Zunahme der Raucherinnen. Eine für die weitere therapeutische Vorgehensweise relevante Unterscheidung stellt die histologische Typisierung dar. Dabei werden grundsätzlich zwei große Gruppen voneinander getrennt: die kleinzelligen Karzinome (SCLC = Small cell lung cancer) mit 20 - 30 % und die nicht-kleinzelligen Karzinome (NSCLC = Non small cell lung cancer) mit 70 - 80 %. Zur letzten Gruppe zählen Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome, großzellige Karzinome und adenosquamöse Karzinome (67, 92). Bei der Diagnosestellung befinden sich < 10 % der NSCLC und < 5 % der SCLC in einem prognostisch günstigen Tumorstadium (Stadium I - II).

Die schnelle Metastasierung in fast alle Organe, wie Knochen, Leber, Lunge und Hirn ist für beide Gruppen typisch, so dass bereits bei Diagnosestellung klinisch manifeste Fernmetastasen in 10 - 20 % bei NSCLC und 40 % bei SCLC auftreten. Diese tumorbiologischen Charakteristika führen bei SCLC ohne Therapie zu einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 3 - 6

Monaten. Obwohl eine relativ hohe Radio- und Chemosensibilität bei SCLC und bei Plattenepithelkarzinomen vorliegen, sind Heilungen im fortgeschrittenen Stadium nur selten anzutreffen. Die Prognose bei NSCLC variiert in Abhängigkeit des Tumorstadiums. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate liegt für Stadium I bei 50 - 60 %, Stadium II bei 15 - 30 %, für Stadium IIIA bei 15 % und ab Stadium IIIB unter 10 %. Die schlechte Prognose spiegelt sich auch in einer hohen Rezidivrate nach etwa einem Jahr von einem Drittel der Patienten, die sich einer chirurgischen Resektion unterzogen, wider (14, 29, 91).

Die sich an der Stadieneinteilung (UICC) orientierende Therapie des SCLC setzt sich bei einer "Limited disease" (Erkrankung auf eine Thoraxseite und Mediastinum begrenzt) aus der Kombination einer Chemotherapie mit einer Radiotherapie des Mediastinums zusammen. In Diskussion sind außerdem prophylaktische Bestrahlungen des Schädels, die eine Hirnmetastasierung verringern, jedoch auf Grund der niedrigen Patientenzahlen noch keine nachweisbare Effizienz aufzeigen (69). Die Standardtherapieform sieht im Stadium I und II die Resektion mit prä- oder postoperativer Chemotherapie vor. Bei Patienten im Stadium IIIA konnte ein abnehmender Einfluss der chirurgischen Therapie auf die Überlebensrate nachgewiesen werden (86). Die kombinierte Chemoradiotherapie ergab noch bessere Erfolge als eine alleinige Chemotherapie in Bezug auf die Langzeitüberlebensraten (120). Bei "Extensive disease" (kontralaterale Lungenmetastasen oder extrathorakale Fernmetastasen) wird als Therapie der ersten Wahl die Chemotherapie angewandt. Eine lokale Radiotherapie folgt bei vorhandenem Resttumor oder bei Progression der Erkrankung. Es erwies sich als prognostisch günstiger, beide Therapiemodalitäten gleichzeitig durchzuführen (32).

Lautet die Diagnose NSCLC mit Stadium I-II/ IIIA wird die kurative operative Tumorresektion favorisiert. Dabei bietet die Anwendung einer postoperativen adjuvanten Radiotherapie eine Verbesserung der lokalen Rezidivfreiheit und der Überlebenszeit für Patienten mit Stadium IIIA (89). Ab Stadium IIIB ist ein operativer Eingriff häufig nicht mehr indiziert, sondern man fällt die Entscheidung für eine Radio- oder Radiochemotherapie. Im Tumorstadium IV erfolgt der Einsatz einer Chemo- und Radiotherapie unter palliativen Gesichtspunkten und Berücksichtigung der Beschwerdesymptomatik und individuellen Belastbarkeit des Patienten. Die Effizienz der Chemotherapie bei operablen und inoperablen Tumoren wurde in verschiedenen Studien untersucht (7, 22, 32, 61, 121). Dabei bleibt für lokalisiert wachsende Tumoren im Stadium IIIA und IIIB der chirurgische Weg im Hinblick auf eine kombinierte Behandlungsstrategie noch untersuchungsbedürftig. Der multimodale Therapieansatz gewinnt bei diesen Patienten in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung. Derzeit scheinen die Primäroperation und Nachbestrahlung sowie ein neoadjuvanter Therapieansatz mit anschließender Operation bei gering ausgeprägten und technisch vollständig resektablen mediastinalen Lymphknotenmetastasen gleichwertig zu sein. Bei einer fortgeschrittenen mediastinalen Metastasierung und im Stadium IIIB hat sich die neoadjuvante Behandlungsoption mit primärer Radio-/Chemotherapie und anschließender Operation bereits etabliert (14).

Trotz erzielter Erfolge nach Entwicklung und Einsatz multipler Kombinationstherapieregime in den vergangenen Jahren sind die Ergebnisse nach wie vor unbefriedigend. Es gilt also, bewährte Behandlungsmuster zu optimieren und zusätzlich nach neuen Ansatzpunkten für den Einsatz effizienterer Therapiekonzepte zu suchen. Die Immuntherapie ist ein wichtiges Stichwort auf dem Weg in diese Richtung. Unter dem Oberbegriff Immuntherapie lassen sich Verfahren zusammenfassen, die mit Hilfe immunologischer Methoden maligne Tumoren im Wachstum und ihrer Ausbreitung im Organismus hemmen sollen. Noch befindet sich die Immuntherapie beim Menschen im Stadium der experimentellen und nur in Einzelfällen der klinischen Forschung. Der tumorimmunologische Stand der Forschung spiegelt sich in den vielfältigen Konzepten wider, mit denen eine therapierelevante Beeinflussung maligner Tumoren beim Menschen erzielt werden soll. Das Spektrum reicht von der Modulation der körpereigenen Tumorabwehr z. B. mit Zytokinen, über eine Anwendung von mAk und Vakzinen gegen tumorassoziierte und -spezifische Antigene bis zur genetischen Korrektur von Mutationen in Tumorzellen (z. B. Transfer des Tumorsuppressorgens p53) (37, 87, 103). Entgegen aller ermutigenden Forschungsergebnisse gibt es derzeit kein in der Praxis etabliertes immuntherapeutisches Verfahren zur Behandlung von Malignomen beim Menschen.

3. Material und Methoden

3.1. Patientenrekrutierung

Bei 303 Patienten wurde im Zeitraum vom Juli 1990 bis Februar 1997 im Klinikum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg ein maligner Tumor reseziert. Die histologische Diagnostik der gewonnenen Gewebeproben oblag dem Institut für Pathologie. Nach entsprechender Aufbereitung des Materials (siehe 3.2.) führte das Institut für Medizinische Immunologie die flowzytometrischen Messungen durch. Die aus der Analyse stammenden Daten wurden in dieser Studie retrospektiv beurteilt. Sie umfasste 125 Lungentumoren, 116 Nierenzelltumoren, 21 Magen-, 4 Mamma-, 10 Blasen-, 7 Ösophagus- und 5 Kolon-/Rektumkarzinome, 20 Lungenmetastasen und 5 Hirntumoren. Die für die statistische Auswertung erforderlichen klinischen Angaben und die histologische Diagnose wurden den pathologischen Befundberichten entnommen.

3.2. Gewinnung und Präparation der TIL

Die Resektionsproben wurden in einem mit 5 % Kälberserum und Antibiotika (0,75 µl /ml Refobacin, Merck; 1 µl /ml Fungizone, Life Technologies Eggenstein) versetzten RPMI 1640-Medium zum Institut für Medizinische Immunologie transportiert. Hier erfolgten zunächst eine grobe mechanische Zerkleinerung der Proben und nach Zusatz von 0,1 % Kollagenase und 0,015 % DNase die Inkubation in Abhängigkeit der Materialkonsistenz für 30 bis 60 min bei 37 °C. Die Proben wurden währenddessen kontinuierlich gerührt und anschließend ein RPMI-Medium mit 20 % Kälberserum zugeführt, um die proteolytische Aktivität abzustoppen. Die Verwendung eines Metallsiebes diente der groben Entfernung nicht zerlegter Teile und die Passage eines Ficollgradienten der Anreicherung mononukleärer Zellen und Trennung abgestorbener Zellen. Das Material wurde nun mittels Pufferlösung (PBS) zweimal gewaschen. Zur Analyse des Phänotyps wurde eine Lymphozytensuspension von ca. 10^6 Zellen/ml hergestellt und je 100 µl Zellsuspension nach Zugabe von direkt fluoreszenzmarkierten Antikörpern (FITC, PE) für 15 min bei 20 °C unter Lichtabschirmung inkubiert. Dabei kamen die in Tabelle 1 aufgeführten mAk zum Einsatz. Die Fixierung mit 1 %-iger Paraformaldehydlösung in PBS und das folgende zweimalige Waschen mit PBS fanden ebenfalls unter Abdunkelung statt. Nach der beschriebenen Aufbereitung des Materials wurde die Fluoreszenz mit Hilfe des Durchflusszytometers (FACScan, BD) im Lymphozytengate gemessen. Insgesamt konnten in Abhängigkeit von der Tumorentität und Gewebegröße zwischen $0,5 \times 10^6$ bis 3×10^6 Zellen gewonnen werden. Gliome hatten deutlich geringere Zellzahlen ($< 10^6$ Zellen).

Die Tumorresektate von 12 Patienten mit Nierenzellkarzinomen wurden in einer vergleichenden Studie zwei unterschiedlichen Prozeduren unterzogen. Es sollte untersucht werden, ob der Kollagenasezusatz die Resultate der flowzytometrischen Zählung beeinflusst. Für die Proben der Gruppe 1 (n = 12) erfolgte die Aufbereitung wie oben beschrieben. Die Gruppe 2 (n = 12) erhielt im Zuge der Enzymbehandlung keine Kollagenase. Die flowzytometrischen Messungen aller Präparate und ein statistischer Vergleich (Mann-Whitney-U-Test) der Ergebnisse schlossen sich an (Ergebnisse S. 29 in 4.2.).

Tab. 1: Herkunft der zur Immunophänotypisierung eingesetzten mAk

CD	Antikörper	Quelle
CD3	Leu-4	BD (Heidelberg)
CD4	Leu-3a	BD (Heidelberg)
CD8	Leu-2a	BD (Heidelberg)
CD11b	Leu-15	BD (Heidelberg)
CD13	Leu-M7	BD (Heidelberg)
CD16	Leu-11	BD (Heidelberg)
CD25	IOT 14	Coulter/Immunotech (Hamburg)
CD26	Ta 1	Coulter/Immunotech (Hamburg)
CD45RO	Leu-45-RO	BD (Heidelberg)
CD49a	ACT-T-SET (VLA-1)	T Cell Sciences (Cambridge)
CD54	Leu-54	BD (Heidelberg)
CD56	Leu-19	BD (Heidelberg)
CD57	IOT 10	Coulter/Immunotech (Hamburg)
CD69	Leu-23	BD (Heidelberg)
HLA-DR	HLA-DR	BD (Heidelberg)

3.3. Durchflusszytometrie

Dieses Verfahren dient der Analyse von Einzelzellsuspensionen nach ihrer Markierung mit spezifischen Farbstoffen unter Nutzung von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Die in Lösung befindlichen, mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern markierten Zellen werden im System über eine Kapillare einzeln in einem feinen Flüssigkeitsstrahl an einem Laserfenster als Lichtquelle vorbeigeleitet (Abb. 2a und b). Bei unseren Untersuchungen kam ein Argon-Ionenlaser zum Einsatz, der Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm aussendet. Die Lichtstreuung in Vorwärtsrichtung (FSC = forward light scatter) gilt als Maß für die Zellgröße. Das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl abgelenkte Seitwärtsstreulicht (SSC = side scatter) wird vor allem durch die intrazellulären Bestandteile beeinflusst. Die Fluoreszenz der Zellen ist Ausdruck ihrer Interaktion mit den spezifischen Antikörpern. Während der Passage wird jede einzelne Zelle angeregt, analysiert und die Messdaten zur statistischen Aufarbeitung im Computer gespeichert (Abb. 2c). Die grafisch orientierte Datenanalyse bietet verschiedene Formen der visuellen Präsentation der Ergebnisse. Es besteht die Möglichkeit, durch die Festlegung bekannter Grenzwerte der Streulichteigenschaften nur die Zellen herauszufiltern (FSC/SSC), die einer bestimmten Zellpopulation zugeordnet werden können (z. B. Lymphozyten). Der Filtervorgang, der auch als "Gating" bezeichnet wird, kann wie in unserer Arbeit auf die Erhebung und Speicherung der Daten aller Zellen, welche sich zum Zeitpunkt der Messung im Gate befinden (Life-Gate), beschränkt werden. Im Gegensatz zur Einparameterdarstellung

(Abb. 2d) gestattet die sogenannte korrelierte Zweiparameterdarstellung ("Zwei-Parameter-Dotplot", Abb. 2e) die Abbildung zweier Parameter einer Probe zur Identifizierung der betreffenden Leukozytensubpopulationen. Dabei markiert jeder Punkt die Messwerte für eine Zelle. Neben verschiedenen Fluoreszenzintensitäten (FL 1 und FL 2 in Abb. 1a) können auch die Parameter Zellgröße (FSC) und Granularität (SSC) jeder Zelle über die x- bzw. y-Achse abgebildet werden (Abb. 1b)(15). Die Markierung spezifischer Oberflächenantigene (z. B. CD3⁺/CD25⁺) bietet die Möglichkeit einer weiteren Differenzierung und grafischen Präsentation von Lymphozytensubpopulationen (68).

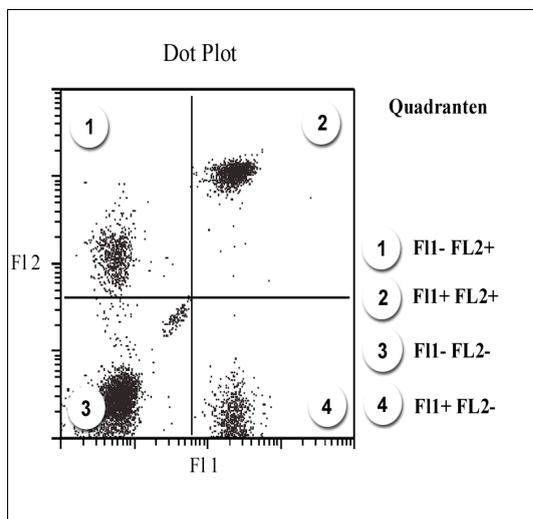


Abb. 1a: Beispiel für ein "Zwei-Parameter-Dot-plot". Die Fluoreszenzintensität (FL)-1 wird auf der x-Achse und die Fluoreszenzintensität für FL-2 auf der y-Achse aufgetragen. Gezeigt wird der Schnittpunkt beider Kanäle als Punkt. Die gekreuzten Linien markieren Grenzen für die Unterteilung negativ (Eigenfluoreszenz) und positiv.

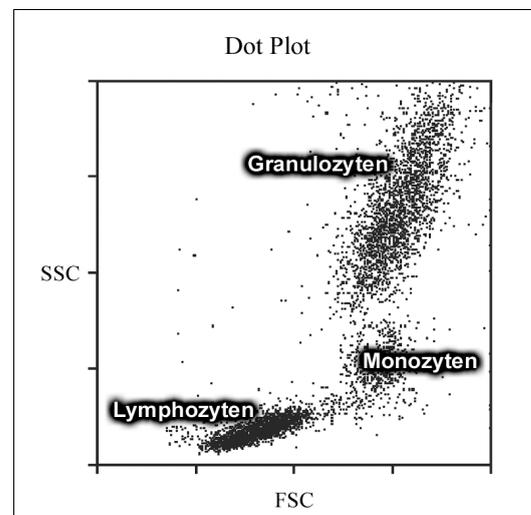


Abb. 1b: Beispiel für ein "Zwei-Parameter-Dot-plot". Dargestellt sind Leukozyten des peripheren Blutes. Der Parameter Zellgröße (FSC) jeder gemessenen Zelle wird auf der x-Achse und der Parameter Lichtstreuung (SSC) auf der y-Achse aufgetragen. Gezeigt wird der Schnittpunkt beider Kanäle als Punkt.

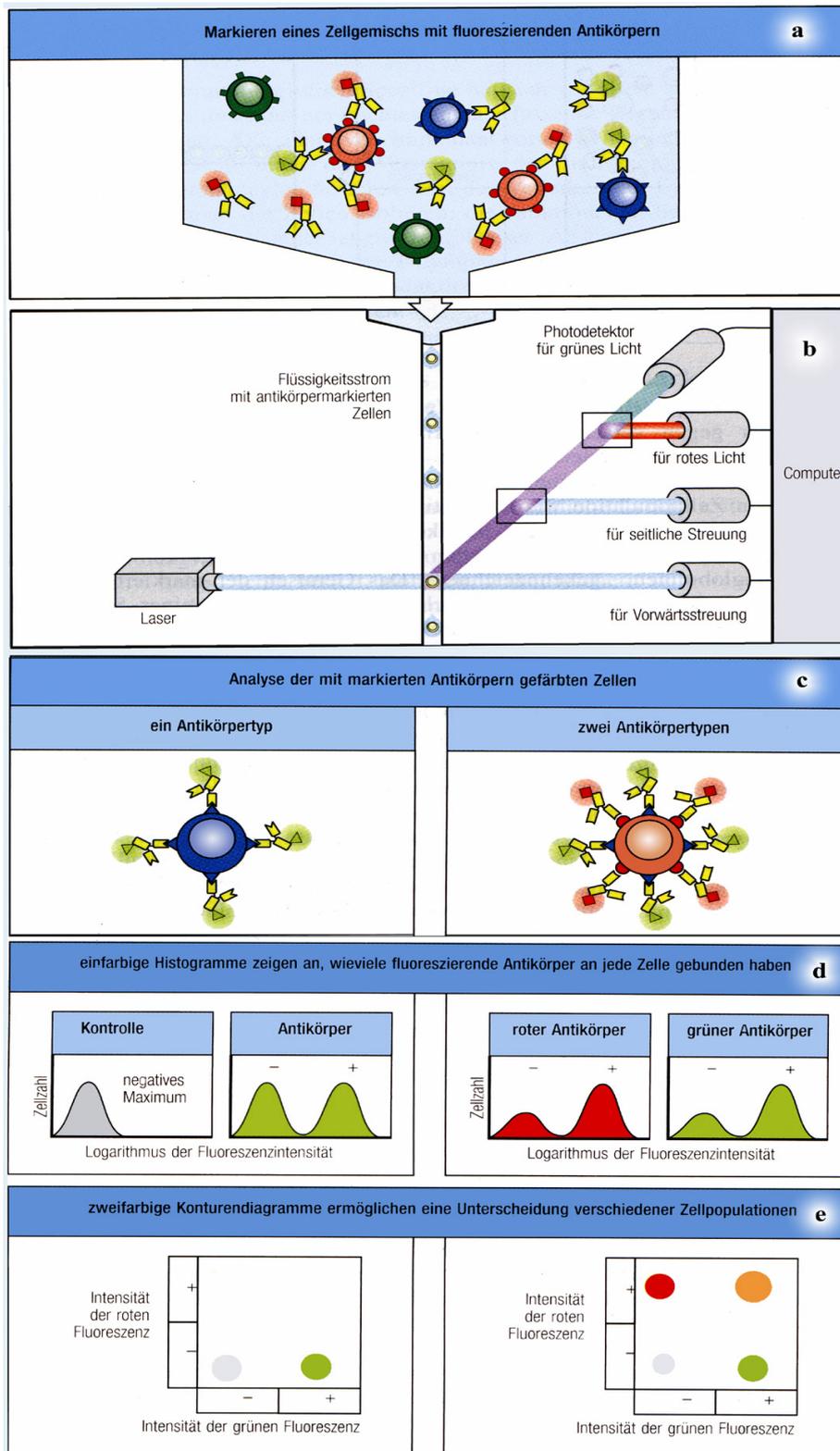


Abb. 2a - 2e: Durchflusszytometrie als Verfahren zur Lymphozytendifferenzierung (50)

- a) Markierung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen
- b) Einzelmessung im Laserfenster
- c) Datenanalyse der mit mAK markierten Zellen
- d) grafische Darstellung der Zellpopulationen als Histogramm
- e) und als "Zwei-Parameter-Dotplot"

3.4. Statistische Analysen

Die umfangreiche statistische Auswertung und grafische Veranschaulichung der ermittelten Daten erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms SPSS für Windows. Bei allen statistischen Betrachtungen wurde für die Ergebnisse ein Signifikanzniveau von 5 % ($p = 0,05$) festgelegt.

3.4.1. Überlebensstatistik

Das Kaplan-Meier Modell basiert auf der Schätzung bedingter Wahrscheinlichkeiten zu jedem Zeitpunkt eines eingetretenen Ereignisses und der Bildung des Produktwertes dieser Wahrscheinlichkeit zur Schätzung der Überlebensrate zu jedem Zeitpunkt. Unsere Überlebensvariable umfasst die Zeit (in Monaten) von der operativen Tumorentfernung bis zum Tod des Patienten. Es handelt sich um eine zensierte Variable, da am Ende der Untersuchung (Stichtag 1.11.1997) nicht alle Patienten verstorben waren. Die Überlebensbeobachtung setzt sich für jeden Patienten aus zwei Werten zusammen, der Überlebensdauer bis zum Stichtag (in Monaten) und einem Indikator (Zensor). Letzterer gibt an, ob das kritische Ereignis (Tod des Patienten) bis zum Stichtag eintrat oder nicht. Die Expression jedes Oberflächenmarkers auf den TIL wurde einzeln untersucht und dabei eine Einteilung in je drei Gruppen der registrierten Expressionsdichte des CD-Moleküls vorgenommen. Zur Festlegung der Grenzen für die Gruppierungen wurden vorliegende Erkenntnisse aus Vergleichen einer früheren Veröffentlichung mit einem ähnlichen Patientenkollektiv genutzt (81). Die Zuordnung in eine der drei Gruppen basiert darauf, ob die untersuchten Lymphozyten das markierte Oberflächenmolekül in geringem (Gruppe 1), moderatem (Gruppe 2) oder großem Umfang (Gruppe 3) aufwiesen. Mit Hilfe des Logrank-Tests wurden die Überlebenszeitkurven zwischen den Gruppen verglichen, um zu ermitteln, ob die Höhe der Expression des betreffenden Oberflächenantigens auf den TIL mit der Überlebenszeit der Lungenkarzinompatienten in Zusammenhang steht. Die Signifikanzprüfung mit dem Logrank-Test untersucht beobachtete Differenzen mit der Nullhypothese. Es wurde geprüft, ob die Stichproben derselben Grundgesamtheit entstammen und die Unterschiede nur zufallsbedingt sind. Der Logrank-Test beachtet ebenfalls das Auftreten zensierter Daten in den Untersuchungsgruppen. Ein p -Wert $< 0,05$ gestattet es, die Nullhypothese zu verwerfen und anzunehmen, dass die Unterschiede nicht zufällig auftreten. Die Ergebnisse wurden in Tabellenform aufgelistet, die Überlebenskurven berechnet und grafisch dargestellt.

Im weiteren Verlauf wurde mit Hilfe eines multiplen Analyseverfahrens die Wirkung zusätzlicher Variabler (Kovariaten: Subtypen nichtkleinzelliger Lungenkarzinome, TNM-Klassifikation, Tumorstadium, Grading) auf die Überlebenszeit überprüft. Wie die Kaplan-Meier-Überlebensanalyse ist auch die hier durchgeführte Cox-Regressionsanalyse eine weitere Methode zur überlebensbezogenen Auswertung von Daten, welche in Gegenwart zensierter Fälle die Zeit bis zum Eintreten des Ereignisses (Tod des Patienten) angeben. Bei der Regressionsanalyse

wird gegen eine Referenzgruppe getestet. Für die Gruppierung der Patientendaten wurden dieselben Grenzwerte wie in der univariaten Analyse festgelegt. Dabei richtete sich die Zuordnung in eine der drei Gruppen wieder danach, ob die untersuchten Lymphozyten das markierte Oberflächenmolekül in geringem (Gruppe 1), moderatem (Gruppe 2) oder großem Umfang (Gruppe 3) aufwiesen. In unserer Analyse wurde Gruppe 1 als Referenzgruppe mit einem relativen Risiko (RR) von 1 festgelegt. Für jedes ermittelte CD-Molekül erfolgte die Analyse von Gruppe 1 gegen Gruppe 2 bzw. Gruppe 3 mit entsprechender Angabe der p-Werte. Die von uns in Gruppe 1 aufgenommenen Fälle zeigen immer den geringsten Anteil der B-, T-, NK-, CD4⁺- und CD8⁺-Zellen unter den TIL (Prozent der Lymphozyten) bzw. der exprimierten Oberflächenantigene (Prozent der T-Lymphozyten). Gruppe 3 umfasst die Fälle mit dem höchsten Anteil. Die Berechnungen wurden nach Adjustierung auf TNM-Stadium, Grading und Histologie für alle nichtkleinzelligen Lungenkarzinome mit Tumorstadium I bis III, Grading 2 und 3, ohne vorhandenen Residualtumor vorgenommen.

3.4.2. Weitere vergleichende Analysemodelle

Vergleich zentraler Tendenzen

Für mehrfaktorielle Vergleiche bietet sich zur Orientierung und Faktorenbewertung ein multivariates Analysemodell (GLM - Allgemein mehrfaktoriell) an. Zu registrierende signifikante Effekte können Zusammenhänge zwischen potentiellen Einflussfaktoren und der Expression der auf den Lymphozyten markierten Oberflächenmoleküle aufdecken. Mit dieser statistischen Prozedur ist es möglich, Regressions- und Varianzanalysen für eine stetige abhängige Variable (z. B. CD25⁺) mit verschiedenen Faktoren (unabhängige Variablen: Geschlecht, Alter und Histologie) durchzuführen. Die als Faktoren definierten Variablen unterteilen die Grundgesamtheit in Gruppen. Mit Hilfe des GLM kann man Nullhypothesen über die Effekte anderer Variablen auf die Mittelwerte verschiedener Gruppierungen einer einzelnen abhängigen Variable testen. Es besteht die Option, Wechselwirkungen zwischen Faktoren, sowie Effekte einzelner Faktoren zu untersuchen, von denen einige zufällig sein können. Unser Ziel bestand darin, festzustellen, ob die registrierten phänotypischen TIL-Profile mit dem Alter, dem Geschlecht der Patienten, der Organlokalisation und/oder dem histologischen Subtyp des Tumors in Zusammenhang gebracht werden können. Der Kenntnis vorhandener signifikanter Unterschiede zwischen den untersuchten Patientengruppen (z. B. Lungen- und Nierenzellkarzinome) bzw. signifikanter Einflüsse einiger untersuchter Faktoren (z. B. Organlokalisation) schlossen sich weiterführende statistische Berechnungen an. Um den ermittelten Zusammenhang zwischen Alter und CD13-Expression auf T-Zellen von Nierenzellkarzinomen genauer zu beschreiben, erfolgte an diesem Punkt die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson und die grafische Darstellung der Assoziation. Auf diese Weise werden lineare Abhängigkeiten zwischen zwei Zufallsvariablen berechnet, wobei die Normalverteilung der Beobachtungen als Voraussetzung gilt. Je näher der Betrag des Korrelationskoeffizienten bei

1 liegt, desto weniger Streuung besteht in der Beziehung der beiden Variablen zueinander und desto stärker ist die lineare Beziehung.

Einfaktorielle Vergleiche

Die für die einzelnen Oberflächenmoleküle auf den Lymphozyten berechneten Mittelwerte sollten weiterhin auf Unterschiede zwischen Patientengruppen mit verschiedenen Tumorerkrankungen geprüft werden. Für Mittelwertvergleiche zwischen zwei Gruppen wurde der T-Test, zwischen mehr als zwei Gruppen der T-Test mit multipler Bonferroni-Korrektur angewandt. Die Verfahren basieren auf der Annahme, dass die zu untersuchende Stichprobe eine Normalverteilung aufweist. Zu diesem Zweck wurden die einzelnen Fallgruppen vor weiteren Berechnungen auf ihre Normalverteilung überprüft. Lag in den Untersuchungsgruppen keine Normalverteilung vor, oder handelte es sich um Gruppen mit sehr kleinen Fallzahlen ($n < 10$), wurden die Prozeduren für nichtparametrische Tests durchgeführt. Bei Vergleichen zweier unabhängiger Stichproben kam der Mann-Whitney-U-Test zum Einsatz, bei welchem die tatsächlichen Datenwerte durch Ränge ersetzt und die Zugehörigkeit der Gruppen zu einer Grundgesamtheit überprüft werden (98).

3.4.3. Grafische Darstellung der Ergebnisse als Boxplots

Die mit Hilfe der flowzytometrischen Messungen ermittelten Daten für die einzelnen CD-Moleküle wurden nach entsprechender Gruppierung unter Angabe des jeweiligen Mittelwertes, der Standardabweichung, des Medians und der Spannweite mit einem minimalen und maximalen Wert in Tabellenform ausgewiesen. Eine grafische Darstellung als Boxplots diente der Visualisierung der Daten und Gegenüberstellung der Gruppen. Bei Boxplots handelt es sich um auf dem Median basierende Diagramme unter Angabe der Quartile, Extremwerte und Ausreißer. Die Box stellt den Interquartilbereich mit den mittleren 50 % der Werte dar. Die quer über die Box verlaufende Linie gibt die Lage des Medians, die von der Box ausgehenden Linien den größten und kleinsten Wert an. Werte, welche zwischen 1,5 und 3 Boxlängen vom oberen oder unteren Rand der Box entfernt sind, werden als Ausreißer speziell markiert (o). Die angegebenen Extremwerte (*) umfassen Fälle, welche mehr als 3 Balkenlängen von der oberen oder unteren Kante des Balkens entfernt liegen (Abb. 3).

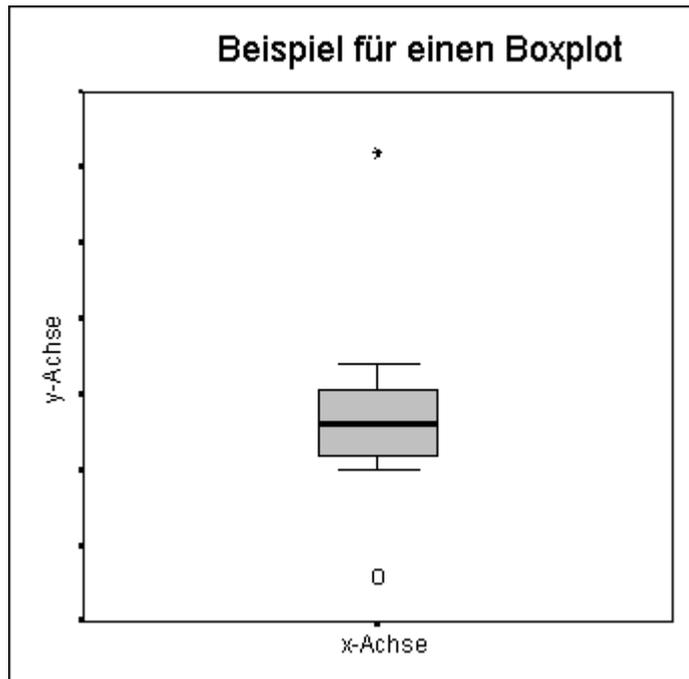


Abb. 3: Beispiel für einen Boxplot. Auf diese Weise können die statistisch ermittelten Daten unter Berücksichtigung des Medians dar werden. Die "Box" schließt als Streuungsmaß einen bestimmten Interquartilbereich der Werte (z. B. 50 %) ein. Weiterhin werden Extremwerte (o) und Ausreißer (*) gezeigt.

4. Ergebnisse

4.1. Überlebensanalyse bei Lungenkarzinomen

Für die Auswertung der Überlebensstatistik zur Untersuchung des prognostischen Einflusses bestimmter T-Zellpopulationen wurden Gewebeprobe von 119 Patienten (98 Männer und 21 Frauen) mit primärem Lungenkarzinom nach erfolgter chirurgischer Resektion zwischen Juli 1990 und Februar 1997 gewonnen. Die Patienten wiesen ein Durchschnittsalter von 61,5 Jahren auf (Range: 29 - 81 Jahre). Die histologische Klassifikation der Lungenkarzinome ergab unter Berücksichtigung der WHO-Kriterien (103): 72 Plattenepithelkarzinome (60,5 %), 29 Adenokarzinome (24,4 %), 4 kleinzellige Lungenkarzinome (3,4 %), 4 großzellige Lungenkarzinome (3,4 %) und 10 adenosquamöse Karzinome (8,4 %). Bis zum festgelegten Stichtag der letzten Nachkontrolle (1.11.1997) waren 67 Patienten (56,3 %) verstorben, 52 (43,7 %) hatten überlebt. Dabei betrug die durchschnittliche Überlebenszeit 17,75 Monate (Range: 1 - 55 Monate).

Die TNM-Klassifikation (64) der Resektate führte zu folgenden Ergebnissen: 11 mit Tumorstadium 1 (9,2 %), 73 mit Tumorstadium 2 (60,8 %), 27 mit Tumorstadium 3 (22,7 %), 8 mit Tumorstadium 4 (6,7 %). Bezüglich des Befalls der regionalen Lymphknoten lag bei 63 Patienten das Stadium N0 (52,9 %), bei 25 N1 (21,0 %) und bei 31 N2 (26,1 %) vor. Die Suche nach Fernmetastasen war bei 110 Patienten (92,4 %) negativ und bei 9 (7,6%) positiv. Unter Berücksichtigung des Differenzierungsgrades boten sich folgende Ergebnisse: 3 Patienten Grading 1 (2,5 %), 63 Patienten Grading 2 (52,9 %), 46 Patienten Grading 3 (38,7 %) und 3 Patienten Grading 4 (2,5 %). Die Einschätzung der Tumorausbreitung zum Zeitpunkt der Resektion ergab: Stadium I in 51 (42,9 %) Fällen, Stadium IIA bzw. IIB in 24 (20,2 %) Fällen, Stadium IIIA in 27 (22,7 %), Stadium IIIB in 8 (6,7 %) und Stadium IV in 9 (7,6 %). Der Tumor konnte bei 96 Patienten (80,7 %) vollständig entfernt werden. Bei 16 (13,4 %) Patienten war dies nicht der Fall. Für 7 Patienten wurden diesbezüglich keine Angaben gefunden.

Für T-Zellen (CD3⁺), B-Zellen (CD19⁺), NK-Zellen, CD4⁺-und CD8⁺-T-Zellen erfolgen alle Angaben in Prozent der Lymphozyten; für die restlichen Oberflächenantigene: HLA-DR, CD56 und/oder 16, CD13, CD11b, CD25, CD57, CD45RO, CD69, CD54, CD49a und CD26 in Prozent der T-Lymphozyten. Das Verhältnis von CD4⁺/CD8⁺-T-Zellen wird nach Berechnung als Ratio angegeben. Es ließen sich stark schwankende Expressionsdichten der jeweils markierten Oberflächenantigene feststellen. Um einen möglichen Einfluss des T-Zell-Phänotyps auf das Überleben des Patienten zu ermitteln, erfolgte für jedes CD-Molekül eine Einteilung in drei Gruppen. Die Festlegung der Grenzen basierte auf Erfahrungswerten und Vergleichen einer früheren Veröffentlichung (81). Die Zuordnung in eine der drei Gruppen richtete sich danach, ob die untersuchten Lymphozyten das markierte Oberflächenmolekül in geringem (Gruppe 1), moderatem (Gruppe 2) oder großem Umfang (Gruppe 3) aufwiesen.

Die aus der univariaten Analyse (Kaplan-Meier-Schätzung, Logrank-Test) resultierenden

Effekte wurden, ebenso wie die Ergebnisse der multivariaten Analyse (Cox-Regressionsmodell) in Tabelle 2 zusammengefasst. Nach Adjustierung (Histologie, TNM-Klassifizierung und Grading) kamen nur nichtkleinzellige Lungenkarzinome ohne Residualtumor mit Tumorstadium 1, 2 und 3 sowie einem histologischen Differenzierungsgrad von 2 und 3 zur Auswertung. Die grafische Darstellung der Ergebnisse aus der univariaten und der multivariaten Analyse (Abb. 4/1 bis 4/34) erfolgte für jedes untersuchte CD-Molekül einzeln und wurde einander gegenüber gestellt.

Die Überlebenswahrscheinlichkeit steht nach univariater und multivariater Analyse nicht mit der Höhe des Anteils der B-, T- und NK-Zellen an den TIL in Zusammenhang. Es konnten zwischen der Höhe der exprimierten Oberflächenantigene CD4, CD8, HLA-DR, CD56 und/oder CD16, CD13, CD25, CD57, CD45RO, CD69, CD49a sowie dem Verhältnis CD4/CD8 keine signifikanten Beziehungen zur Dauer der Überlebenszeit ermittelt werden.

Nach univariater Analyse liegt für CD11b ein signifikanter Effekt zwischen den untersuchten Gruppen und der Überlebenszeit vor ($p = 0,01$; Abb. 4/21). Dieser Effekt wird nach Adjustierung und multivariater Analyse grafisch deutlich sichtbar (Abb. 4/22). Die Gruppe 2 weist im Vergleich zur Referenzgruppe 1 ein signifikant geringeres relatives Risiko ($RR = 0,4$; $p = 0,04$) auf. Ein für Gruppe 3 erhöhtes relatives Risiko ($RR = 1,43$) kann nicht signifikant bestätigt werden.

Die univariate Analyse bleibt bei CD54 ohne signifikanten Effekt (Abb. 4/29). Im Gegensatz dazu zeigt sich nach multivariater Analyse für Gruppe 2 ($RR = 0,33$; $p = 0,03$) ein geringeres relatives Risiko im Vergleich zur Gruppe 1. Das Risiko zu versterben ist für Gruppe 3 im Vergleich zu Gruppe 1 ebenfalls verringert ($RR = 0,39$; $p = 0,08$) und marginal signifikant (Abb. 4/30).

Signifikante Unterschiede fehlen bei CD26 nach univariater Analyse zwischen den drei Gruppen (Abb. 4/33). Nach Adjustierung und multivariater Analyse ergibt sich ein signifikanter Effekt für Gruppe 2 ($RR = 0,36$; $p = 0,05$) im Vergleich zur Referenzgruppe 1 (Abb. 4/34). Das für Gruppe 3 ebenfalls geringere relative Risiko ($RR = 0,71$; $p = 0,64$) bleibt ohne Signifikanz.

Tab. 2: Univariate und multivariate (Adjustierung nach Histologie, TNM-Klassifizierung und Grading) Analyse prognostischer Faktoren für das Überleben bei Lungenkarzinomen (n = 119)
* p < 0,05

Faktor	Grenze	Gruppe	Univariate Analyse		Auswahl : Nichtkleinzeller ohne Residualtumor, Tumorstadium 1 bis 3, Grading 2 und 3		
			Anzahl n	Signifikanz p	Anzahl n	Relatives Risiko RR	Signifikanz p
			Kaplan-Meier-Schätzung		Adjustierte Analyse (Cox-Regression)		
CD3 in % der Lymphozyten	≤ 69	1	34	0,17	24	1	
	≥ 70 - 82	2	44		32	0,79	0,57
	≥ 83	3	41		28	1,43	0,32
CD19 in % der Lymphozyten	≤ 9	1	40	0,53	26	1	
	≥ 10 - 20	2	40		30	0,74	0,50
	≥ 21	3	39		28	0,69	0,37
NK-Zellen in % der Lymphozyten	≤ 3	1	49	0,85	37	1	
	≥ 4 - 10	2	47		36	1,18	0,63
	≥ 11	3	23		11	1,17	0,77
CD4 in % der Lymphozyten	≤ 30	1	53	0,06	34	1	
	≥ 31 - 45	2	46		34	0,45	0,06
	≥ 46	3	20		16	0,88	0,76
CD8 in % der Lymphozyten	≤ 25	1	42	0,54	34	1	
	≥ 26 - 40	2	50		33	1,20	0,61
	≥ 41	3	27		17	1,75	0,20
Ratio CD4/CD8	≤ 0,7	1	20	0,37	10	1	
	≥ 0,8 - 2,0	2	74		54	0,70	0,47
	≥ 2,1	3	25		20	0,41	0,14
HLA-DR in % der T-Lymphozyten	≤ 39	1	25	0,30	22	1	
	≥ 40 - 60	2	51		34	1,04	0,92
	≥ 61	3	43		28	1,62	0,26
CD56 und/oder 16 in % der T-Lymphozyten	≤ 3	1	40	0,47	30	1	
	≥ 4 - 7	2	47		38	1,56	0,25
	≥ 8	3	31		17	2,06	0,10
CD13 in % der T-Lymphozyten	≤ 9	1	41	0,29	34	1	
	≥ 10 - 19	2	49		34	1,56	0,22
	≥ 20	3	29		16	1,59	0,30

Fortsetzung Tab. 2

Faktor	Grenze	Gruppe	Univariate Analyse		Auswahl : Nichtkleinzeller ohne Residualtumor, Tumorstadium 1 bis 3, Grading 2 und 3		
			Kaplan-Meier-Schätzung		Adjustierte Analyse (Cox-Regression)		
			Anzahl n	Signifi- kanz p	Anzahl n	Relatives Risiko RR	Signifi- kanz p
CD25 in % der T- Lymphozyten	≤ 15	1	30	0,16	23	1	
	≥ 16 - 24	2	43		31	0,63	0,30
	≥ 25	3	38		27	0,95	0,92
CD11b in % der T- Lymphozyten	≤ 11	1	32	0,01*	25	1	
	≥ 12 - 20	2	47		34	0,41	0,04*
	≥ 21	3	39		24	1,43	0,43
CD57 in % der T- Lymphozyten	≤ 12	1	23	0,58	20	1	
	≥ 13 - 19	2	12		7	0,80	0,83
	≥ 20	3	17		7	2,28	0,31
CD45RO in % der T- Lymphozyten	≤ 87	1	9	0,62	7	1	
	≥ 88 - 95	2	38		31	0,81	0,75
	≥ 96	3	21		19	0,84	0,80
CD69 in % der T- Lymphozyten	≤ 84	1	21	0,92	15	1	
	≥ 85 - 94	2	44		36	0,82	0,68
	≥ 95	3	9		8	0,81	0,78
CD54 in % der T- Lymphozyten	≤ 19	1	34	0,81	25	1	
	≥ 20 - 30	2	19		17	0,33	0,03*
	≥ 31	3	20		16	0,39	0,08
CD49a in % der T- Lymphozyten	≤ 25	1	20	0,37	15	1	
	≥ 26 - 42	2	32		26	0,54	0,30
	≥ 43	3	19		16	0,54	0,26
CD26 in % der T- Lymphozyten	≤ 35	1	17	0,60	15	1	
	≥ 36 - 46	2	29		26	0,36	0,05*
	≥ 47	3	20		13	0,71	0,64

Die nachfolgenden Abbildungen enthalten die grafische Darstellung der Ergebnisse der Überlebensanalyse von 119 Patienten mit NSCLC aus Tabelle 2. Für jedes Lymphozytenoberflächenmolekül werden die Resultate aus univariater und multivariater Analyse einander gegenüber gestellt. Für jede Gruppe (1 - 3) erfolgt die Angabe der festgelegten Grenzen in Prozent der Lymphozyten (CD3, CD19, NK-Zellen, CD4 und CD8) bzw. in Prozent der T-Lymphozyten (alle weiteren Oberflächenmoleküle) und die Anzahl (n) der Patienten. Die Markierung der Abbildung mit (*) weist auf einen signifikanten Effekt ($p < 0,05$) nach univariater bzw. mindestens einem signifikantem Ergebnis nach multivariater Analyse hin.

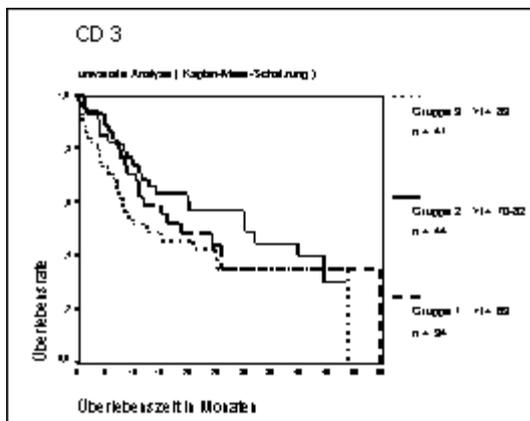


Abb. 4/1: Ergebnisse der univariaten Analyse für CD3⁺ Lymphozyten (Prozent der Lymphozyten) in NSCLC.

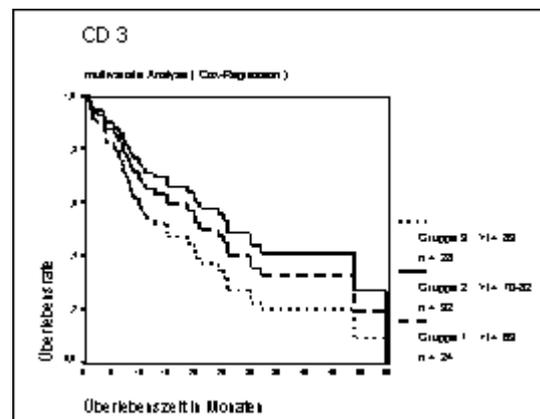


Abb. 4/2: Ergebnisse der multivariaten Analyse für CD3⁺ Lymphozyten (Prozent der Lymphozyten) in NSCLC.

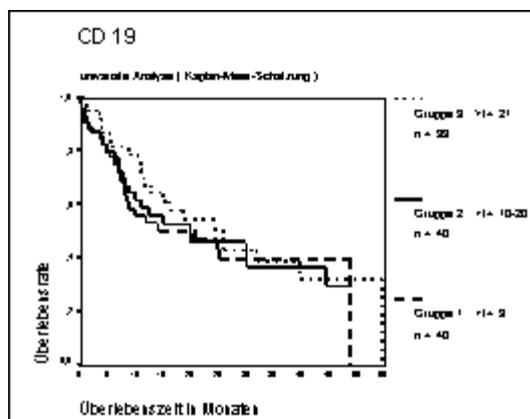


Abb. 4/3: Ergebnisse der univariaten Analyse für CD19⁺ Lymphozyten (Prozent der Lymphozyten) in NSCLC.

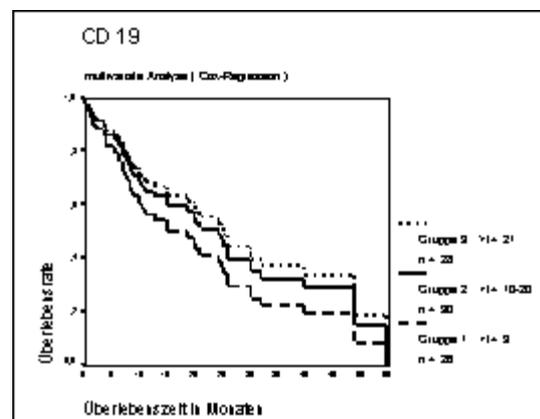


Abb. 4/4: Ergebnisse der multivariaten Analyse für CD19⁺ Lymphozyten (Prozent der Lymphozyten) in NSCLC.

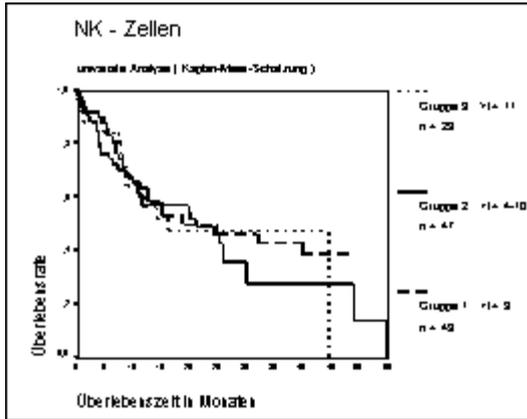


Abb. 4/5: Ergebnisse der univariaten Analyse für NK-Zellen (Prozent der Lymphozyten) in NSCLC.

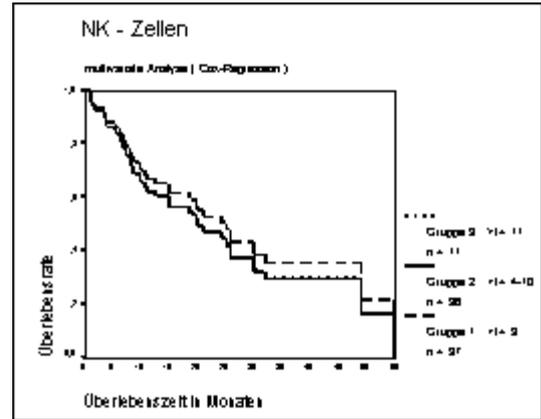


Abb. 4/6: Ergebnisse der multivariaten Analyse für NK-Zellen (Prozent der Lymphozyten) in NSCLC.

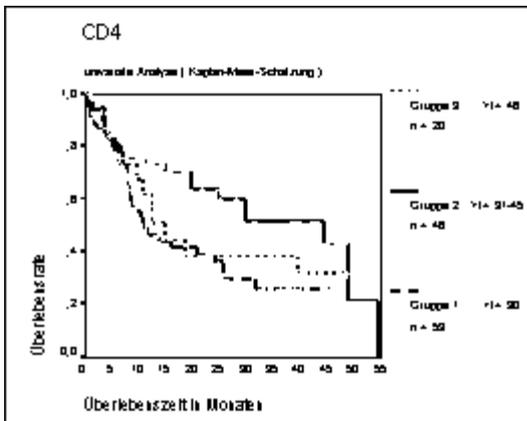


Abb. 4/7: Ergebnisse der univariaten Analyse für CD4⁺-T-Zellen (Prozent der Lymphozyten) in NSCLC.

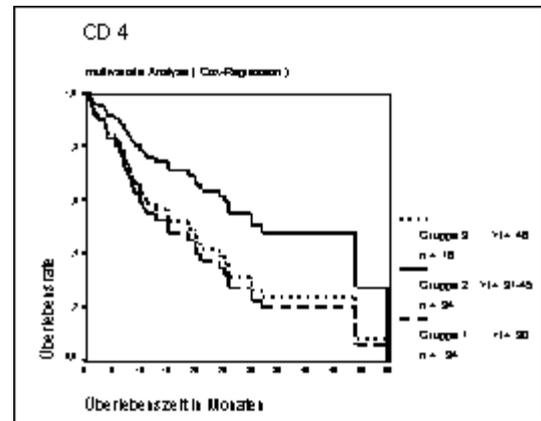


Abb. 4/8: Ergebnisse der multivariaten Analyse für CD4⁺-T-Zellen (Prozent der Lymphozyten) in NSCLC.

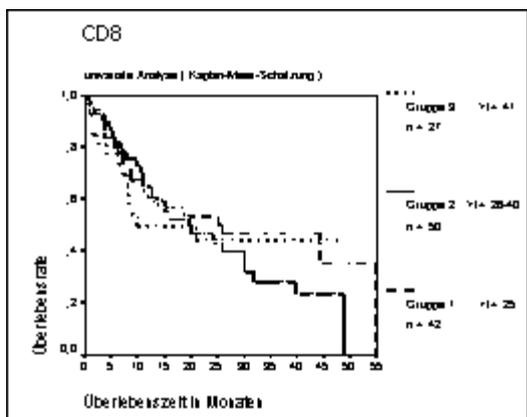


Abb. 4/9: Ergebnisse der univariaten Analyse für CD8⁺-T-Zellen (Prozent der Lymphozyten) in NSCLC.

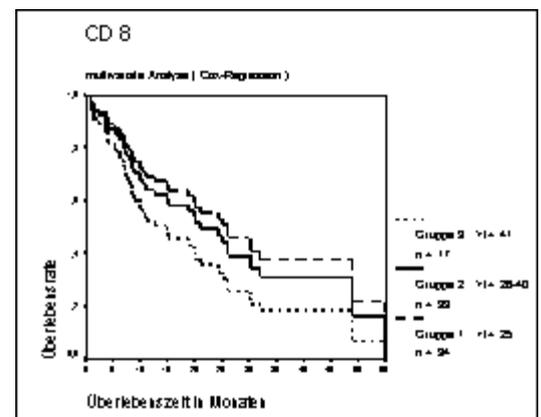


Abb. 4/10: Ergebnisse der univariaten Analyse für CD8⁺-T-Zellen (Prozent der Lymphozyten) in NSCLC.

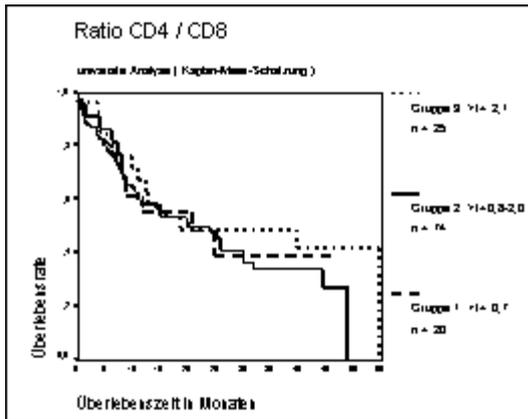


Abb. 4/11: Ergebnisse der univariaten Analyse für Ratio CD4⁺/CD8⁺-T-Zellen (Prozent der T-Lymphozyten) in NSCLC.

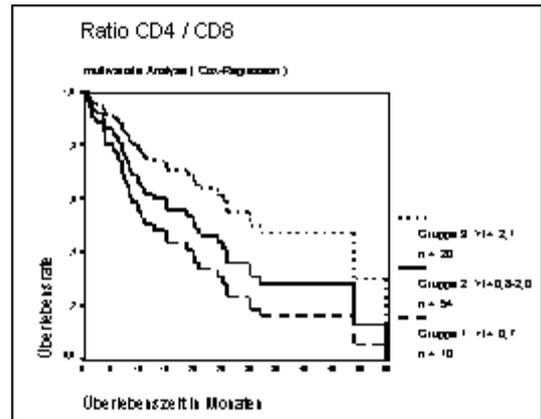


Abb. 4/12: Ergebnisse der multivariaten Analyse für Ratio CD4⁺/CD8⁺-T-Zellen (Prozent der T-Lymphozyten) in NSCLC.

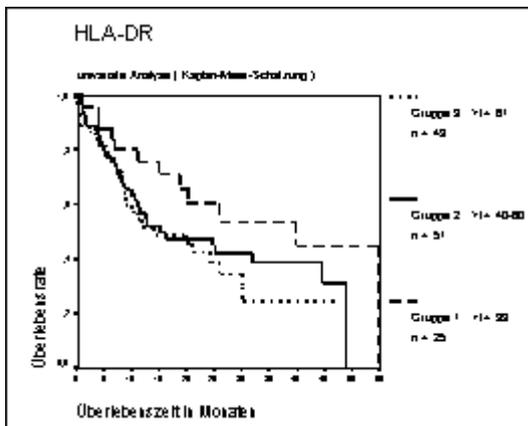


Abb. 4/13: Ergebnisse der univariaten Analyse für HLA-DR⁺-T-Zellen (Prozent der T-Lymphozyten) in NSCLC.

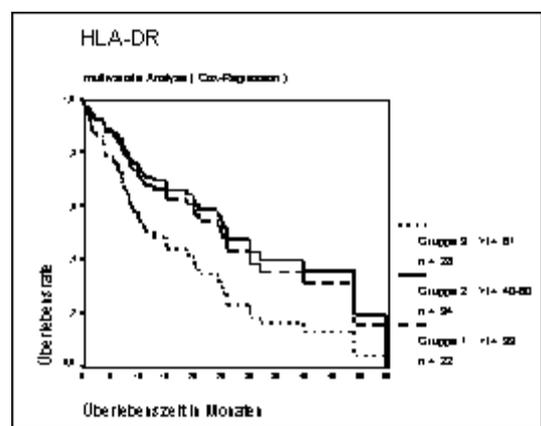


Abb. 4/14: Ergebnisse der multivariaten Analyse für HLA-DR⁺-T-Zellen (Prozent der T-Lymphozyten) in NSCLC.

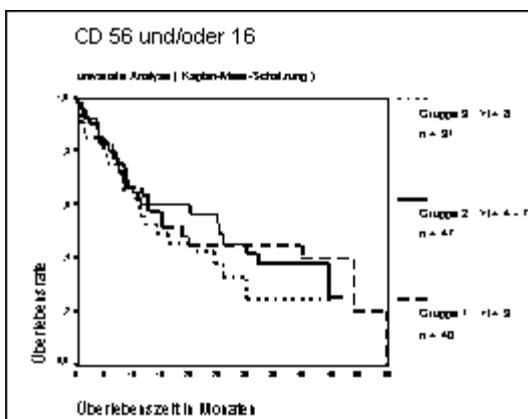


Abb. 4/15: Ergebnisse der univariaten Analyse für CD56⁺- und/oder CD16⁺-T-Zellen (Prozent der T-Lymphozyten) in NSCLC.

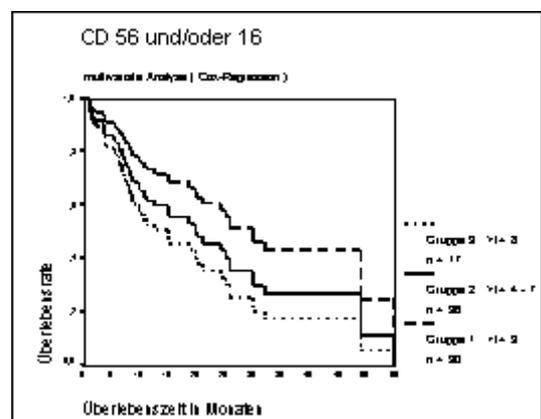


Abb. 4/16: Ergebnisse der multivariaten Analyse für CD56⁺- und/oder CD16⁺-T-Zellen (Prozent der T-Lymphozyten) in NSCLC.

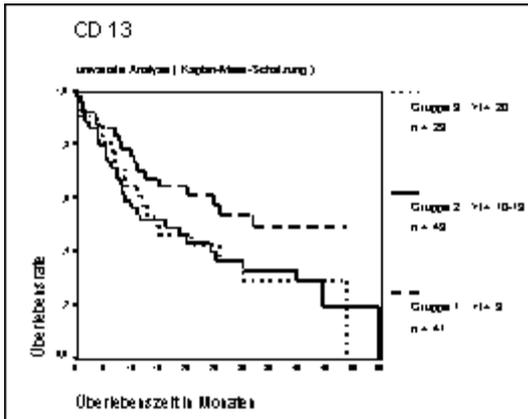


Abb. 4/17: Ergebnisse der univariaten Analyse für CD13⁺-T-Zellen (Prozent der T-Lymphozyten) in NSCLC.

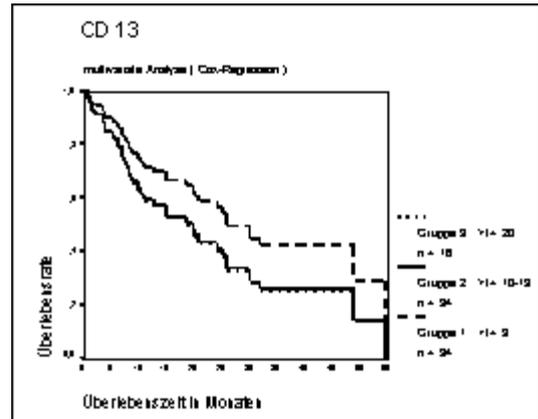


Abb. 4/18: Ergebnisse der multivariaten Analyse für CD13⁺-T-Zellen (Prozent der T-Lymphozyten) in NSCLC.

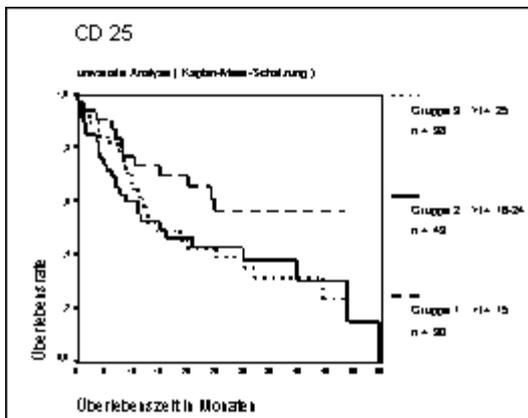


Abb. 4/19: Ergebnisse der univariaten Analyse für CD25⁺-T-Zellen (Prozent der T-Lymphozyten) in NSCLC.

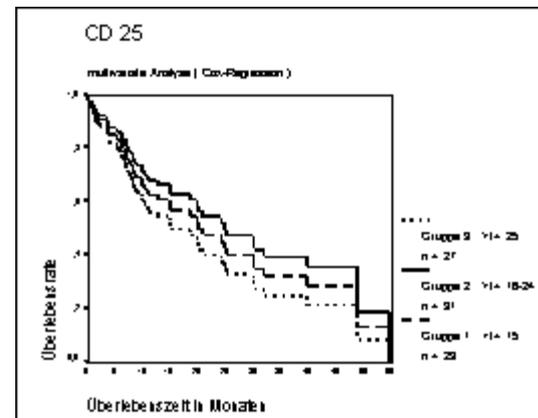


Abb. 4/20: Ergebnisse der multivariaten Analyse für CD25⁺-T-Zellen (Prozent der T-Lymphozyten) in NSCLC.

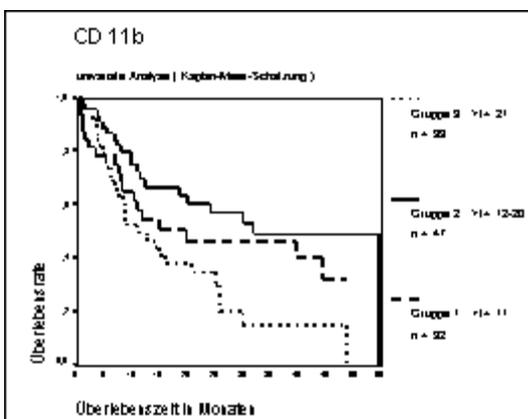


Abb. 4/21*: Ergebnisse der univariaten Analyse für CD11b⁺-T-Zellen (Prozent der T-Lymphozyten) in NSCLC ($p = 0,01$).

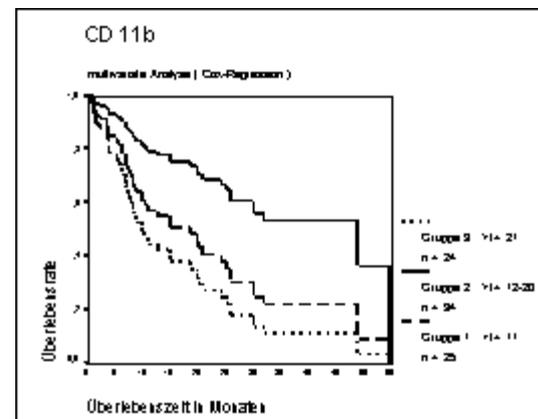


Abb. 4/22*: Ergebnisse der multivariaten Analyse für CD11b⁺-T-Zellen (Prozent der T-Lymphozyten) in NSCLC ($p = 0,04$ zwischen den Gruppen 1 und 2).

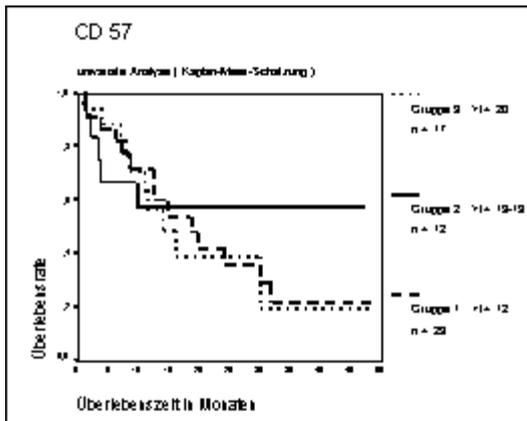


Abb. 4/23: Ergebnisse der univariaten Analyse für CD57⁺-T-Zellen (Prozent der T-Lymphozyten) in NSCLC.

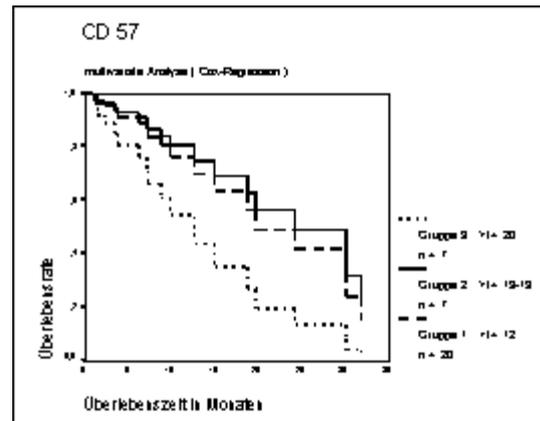


Abb. 4/24: Ergebnisse der multivariaten Analyse für CD57⁺-T-Zellen (Prozent der T-Lymphozyten) in NSCLC.

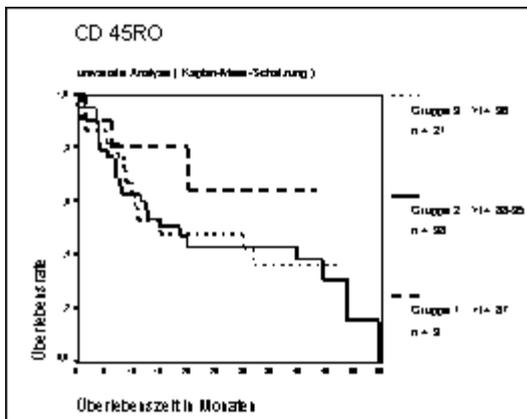


Abb. 4/25: Ergebnisse der univariaten Analyse für CD45RO⁺-T-Zellen (Prozent der T-Lymphozyten) in NSCLC.

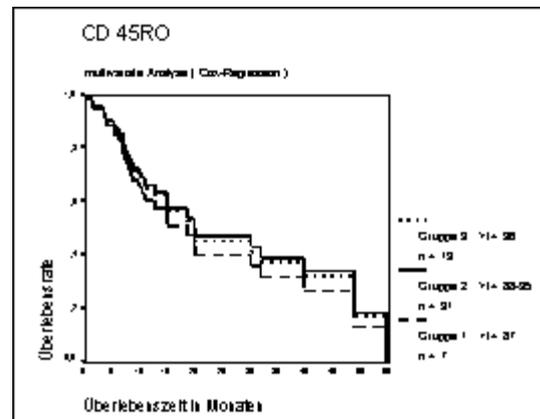


Abb. 4/26: Ergebnisse der multivariaten Analyse für CD45RO⁺-T-Zellen (Prozent der T-Lymphozyten) in NSCLC.

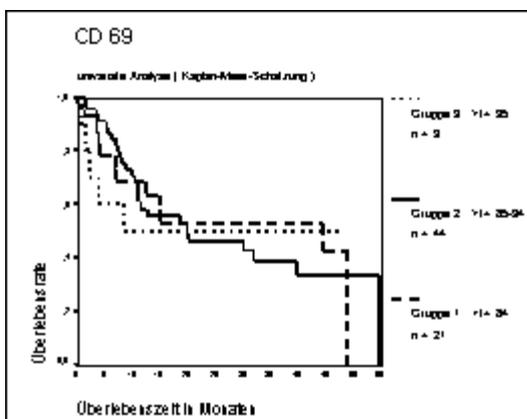


Abb. 4/27: Ergebnisse der univariaten Analyse für CD69⁺-T-Zellen (Prozent der T-Lymphozyten) in NSCLC.

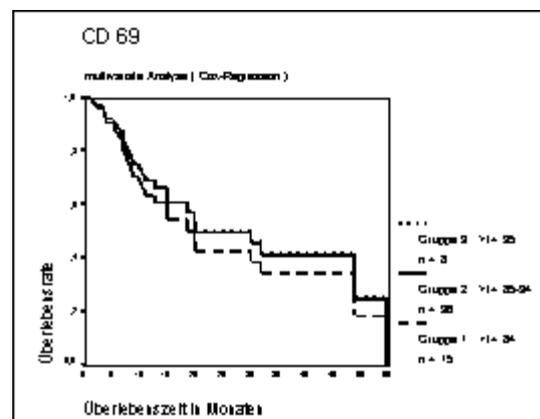


Abb. 4/28: Ergebnisse der multivariaten Analyse für CD69⁺-T-Zellen (Prozent der T-Lymphozyten) in NSCLC.

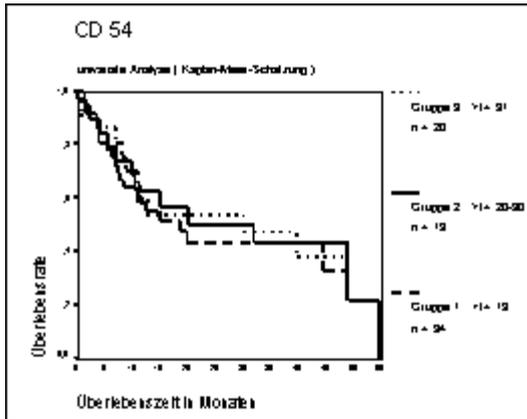


Abb. 4/29: Ergebnisse der univariaten Analyse für CD54⁺-T-Zellen (Prozent der T-Lymphozyten) in NSCLC.

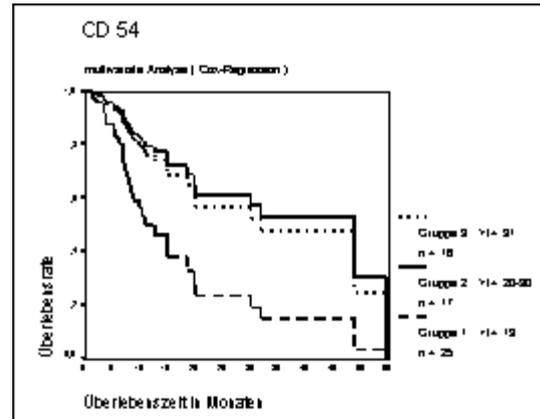


Abb. 4/30*: Ergebnisse der multivariaten Analyse für CD54⁺-T-Zellen (Prozent der T-Lymphozyten) in NSCLC (p = 0,03 zwischen den Gruppen 1 und 2).

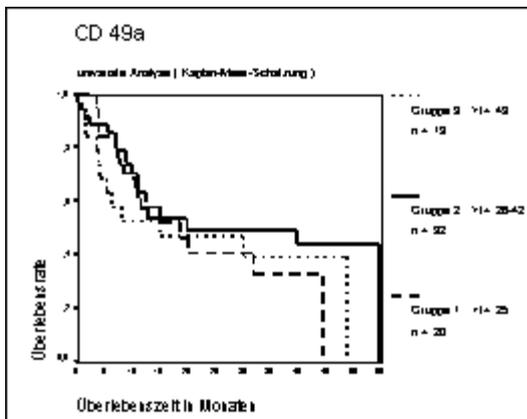


Abb. 4/31: Ergebnisse der univariaten Analyse für CD49a⁺-T-Zellen (Prozent der T-Lymphozyten) in NSCLC.

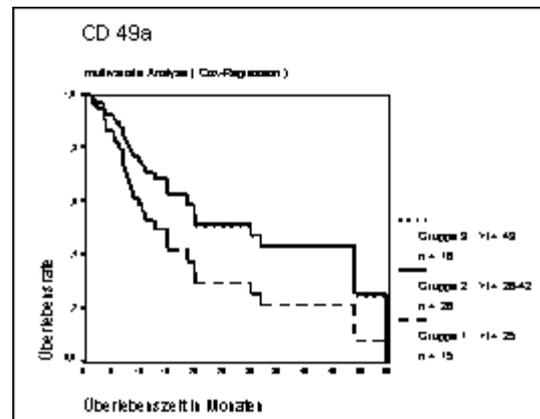


Abb. 4/32: Ergebnisse der multivariaten Analyse für CD49a⁺-T-Zellen (Prozent der T-Lymphozyten) in NSCLC.

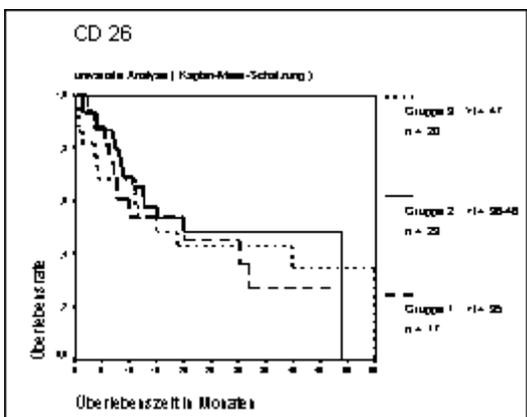


Abb. 4/33: Ergebnisse der univariaten Analyse für CD26⁺-T-Zellen (Prozent der T-Lymphozyten) in NSCLC.

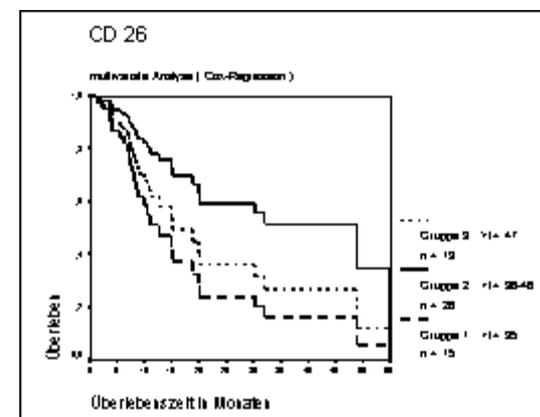


Abb. 4/34*: Ergebnisse der multivariaten Analyse für CD26⁺-T-Zellen (Prozent der T-Lymphozyten) in NSCLC (p = 0,05 zwischen den Gruppen 1 und 2).

4.2. Vergleichende Aufbereitung von Tumorproben mit und ohne Kollagenase

Die von 12 Nierenzellkarzinomen gewonnenen Resektate wurden in der ersten Untersuchungsgruppe mit einem Kollagenasezusatz behandelt. Für eine zweite Gruppe erfolgte keine Zugabe von Kollagenase. Anschließend wurden die flowzytometrischen Messergebnisse statistisch ausgewertet und die Gruppen miteinander verglichen (Mann-Whitney-U-Test). Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Dennoch sind bei der Gegenüberstellung der Daten Differenzen erkennbar. In der Kollagenasegruppe fallen die Messwerte für CD8⁺, CD11b⁺, CD13⁺, CD57⁺-T-Zellen sowie NK-Zellen geringer, für CD4⁺-T-Zellen höher aus als in Gruppe 2. Da eine Beeinflussung dieser Oberflächenmoleküle durch die Kollagenase nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, erachten wir einen einheitlichen Präparationsmodus für alle Resektate als notwendig. Für alle weiteren Tumorproben erfolgte die Aufbereitung wie unter 3.2. beschrieben mit dem Zusatz von 0,1 % Kollagenase. Die Vergleichsresultate der Probenbehandlung mit und ohne Kollagenase sind in Tabelle 3 zu finden.

Tab. 3: Ergebnisse der flowzytometrischen Messungen nach Probenbehandlung mit bzw. ohne Kollagenasezusatz bei hellzelliger Nierenzellkarzinomen

		Aufbereitung hellzelliger Nierenzellkarzinome						U -Test
		mit Kollagenase n = 12			ohne Kollagenase n = 12			
		median	mean ± SD	range	median	mean ± SD	range	
% der Lymphozyten	B-Zellen	3,0	4,4 ± 3,7	2 - 15	2,0	3,4 ± 3,1	1 - 12	0,26
	T-Zellen	78,5	75,4 ± 17,6	26 - 90	71,0	72,3 ± 16,9	39 - 95	0,43
	NK-Zellen	17,0	19,8 ± 17,9	26 - 90	24,0	23,9 ± 16,6	4 - 59	0,31
% der CD	CD4	23,0	25,0 ± 12,0	8 - 47	16,5	17,0 ± 9,9	1 - 36	0,12
	CD8	39,0	41,2 ± 16,0	20 - 74	52,0	51,9 ± 19,8	22 - 82	0,18
	Ratio CD4/CD8	0,7	0,8 ± 0,5	0,2 - 1,8	0,7	0,6 ± 0,3	0,1 - 1,2	0,36
% der T-Lymphozyten	HLA-DR	69,5	66,8 ± 16,9	39 - 91	65,5	61,2 ± 20,2	21 - 85	0,68
	CD56 und/oder 16	3,5	7,1 ± 8,3	1 - 32	7,5	9,9 ± 7,7	2 - 30	0,15
	CD13	34,0	33,7 ± 14,3	16 - 64	41,5	43,4 ± 21,8	8 - 80	0,20
	CD11b	18,5	26,8 ± 18,2	10 - 70	29,0	31,5 ± 16,8	7 - 58	0,66
	CD25	6,5	7,5 ± 4,4	3 - 17	6,0	7,1 ± 5,0	2 - 19	0,54
	CD57	29,0	26,4 ± 13,2	8 - 53	36,0	36,6 ± 11,1	22 - 55	0,09

4.3. Vergleiche des T-Zellphänotyps verschiedener Tumore

Für weitere Untersuchungen des T-Zellphänotypes wurden Proben von verschiedenen Karzinomen und Metastasen mit zum Teil bekanntem Primärtumor genutzt. Es handelte sich dabei um Tumorproben von Patienten, für welche keine vollständigen Überlebensdaten vorlagen, aber eine Aufbereitung und flowzytometrische Untersuchung erfolgte.

4.3.1. Primäre Lungen- und Nierenzellkarzinome

In einem multivariaten Modell (GLM - Allgemein mehrfaktoriell) suchten wir nach Zusammenhängen zwischen dem Phänotyp der TIL und der histologischen Diagnose, Alter und Geschlecht der Patienten. Die Daten von 125 Patienten mit Lungen- und 114 Patienten mit nichtchromophoben Nierenzellkarzinomen wurden statistisch bewertet. Die Gruppe der Lungenkarzinome setzte sich aus 21 weiblichen und 104 männlichen Patienten zwischen 29 und 81 Jahren (Durchschnittsalter 61,6 Jahre) zusammen. Bei 36 Frauen und 78 Männern im Alter zwischen 38 und 80 Jahren (Durchschnittsalter 60,2 Jahre) wurde ein Nierenzellkarzinom diagnostiziert.

In die multivariate Analyse gingen die Tumordiagnose (Lungen- oder Nierenzellkarzinom), Alter (≤ 55 bzw. > 55 Jahre) und Geschlecht als konstante Faktoren ein. Deren Einfluss auf folgende Variablen wurde beurteilt: Anteil der T-, B-, NK-Zellen, CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen (Prozent der Lymphozyten) sowie HLA-DR⁺-, CD56⁺- und/oder 16⁺-, CD13⁺-, CD11b⁺-, CD25⁺-, CD57⁺-T-Zellen (Prozent der T-Lymphozyten). Eine weitere Variable ergab sich als Ratio CD4⁺/CD8⁺-T-Zellen. Im dreifaktoriellen Modell (Faktoren: Alter, Geschlecht und Tumorentität) konnte für Lungen- und Nierenkarzinome ein signifikanter Effekt für die Tumorentität nachgewiesen werden (Tabelle 4). Es fand sich eine signifikante (GLM, $p < 0,05$) Abhängigkeit von der Tumorentität bezüglich der Infiltration des Tumorgewebes mit B- und NK-Zellen, CD4⁺-, HLA-DR⁺-, CD13⁺-, CD11b⁺-, CD25⁺-, CD57⁺-T-Zellen und des Verhältnisses CD4⁺/CD8⁺-T-Zellen (Tabelle 4).

Um dieses Ergebnis genauer zu prüfen, wurde ein Mittelwertvergleich zwischen beiden Tumorgruppen (Lungen- und Nierenzellkarzinom) für jede der oben bereits aufgeführten Variablen durchgeführt (Tabelle 4, Mann-Whitney-U-Test). Mit Ausnahme der T-Zellen ergaben sich für alle untersuchten Variablen signifikante Unterschiede zwischen den zwei Tumorgruppen. Dabei lagen bei den Lungenkarzinomen die Werte für B-Zellen, CD4⁺- und CD25⁺-T-Zellen, sowie das Verhältnis CD4⁺/CD8⁺-T-Zellen höher als bei den Nierenzellkarzinomen. Im Gegensatz dazu wies die RCC-Gruppe höhere Werte für NK-Zellen, CD8⁺-, CD56⁺- und/oder CD16⁺-, CD57⁺-, HLA-DR⁺-, CD13⁺- und CD11b⁺-T-Zellen im Vergleich zu den Lungentumoren auf (Tabelle 4). Da die Tumorentität auf das phänotypische Profil der TIL einen Einfluss zu haben scheint, sollte nun geprüft werden, ob die jeweiligen Tumorsubtypen der Lungen- bzw.

Nierenzellkarzinome mit dem Expressionsprofil der TIL in Assoziation stehen.

Tab. 4: Ergebnisse der flowzytometrischen Phänotypisierung von TIL in primären Lungen- und Nierenzellkarzinomen (nichtchromophob). Alle signifikanten Ergebnisse ($p < 0,05$) für den Mittelwertvergleich (U-Test) und die multivariate Analyse (GLM) sind grau unterlegt. p^* Ergebnisse der multivariaten Analyse (GLM, adjustiert auf Tumorentität (TE), Alter (A) und Geschlecht (G)) für den Faktor Tumorentität.

		primäres Lungenkarzinom n = 125			primäres Nierenzellkarzinom n = 114			U -Test	GLM (adjustiert auf TE, A, G)
		median	mean \pm SD	range	median	mean \pm SD	range	p	p^*
% der Lymphozyten	B-Zellen	14,0	18,3 \pm 14,3	1 - 57	4,0	5,6 \pm 5,9	1 - 37	< 0,001	< 0,001
	T-Zellen	76,0	73,7 \pm 14,3	38 - 97	79,0	77,1 \pm 12,4	40 - 96	0,084	0,49
	NK-Zellen	6,0	7,8 \pm 7,5	1 - 40	13,5	16,7 \pm 11,7	2 - 57	< 0,01	< 0,001
% der CD	CD4	31,0	32,2 \pm 11,6	5 - 65	27,0	28,2 \pm 13,5	1 - 71	< 0,001	< 0,05
	CD8	30,0	31,1 \pm 13,2	9 - 70	35,0	35,7 \pm 15,7	2 - 82	< 0,001	0,21
	Ratio CD4/CD8	1,3	1,5 \pm 1,0	0,1 - 7,2	1,0	1,1 \pm 0,8	0,1 - 5,9	< 0,001	< 0,01
% der T-Lymphozyten	HLA-DR	53,0	52,9 \pm 15,4	18 - 86	69,5	68,4 \pm 8,7	13 - 98	< 0,001	0,001
	CD56 und/oder CD16	4,0	7,1 \pm 8,5	1 - 58	6,0	8,7 \pm 10,8	1 - 80	0,03	0,43
	CD13	12,0	14,7 \pm 9,9	1 - 52	38,0	39,3 \pm 22,8	1 - 88	< 0,001	< 0,001
	CD11b	18,0	18,6 \pm 9,9	1 - 58	29,0	34,0 \pm 18,1	1 - 89	< 0,001	< 0,001
	CD25	20,0	20,8 \pm 8,4	5 - 53	8,0	8,4 \pm 4,4	1 - 22	< 0,001	< 0,001
	CD57	14,0	15,7 \pm 6,9	2 - 37	21,0	23,5 \pm 13,8	2 - 69	< 0,001	< 0,01

Das gewonnene Tumormaterial der Lungenkarzinome wurde histologisch in 76 Plattenepithelkarzinome, 30 Adenokarzinome, 4 kleinzellige, 4 großzellige und 11 adenosquamöse Karzinome unterteilt. In die multivariate Analyse gingen der Tumorsubtyp, das Alter (≤ 55 bzw. > 55 Jahre) und das Geschlecht als konstante Faktoren ein. Es erfolgte die Adjustierung auf Plattenepithel- und Adenokarzinome. Das Geschlecht und das Alter der Patienten, sowie der histologische Subtyp der Lungentumore blieben für alle CD-Moleküle ohne einen statistisch nachweisbaren, signifikanten Effekt. Wie aus unseren Berechnungen hervorgeht, scheinen die geprüften Faktoren Alter, Geschlecht und Tumorsubtyp für den Phänotyp der TIL in Plattenepithel- und Adenokarzinomen der Lunge von untergeordneter Relevanz zu sein. Die gewonnenen Daten aus der flowzytometrischen Analyse werden in Tabelle 5 aufgeführt und in den Abbildungen 10a -10i (Seite 58) veranschaulicht. Die sehr breite Streuung der ermittelten Werte mit vielen Ausreißern und stark differierende Fallzahlen ($n = 4 - 76$) der untersuchten Gruppen sprechen hier gegen weitere vergleichende statistische Untersuchungen.

Einige Auffälligkeiten aus Tabelle 5 sollten dennoch Erwähnung finden. Großzellige Lungenkarzinome enthielten nur wenig B-Lymphozyten. Sie wiesen im Gegensatz dazu den größten Anteil an T-Lymphozyten unter den TIL auf. Für die kleinzelligen Lungenkarzinome gelten diese Feststellungen in umgekehrter Form. Wir fanden dort im Vergleich zu den anderen Subtypen die höchsten Werte für B-Zellen und die geringsten für T-Zellen. Es fällt auch auf, dass die Proben der großzelligen Lungenkarzinome mehr als doppelt so viele CD8⁺-TITL wie CD4⁺-TITL enthielten. Daraus resultiert ein CD4⁺/CD8⁺-TITL Verhältnis < 1 im Vergleich zu den anderen vier Gruppen. Des Weiteren finden sich für HLA-DR⁺, CD56⁺- und/oder CD16⁺- und CD13⁺-TITL die höchsten Mittelwerte bei den großzelligen Karzinomen.

Tab. 5: Ergebnisse der flowzytometrischen Phänotypisierung der TIL in Lungenkarzinomen. Differenzierung der Tumore nach histologischem Befund (mean = Mittelwert, median = Median, range = Spanne zwischen dem kleinsten und größten gemessenen Wert)

			Subtypen des Lungenkarzinoms				
			Plattenepithelkarzinom	Adenokarzinom	Kleinzelliges Karzinom	Großzelliges Karzinom	Adenosquamoses Karzinom
% der Lymphozyten	B-Zellen	mean ± SD	18,8 ± 14,9	17,3 ± 14,2	31,0 ± 17,8	7,2 ± 5,1	16,7 ± 8,0
		median	13,0	13,5	34,5	6,0	15,0
		range	1 - 57	2 - 52	7 - 48	2 - 14	8 - 37
		n	76	30	4	4	11
	T-Zellen	mean ± SD	73,5 ± 15,1	73,8 ± 13,2	56,7 ± 13,3	86,0 ± 2,7	76,5 ± 10,0
		median	76,0	75,0	60,5	85,0	82,0
range		38 - 97	46 - 94	38 - 68	84 - 90	57 - 87	
n		76	30	4	4	11	
NK-Zellen	mean ± SD	7,5 ± 7,4	8,9 ± 8,6	12,2 ± 9,6	7,0 ± 5,3	6,0 ± 5,2	
	median	5,5	7,0	10,5	6,5	5,0	
	range	1 - 40	1 - 39	3 - 25	2 - 13	3 - 21	
	n	76	30	4	4	11	
CD4	mean ± SD	31,8 ± 11,6	33,4 ± 11,5	30,7 ± 10,8	23,2 ± 12,3	35,0 ± 12,2	
	median	30,0	34,0	30,0	28,5	33,0	
	range	5 - 55	13 - 65	21 - 42	5 - 31	17 - 54	
	n	76	30	4	4	11	
CD8	mean ± SD	30,5 ± 12,0	29,6 ± 14,4	23,2 ± 11,1	52,5 ± 12,1	32,9 ± 12,8	
	median	30,0	27,5	22,0	48,5	29,0	
	range	10 - 70	9 - 64	13 - 36	43 - 70	19 - 51	
	n	76	30	4	4	11	
Ratio CD4/ CD8	mean ± SD	1,5 ± 0,9	1,7 ± 1,3	1,8 ± 0,8	0,6 ± 0,3	1,6 ± 0,9	
	median	1,2	1,4	1,7	0,7	1,4	
	range	0,2 - 4,9	0,3 - 7,2	0,8 - 2,9	0,1 - 0,8	0,5 - 3,2	
	n	76	30	4	4	11	
% der T-Lymphozyten	HLA-DR	mean ± SD	53,0 15,9	50,7 ± 16,0	45,7 ± 12,0	65,2 ± 17,3	56,0 ± 8,0
		median	53,0	51,5	48,0	64,0	56,0
		range	18 - 85	22 - 78	31 - 56	47 - 86	42 - 66
		n	76	30	4	4	11
	CD56 und/ oder CD16	mean ± SD	6,2 ± 5,9	6,6 ± 6,1	18,7 ± 23,7	17,0 ± 27,3	6,1 ± 5,6
		median	4,5	5,0	8,5	3,5	4,0
		range	1 - 36	1 - 26	4 - 54	3 - 58	1 - 20
		n	76	30	4	4	11
	CD13	mean ± SD	15,2 ± 10,6	14,2 ± 6,5	10,2 ± 3,8	19,2 ± 22,0	12,7 ± 7,9
		median	13,0	12,0	11,0	10,5	10,0
range		1 - 50	3 - 30	5 - 14	4 - 52	4 - 33	
n		75	30	4	4	11	
CD11b	mean ± SD	17,3 ± 9,5	21,1 ± 11,0	16,2 ± 4,8	21,2 ± 14,5	20,8 ± 7,8	
	median	14,0	18,0	18,5	19,0	19,0	
	range	1 - 41	7 - 58	9 - 19	6 - 41	8 - 37	
	n	75	30	4	4	11	
CD25	mean ± SD	21,8 ± 8,2	18,7 ± 9,3	21,0 ± 4,3	18,0 ± 13,0	20,6 ± 6,3	
	median	20,0	17,5	20,0	18,0	22,0	
	range	9 - 40	6 - 53	17 - 27	5 - 31	9 - 31	
	n	71	28	4	3	11	
CD57	mean ± SD	15,0 ± 6,1	16,0 ± 1,6	20,7 ± 5,8	21,0 ± 9,9	15,2 ± 6,1	
	median	12,0	12,5	24,0	21,0	16,5	
	range	6 - 29	2 - 37	14 - 24	14 - 28	6 - 24	
	n	35	8	3	2	10	

Die Daten der Nierenzellkarzinome wurden, vergleichbar mit der Auswertung bei den Lungenkarzinomen, in einer multivariaten Analyse aufgearbeitet. Die histologischen Tumortypen schlossen 82 hellzellige, 8 chromophile, 2 chromophobe und 14 gemischtzellige Nierenzellkarzinome ein. In die Mischtyp-Gruppe fanden Tumore mit folgenden histopathologischen Diagnosen Eingang: hellzellig/chromophil/eosinophil bzw. hellzellig/chromophil. In 10 Fällen bot der pathologische Befund keine Möglichkeit einer Gruppenzuordnung. Diese Daten, sowie die beiden chromophoben RCC blieben in den weiteren Berechnungen unberücksichtigt. Dennoch sollte festgestellt werden, dass sich die chromophoben Nierenzelltumore in ihrem TIL-Phänotyp von den anderen Subtypen unterschieden. Sie zeichneten sich durch einen höheren Anteil CD4⁺- und CD25⁺-TIL aus. Es konnten im Vergleich zu den drei anderen Gruppen weniger NK-Zellen, CD8⁺-, HLA-DR⁺-, CD56⁺- und/oder 16⁺-, CD13⁺-, CD11b⁺- und CD57⁺-TIL registriert werden.

Im dreifaktoriellen Analysemodell wurde der Einfluss der Faktoren Tumorsubtyp, Alter und Geschlecht auf die von den TIL exprimierten CD-Moleküle auf alle nicht chromophoben Nierenzellkarzinome untersucht. Die histologische Subklassifizierung wirkte sich bei CD56⁺- und/oder 16⁺-TIL signifikant (GLM; $p = 0,03$) aus. Die Mittelwerte lagen für die Gruppe der gemischtzelligen Nierenzellkarzinome gegenüber den hellzelligen und chromophilen RCC etwa doppelt so hoch ($13,5 \pm 14,8$ gegenüber $7,4 \pm 6,7$ bzw. $8,7 \pm 6,9$ % der T-Lymphozyten, Tab. 6). Nach Mittelwertvergleich erwies sich der Unterschied zwischen den Gruppen der hellzelligen und gemischtzelligen RCC als signifikant (multipler Vergleich nach Bonferroni; $p < 0,05$, Abb. 5). Zusätzlich fanden wir bei CD13⁺-TIL für den Einflussfaktor Alter (Tab. 6) einen signifikanten Effekt (GLM; $p < 0,05$). Das Patientenalter korrelierte dabei negativ mit den registrierten Werten für CD13 auf den TIL (Korrelationskoeffizient $r = -0,2$; $p = 0,01$; Abb. 6). Da der Wert für r

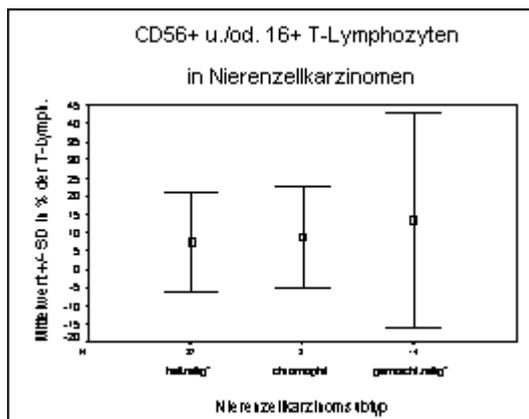


Abb. 5: Gegenüberstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung in Prozent der T-Lymphozyten für CD56⁺- und/oder 16⁺-T-Lymphozyten bei RCC-Subtypen.

* signifikanter Unterschied zwischen hellzelligen (n = 82) und gemischtzelligen (n = 14) Nierenzellkarzinomen nach Mittelwertvergleich (Bonferroni-Test; $p < 0,05$).

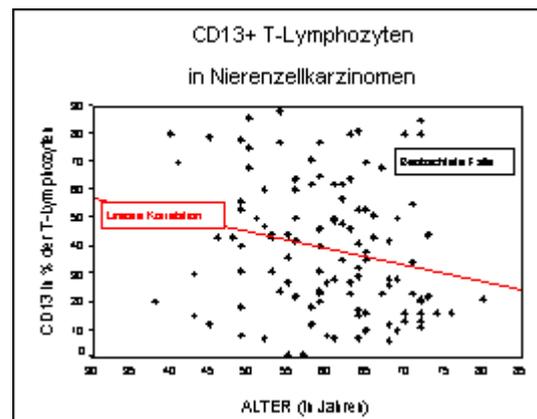


Abb. 6: Darstellung des Zusammenhangs zwischen den flowzytometrisch bestimmten Messwerten für CD13⁺-T-Lymphozyten in Nierenzellkarzinomen (n = 114) und dem Alter der Patienten (Pearson's Korrelationskoeffizient $r = -0,2$; $p = 0,01$).

näher an 0 als an 1 liegt, handelt es sich hier um eine relativ schwache Beziehung. Die weiterführende Suche nach Unterschieden im Expressionsverhalten der TIL in Abhängigkeit des Tumorgrades führte zum Nachweis eines signifikanten Effektes für CD8⁺-TIL in hellzelligen Nierenzellkarzinomen (n = 49) (Bonferroni-Test; p < 0,05). Der Anteil CD8⁺-TIL (Prozent der Lymphozyten) korrelierte mit dem Tumorgrad schwach positiv. Zwischen Grad I (geringe zelluläre Anaplasie) und Grad III (schwere zelluläre Anaplasie) waren die Differenzen signifikant (Abbildung 7: Korrelation nach Pearson r = 0,35; p < 0,01). Bei allen anderen CD-Molekülen blieb die Suche nach einem statistisch relevanten Einflussfaktor ergebnislos. Die gewonnenen Daten aus der flowzytometrischen Analyse sowie die Ergebnisse der multivariaten Analyse werden in Tabelle 6 aufgeführt.

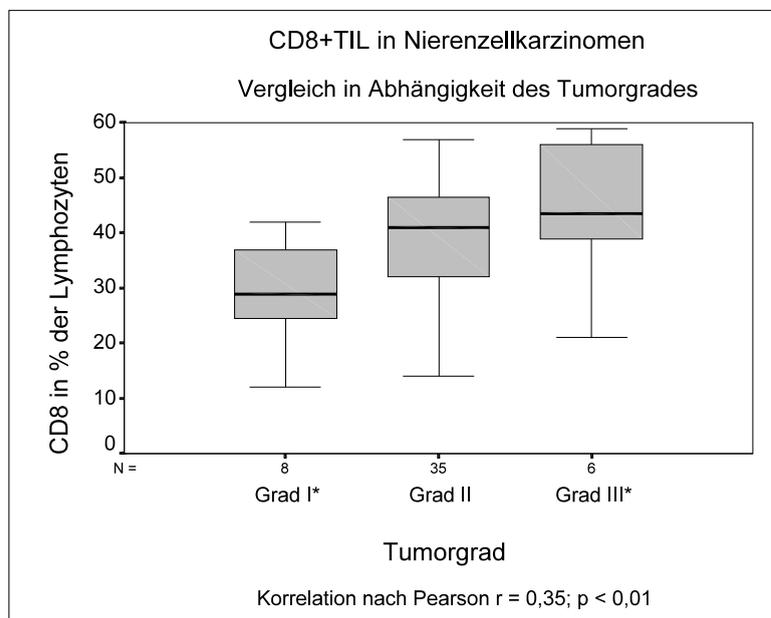


Abb. 7: Gegenüberstellung der Expression CD8⁺-TIL in hellzelligen Nierenzellkarzinomen (n = 49) in Abhängigkeit des Tumorgrades. * signifikanter Zusammenhang zwischen Grad I und III (Bonferroni; p < 0,05)

Tab. 6: Ergebnisse der flowzytometrischen Phänotypisierung TIL in Nierenzelltumorsubtypen (median = Median, mean = Mittelwert, range = Spanne zwischen kleinstem und größtem gemessenen Wert, n = Anzahl), signifikanter Einfluss des Faktors Tumorsubtyp* bzw. Patientenalter** nach adjustierter Analyse (GLM, adjustiert auf Tumorsubtyp, Alter und Geschlecht)

			Nierenzelltumorsubtypen				
			hellzellig	chromophil	gemischtzellig	chromophob	p (GLM)
% der Lymphozyten –	B-Zellen	mean ± SD median range n	5,6 ± 6,3 4,0 1 - 37 82	3,25 ± 2,5 2,5 1 - 8 8	7,1 ± 11,9 3,0 1 - 47 14	18,0 ± 2,8 18,0 16 - 20 2	-
	T-Zellen	mean ± SD median range n	77,1 ± 13,7 80,5 39 - 96 82	81,1 ± 14,5 85,0 47 - 92 8	75,4 ± 14,4 79,0 30 - 89 14	72,5 ± 3,5 72,5 70 - 75 2	-
	NK-Zellen	mean ± SD median range n	16,9 ± 12,8 13,0 2 - 59 82	14,9 ± 14,8 11,5 3 - 50 8	16,8 ± 6,7 17,0 9 - 32 14	9,5 ± 7,8 9,5 4 - 15 2	-
	CD4	mean ± SD median range n	27,0 ± 13,4 25,5 1 - 71 82	23,1 ± 10,9 28,0 9 - 33 8	24,5 ± 12,8 20,5 9 - 53 14	47,0 ± 2,8 47,0 45 - 49 2	-
	CD8	mean ± SD median range n	37,8 ± 15,5 35,5 2 - 82 82	36,1 ± 15,2 34,5 17 - 60 8	38,5 ± 15,0 36,5 21 - 77 14	26,5 ± 2,1 26,5 25 - 28 2	-
	Ratio CD4/ CD8	mean ± SD median range n	1,2 ± 0,9 1,0 0,1 - 5,9 82	0,9 ± 0,5 0,8 0,2 - 1,9 8	1,0 ± 0,8 0,8 0,2 - 2,8 14	1,8 ± 0 1,8 1,8 - 1,8 2	-
% der Lymphozyten	HLA-DR	mean ± SD median range n	67,0 ± 18,4 68,5 18 - 97 82	74,1 ± 19,7 69,0 38 - 98 8	75,6 ± 14,7 75,0 38 - 95 14	19,0 ± 8,5 19,0 13 - 25 2	-
	CD56 u./od. CD16	mean ± SD median range n	7,4* ± 6,7 5,5 1 - 42 82	8,7* ± 6,9 6,5 4 - 25 8	13,5* ± 14,8 8,0 3 - 59 14	5,0 ± 1,4 5,0 4 - 6 2	0,03*
	CD13	mean ± SD median range n	41,1** ± 22,8 40,5 6 - 88 82	33,7** ± 22,6 31,5 10 - 64 8	39,1** ± 20,1 41,5 12- 80 14	8,5 ± 10,6 8,5 1 - 16 2	< 0,05**
	CD11b	mean ± SD median range n	31,8 ± 16,7 27,5 7 - 80 82	44,6 ± 26,8 39,5 13 - 89 8	36,6 ± 14,5 33,5 13 - 67 14	6,5 ± 7,8 6,5 1 - 12 2	-
	CD25	mean ± SD median range n	8,0 ± 3,9 7,0 2 - 21 82	8,1 ± 4,7 7,5 3 - 15 8	8,8 ± 6,2 7,0 3 - 22 14	14,5 ± 4,9 14,5 11 - 18 2	-
	CD57	mean ± SD median range n	23,6 ± 13,0 22,0 2 - 69 65	19,7 ± 17,0 11,0 7 - 53 7	26,7 ± 14,7 22,0 9 - 50 12	4,5 ± 2,1 4,5 3 - 6 2	-

4.3.2. Sonstige Primärtumore und Lungenmetastasen

Bei der Auswertung des Studienmaterials wurden Patienten mit folgenden weiteren Tumordiagnosen registriert.

Tumor	Fallzahl	Tabelle	Seite	Abbildung	Seite
Lungenmetastasen mit bekanntem Primärtumor	16	7	62	12a - 12i	63
Mammakarzinome	4	8	65	13a - 13f	66
Lungenmetastasen mit bekanntem primären Mammakarzinom	6				
Magenkarzinome	21	9	39	14a - 14l	68
Ösophaguskarzinome	7				
Kolon-/Rektumkarzinom	5				
Meningiome/Astrozytome	5				
Blasenkarzinome	10				

Die vorliegenden Fallzahlen (n = 4 - 21) sind für weitere seriöse statistische Analysen zu gering. Das stark variierende Bild flowzytometrischer Messungen bei TIL unterschiedlichen Ursprungs weist dennoch einige erwähnenswerte Besonderheiten auf.

Die in Tabelle 7 und den Abbildungen 12a - 12i gegenüber gestellten Gruppen schließen Lungenmetastasen mit primären Tumoren der Mamma (n = 6), der Niere (n = 4), der Haut (Malignes Melanom, n = 4) und des Magen-Darm-Traktes (n = 2) ein. Eine deutlich höhere Expression CD13⁺- und CD57⁺-TIL der Nierenkarzinommetastasen im Vergleich zu den anderen drei Gruppen ist auffällig.

Die Gegenüberstellung der Mammakarzinome (n = 4) mit aus Mammakarzinomen hervorgegangenen Lungenmetastasen (n = 6) lässt keine deutlichen Unterschiede im flowzytometrischen Spektrum der TIL erkennen (Tab. 8 und Abb. 13a - 13f).

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse der flowzytometrischen Analyse und Phänotypisierung von Magen- (n = 21), Ösophagus-(n = 7), Rektum-/Kolon-(n = 5) und Blasenkarzinomen (n = 10) sowie einer Hirntumorgruppe (Astrozytome, n = 2; Meningiome, n = 3) aufgelistet und in den dazugehörigen Abbildungen 14a - 14l visualisiert. Bei der Bestimmung des B-Lymphozyten-Anteils fällt die Gruppe der Magenkarzinome mit einem relativ hohen Wert ($24,7 \pm 22,3$, Mittelwert \pm SD in Prozent der Lymphozyten) auf. Im Gegensatz dazu fanden wir in den Hirntumorproben nur sehr wenige B-Lymphozyten ($3,4 \pm 2,8$) und einen im Vergleich zu den anderen Gruppen um das Zwei- bis Dreifache höheren Anteil NK-Zellen ($29,8 \pm 13,0$). Bei der

Betrachtung der CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten und ihrem Verhältnis zueinander, wies die Hirntumorgruppe unter den fünf verschiedenen Tumorentitäten den geringsten Anteil CD4⁺-TITL ($12,8 \pm 3,6$) und den höchsten Anteil CD8⁺-TITL ($42,4 \pm 19,2$) auf, woraus sich ein sehr kleiner Wert für die Ratio CD4⁺/CD8⁺ ($0,44 \pm 0,17$) ergibt. Für die Ösophaguskarzinome wurden reziproke Anteile in den flowzytometrischen Messungen ermittelt; ein hoher CD4⁺-TITL-Anteil ($38,4 \pm 17,1$), geringer CD8⁺-Anteil ($18,6 \pm 6,0$) und ein entsprechend hoher Wert für das Verhältnis von CD4⁺/CD8⁺ ($2,8 \pm 2,5$). Bei Gegenüberstellung der registrierten HLA-DR⁺-TITL treten die Nierenkarzinome mit $68,4 \pm 18,2$ % der T-Lymphozyten im Vergleich zu den anderen Tumorgruppen deutlich hervor. In der Gruppe der Hirntumoren finden sich etwa doppelt so viele CD56⁺-und/oder CD16⁺- ($16,4 \pm 9,1$), CD11b⁺- ($43,2 \pm 32,3$) und CD57⁺- ($32,2 \pm 16,4$) TITL wie in den restlichen Gruppen. Bei den Magen- und Nierenzellkarzinomen fällt weiterhin ein relativ hoher Anteil CD13⁺- ($20,0 \pm 18,6$ und $39,3 \pm 22,8$) TITL auf. Die Gruppe der Ösophaguskarzinome liegt bei der Expression CD25⁺- ($32,4 \pm 19,0$) TITL gegenüber den Magenkarzinomen ($15,2 \pm 10,9$) und Hirntumoren ($15,7 \pm 21,1$) etwa doppelt so hoch, gegenüber den RCC ($8,4 \pm 4,4$) sogar um das Dreifache höher.

Die Ergebnisse (Tab. 9) belegen deutliche Unterschiede in den phänotypischen Eigenschaften der TIL der einzelnen untersuchten Tumorentitäten. Es ergeben sich bei den einzelnen Tumorgruppen Muster. So lassen sich bei den Nierentumoren gegenüber den anderen Gruppen hohe Werte für HLA-DR⁺- sowie CD13⁺-TITL herausstellen. Bei den Hirntumoren sind ein hoher Anteil NK-Zellen mit einem hohen Anteil CD8⁺-, CD57⁺- und CD11b⁺-TITL kombiniert. Die Ösophaguskarzinome weisen neben einem hohen Anteil von CD4⁺-Helferzellen gleichzeitig hohe Werte bei der Expression von CD25⁺-TITL auf. In wie weit diese Differenzen und phänotypischen Muster von Bedeutung sind, müssen Studien mit größeren Fallzahlen und zusätzlichen Informationen zu potentiell beeinflussenden Faktoren zeigen. Auf der Suche nach Gründen für diese Unterschiede spielen nicht zuletzt die TNM-Klassifikationen, pathohistologische Daten zum Tumor, der Diagnosezeitpunkt, durchgeführte therapeutische Maßnahmen, Nachfolgeuntersuchungen, die Überlebenszeit und Patientencharakteristika eine Rolle.

Tab. 9: Ergebnisse der flowzytometrischen Phänotypisierung von TIL in Primärtumoren unterschiedlicher Lokalisation (mean = Mittelwert, median = Median, range = Spanne zwischen kleinstem und größtem Wert, n = Anzahl) Die jeweilige Tumorgruppe mit den höchsten gemessenen Werten für die exprimierten CD-Oberflächenmoleküle wurden hellgrau unterlegt.

			Primärtumorklassifikation						
			Lunge	Niere	Ösophagus	Magen	Kolon / Rektum	Blase	Hirn
% der Lymphozyten	B-Zellen	mean ± SD	18,3 ± 14,3	6,1 ± 7,1	19,4 ± 10,0	24,7 ± 22,4	16,8 ± 16,2	8,0 ± 4,8	3,4 ± 2,8
		median	14,0	4,0	18,0	16,0	10,0	9,2	2,0
		range	1 - 57	1 - 47	5 - 36	1 - 64	1 - 38	3 - 17	1 - 8
		n	125	116	7	21	5	10	5
	T-Zellen	mean ± SD	73,7 ± 14,3	76,8 ± 13,4	71,7 ± 11,6	66,9 ± 21,3	75,0 ± 18,8	80,6 ± 9,4	66,8 ± 14,5
		median	76,0	79,5	71,0	70,0	84,0	82,0	71,0
		range	38 - 97	30 - 96	58 - 92	22 - 98	52 - 95	60 - 93	45 - 83
		n	125	116	7	21	5	10	5
	NK-Zellen	mean ± SD	7,8 ± 7,5	16,7 ± 12,1	8,6 ± 5,7	7,8 ± 6,8	8,0 ± 4,1	10,0 ± 8,9	29,8 ± 13,0
		median	6,0	13,0	7,0	7,0	10,0	6,5	24,0
range		1 - 40	2 - 59	2 - 18	1 - 30	3 - 12	2 - 31	16 - 51	
n		125	116	7	21	5	10	5	
CD4	mean ± SD	32,2 ± 11,6	27,0 ± 13,1	38,4 ± 17,1	24,8 ± 13,3	36,0 ± 18,9	28,8 ± 15,5	12,8 ± 3,6	
	median	31,0	26,0	36,0	23,0	30,0	27,0	13,0	
	range	5 - 65	1 - 71	16 - 72	2 - 46	16 - 57	2 - 52	9 - 18	
	n	125	116	7	21	5	10	5	
CD8	mean ± SD	31,1 ± 13,2	37,1 ± 14,8	18,6 ± 6,0	29,8 ± 18,9	20,6 ± 9,7	33,2 ± 14,9	42,4 ± 19,2	
	median	30,0	35,5	18,0	20,0	17,0	33,5	40,0	
	range	9 - 70	2 - 82	9 - 29	9 - 81	11 - 31	6 - 54	16 - 66	
	n	125	116	7	21	5	10	5	
Ratio CD4/CD8	mean ± SD	1,5 ± 1,3	1,1 ± 0,8	2,8 ± 2,5	1,4 ± 0,9	2,1 ± 1,2	1,6 ± 1,2	0,4 ± 0,2	
	median	1,3	1,0	2,0	1,0	2,0	1,3	0,4	
	range	0,1 - 7,2	0,1 - 5,9	1,1 - 8,4	0,2 - 3,6	0,4 - 3,8	0,4 - 4,5	0,2 - 0,6	
	n	125	116	7	21	5	10	5	
% der T-Lymphozyten	HLA-DR	mean ± SD	52,9 ± 15,4	68,1 ± 19,0	55,4 ± 17,5	53,5 ± 19,5	51,6 ± 20,8	54,3 ± 17,5	53,4 ± 27,4
		median	53,0	69,5	57,0	53,0	53,0	58,0	56,0
		range	18 - 86	13 - 98	35 - 80	23 - 92	30 - 74	19 - 74	19 - 87
		n	125	116	7	21	5	10	5
	CD56 und/oder CD16	mean ± SD	7,1 ± 8,5	8,9 ± 10,9	8,0 ± 3,6	7,8 ± 5,4	8,6 ± 3,8	7,9 ± 9,2	16,4 ± 9,1
		median	4,0	6,0	7,0	6,0	9,0	4,0	13,0
		range	1 - 58	1 - 80	6 - 16	1 - 22	4 - 14	1 - 31	5 - 28
		n	125	116	7	21	5	10	5
	CD13	mean ± SD	14,7 ± 9,9	38,9 ± 23,0	16,3 ± 10,1	20,0 ± 18,6	15,4 ± 3,9	11,9 ± 6,6	11,4 ± 9,9
		median	12,0	37,0	15,0	13,0	14,0	9,0	10,0
range		1 - 52	1 - 88	4 - 34	1 - 64	12 - 22	3 - 21	1 - 28	
n		124	116	7	21	5	10	5	
CD11b	mean ± SD	18,6 ± 9,9	34,2 ± 18,1	20,8 ± 12,0	18,8 ± 12,1	22,4 ± 4,5	17,8 ± 12,7	43,2 ± 32,3	
	median	18,0	29,0	21,0	15,0	21,0	14,0	29,5	
	range	1 - 58	1 - 89	7 - 43	4 - 45	17 - 28	6 - 46	23 - 91	
	n	124	116	7	21	5	10	4	
CD25	mean ± SD	20,8 ± 8,4	8,3 ± 4,4	32,4 ± 19,0	15,2 ± 10,9	21,8 ± 5,0	24,7 ± 7,2	15,7 ± 21,1	
	median	20,0	8,0	30,0	10,0	22,0	25,0	7,0	
	range	5 - 53	1 - 22	13 - 67	2 - 40	17 - 29	16 - 36	2 - 47	
	n	117	116	7	21	5	10	4	
CD57	mean ± SD	15,7 ± 6,9	23,1 ± 13,8	12,1 ± 5,4	11,8 ± 6,2	9,0 ± 6,7	12,7 ± 6,6	32,2 ± 16,4	
	median	14,0	21,0	11,0	11,5	7,0	10,0	28,0	
	range	2 - 37	2 - 69	6 - 18	3 - 25	2 - 18	4 - 27	18 - 55	
	n	58	94	7	20	5	10	4	

5. Diskussion

5.1. Epidemiologie der häufigsten Tumorerkrankungen

In den letzten Jahren hat es zahlreiche Fortschritte in Diagnostik und Therapie von Tumorerkrankungen gegeben. Dennoch zählt der Krebs bei der immer älter werdenden Bevölkerung neben Herz-Kreislaufkrankungen heute zur häufigsten Todesursache. Nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts in Berlin liegt die Zahl der malignen Neuerkrankungen für Lungenkarzinome in Deutschland bei etwa 36.800 jährlich (13). Das entspricht einer Inzidenzrate von 16,6 % aller malignen Neuerkrankungen bei Männern und 5 % bei Frauen (Abb. 8 und 9). Mit 27.900 jährlich erkrankten Männern nimmt der Lungenkrebs die zweite Stelle in der Rangfolge der häufigsten Krebserkrankungen ein. Ein bei Männern zu beobachtender leicht rückläufiger Trend steht im Gegensatz zu einem Anstieg der malignen Neuerkrankungen für Lungentumoren bei Frauen und wird auf das veränderte Rauchverhalten der weiblichen Bevölkerung in den letzten Jahren zurückgeführt (5). Nierenzellkarzinome werden bei etwa 13.900 Tumorpatienten jährlich in Deutschland diagnostiziert, wobei die Häufigkeit bei Männern höher liegt als bei Frauen (13). In der folgenden Tabelle 10 sind diesbezüglich geschätzte Zahlen der von uns untersuchten Tumoren aufgeführt. Die sich anschließenden Abbildungen geben die prozentualen Anteile an der Gesamtzahl der malignen Neuerkrankungsfälle für die männliche (Abb. 8) und weibliche (Abb. 9) Bevölkerung in Deutschland wider.

Tab. 10: Auszug aus dem Krebsregister: Geschätzte Zahlen jährlich an Krebs Erkrankter in Deutschland (13)

Tumorlokalisation	Männer	Frauen
Lunge	27.900	8.900
Niere	8.200	5.700
Brustdrüse	400	46.300
Magen	9.500	9.000
Speiseröhre	3.100	900
Dickdarm	15.100	19.200
Mastdarm	11.900	10.700
Harnblase	10.500	5.200

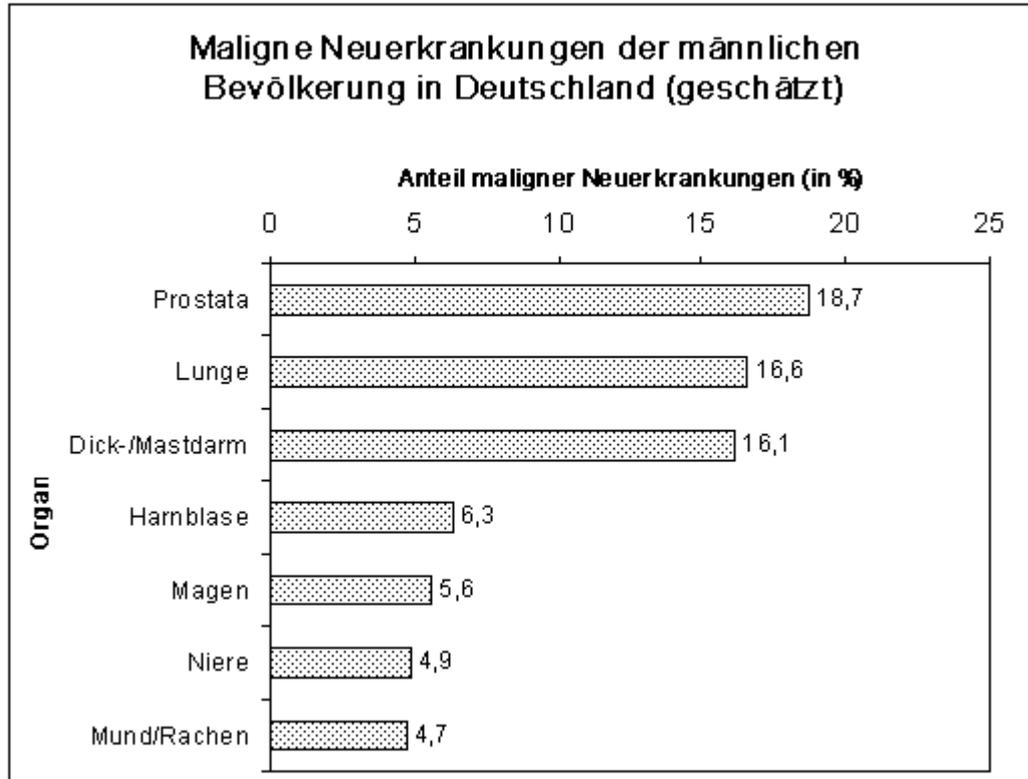


Abb. 8: Maligne Neuerkrankungen der männlichen Bevölkerung in Deutschland (insgesamt 1668.462 Fälle)

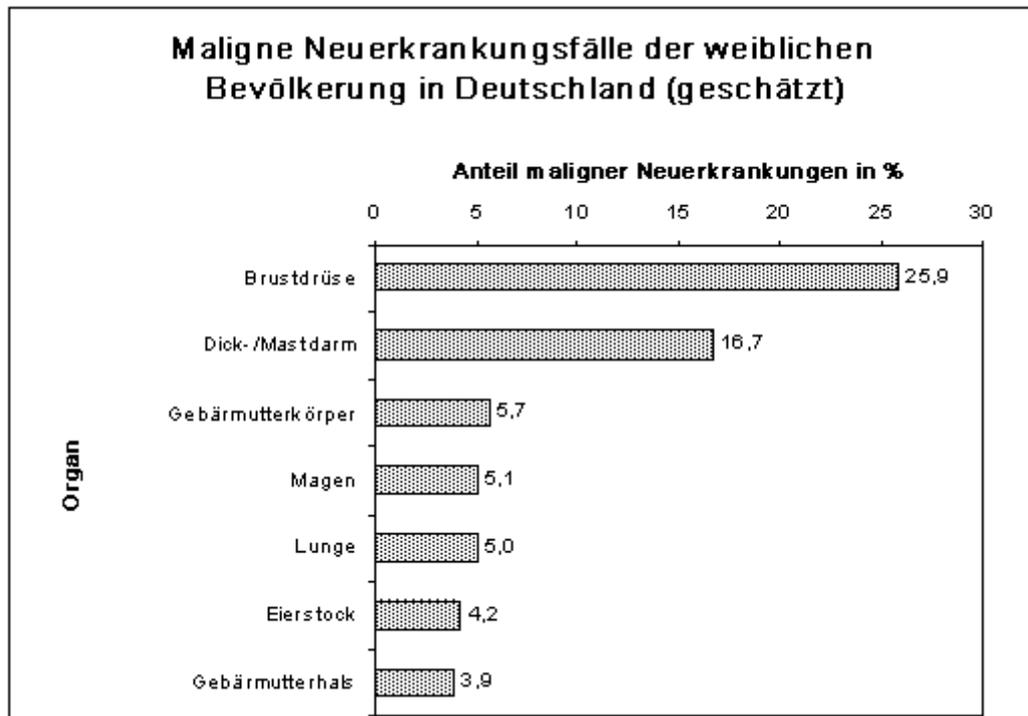


Abb. 9: Maligne Neuerkrankungen der weiblichen Bevölkerung in Deutschland (insgesamt 178.755 Fälle)

Bei unterschiedlichen Häufigkeiten zählen sowohl Lungenkarzinome in einem fortgeschrittenen Tumorstadium als auch metastasierte Nierenzellkarzinome zu einer prognostisch ungünstigen Krebsform. Die durchschnittliche relative Fünf-Jahres-Überlebensrate für Nierenzellkarzinome liegt bei 50 % (36). Patienten mit einem diagnostizierten Tumorstadium I und II überleben zu 80 - 90 % die folgenden fünf Jahre. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate sinkt auf unter 10 %, wenn es bereits zu einer metastasierenden Tumorausbreitung gekommen ist (13). Nach wie vor stellt die operative Therapie eine zentrale Rolle dar, auch wenn durch adjuvante Maßnahmen (z. B. Immuntherapie mit Interferon und IL-2) in seltenen Fällen objektive Remissionen bei Patienten mit Metastasen erzielt werden können (13, 36, 95).

Bei den Lungenkarzinomen betragen die Überlebensraten 10 % für das Tumorstadium IIIA bei alleiniger chirurgischer Therapie und liegen für das Stadium IIIB noch darunter. Die Durchführung einer neoadjuvanten Chemo- oder Chemo-/Radiotherapie mit anschließender Operation scheint die Prognose der Patienten mit Stadium IIIA signifikant zu verbessern und führte in Phase-II-Studien zu Fünf-Jahres-Überlebensraten von etwa 30 % (14, 29). Diese Zahlen zeigen, dass trotz der immer wirksameren Behandlungsmethoden die Vision der Krebsheilung noch in weiter Ferne steht. Neben den klassischen Behandlungsprinzipien wie Chirurgie, Radio- und Chemotherapie wird versucht, ausgehend von neuen Ansatzpunkten weitere Therapiekonzepte zu finden und zu etablieren.

5.2. Genese und Immunologie der Tumoren

Energiereiche Strahlen, chemische Kanzerogene und Viren werden als ätiologische Faktoren für die Krebsentstehung angesehen. Am Ende der in mehreren Stufen über einen längeren Zeitraum ablaufenden Karzinogenese steht die Tumormanifestation. Die Tumorzellen weichen in ihren Eigenschaften vom Verhalten gesunder Zellen (autonomes, infiltrierendes, zerstörendes Wachstum, Metastasierung) ab. Sie entstehen aus normalen Zellen durch Tumortransformation. Diese resultiert aus einer Expression zusätzlicher oder veränderter genetischer Informationen, wobei zwei Klassen von Genen eine Rolle spielen. Es handelt sich dabei um Onkogene und Tumorsuppressor-Gene (54). Die verantwortlichen Onkogene befinden sich bereits im Genom normaler Zellen als Proto-Onkogene mit transformierender Potenz. Analysen der von Onkogenen kodierten Proteine belegen deren physiologische Bedeutung für die Regulation von Wachstum und Entwicklung. Der Übergang vom Proto-Onkogen in das Onkogen kann durch Mutationen, Chromosomenaberrationen, eine verstärkte Expression des Protoonkogens oder verlängerte Wirkung seiner Produkte (z. B. p53-Protein) verursacht werden (17, 54). Der mutationsbedingten Aktivierung von Onkogenen steht die Ausschaltung der Tumorsuppressor-Gene gegenüber. Diese bewirkt einen Verlust von regulierenden Funktionen. Bei familiär gehäuft auftretenden Tumorformen, konnte eine Deletion von Chromosomenabschnitten nachgewiesen werden ((z. B. kleinzelliges Lungenkarzinom del 3(p), familiäres Nierenzellkarzinom t (8;3) (q24; p12)) (21, 57, 108).

Die Tumorimmunologie ist ein relativ junger Wissenschaftszweig und bietet die Möglichkeit, neben anderen Forschungszweigen wie der Molekularbiologie und Genforschung, genauere Informationen über die ablaufenden Prozesse der Tumorabwehr zu erhalten. Sie versucht, die Vorgänge bei der Detektion tumorös veränderter Gewebe durch Zellen des Immunsystems aufzuklären und untersucht die Mechanismen zur Eliminierung entarteter Zellen. Die Erkenntnisse sollen die Ursachen für eine ineffektive Tumorüberwachung und -abwehr aufdecken und Möglichkeiten zur Beseitigung der Defizite aufzeigen. Die Tumorimmunologie bedient sich dabei apparativer Untersuchungsmethoden zur Zell- und Gewebedifferenzierung (Immunhistochemie, Flowzytometrie).

Im Verlauf der malignen Transformation von Tumorzellen können Veränderungen der Oberflächenstrukturen auftreten (Expression von Tumorantigenen, Verlust von MHC-Molekülen) und eine Erkennung der Tumorzellen als fremd wird möglich. Die ausgelösten sowohl humoralen als auch zellulären Immunreaktionen, an denen Lymphozyten in erheblichem Maße beteiligt sind, führen zur Bildung spezifischer Antikörper und Killerzellen gegen die registrierten Tumorantigene. Zwischen beiden Effektorsystemen des Immunsystems existieren sehr komplexe spezifische und unspezifische, kooperative und regulative Beziehungen. So provozieren durch das Tumorwachstum bedingte Zellnekrosen in der Umgebung Entzündungsreaktionen. Dabei spielen Makrophagen eine wichtige Rolle. Makrophagen nehmen über Phagozytose Tumorzellbruchstücke auf und präsentieren diese in bearbeiteter Form über MHC-Moleküle den T-Zellen. Erst durch diese Komplexbildung können die Antigenfragmente von T-Zellen erkannt werden. Dies führt im weiteren Verlauf zur T-Zell-Aktivierung und entsprechenden zytotoxischen Tumorabwehrreaktionen. Makrophagen setzen außerdem das endogene Pyrogen IL-1 frei und bewirken so eine Verstärkung der beschriebenen immunologischen und entzündlichen Reaktionen (10).

Wie entzieht sich der Tumor diesen Abwehrreaktionen?

Die Tumorzellen entwickeln verschiedene Mechanismen, um der Wirtsabwehr zu entgehen. Der Nachweis einiger dieser Strategien, das Immunsystem abzulenken, gelang bei malignen Melanomen (90). Das Antigenfragment muss den zytotoxischen T-Lymphozyten über ein MHC-Klasse-I-Molekül präsentiert werden. Einige Tumorzellen verringern die Expression der synthetisierten MHC-Klasse-I-Moleküle an ihrer Zelloberfläche. Sie verhindern damit ihre Registrierung und Eliminierung durch T-Zellen. Melanomzellen sind in der Lage, MHC-Klasse-II-Moleküle ohne das kostimulierende Molekül B7-1/CD80 oder B7-2/CD86 zu exprimieren. In der Umgebung dieser Tumorzellen finden sich größere Ansammlungen von CD4⁺-T-Zellen, die das Antigen erkennen, aber durch den fehlenden kostimulierenden Faktor B7 spezifisch inhibiert werden (90). Zusätzlich sezernieren viele Tumorzellen, wie auch NSCLC, die auf Lymphozyten suppressiv wirkenden Zytokine IL-10 und TGF- β (8). Die ausgeprägte antigenetische Heterogenität des Tumors stellt eine weitere Herausforderung für das Immunsystem dar. Es

ist vorstellbar, dass die Erzeugung großer Zellmassen durch das schnelle neoplastische Wachstum die Abwehrmechanismen überfordert.

Ein wichtiger Weg, über den ein Apoptose-Signal in das Zellinnere weitergeleitet werden kann, läuft über das Fas(CD95/APO-1)/Fas-Ligand(FasL)-System. Indem die Tumorzellen FasL exprimieren und mit den aktivierten T-Zellen in direkten Kontakt treten, können sie Apoptose in den T-Zellen induzieren und die gegen sie gerichteten Abwehrzellen vernichten (66).

Die hier erwähnten Strategien zum "immunological escape" des Tumors sprechen für die Vermutung, dass im Organismus viel häufiger maligne Zellen durch fehlerhafte genetische Informationsübertragungen entstehen. Diese werden jedoch durch eine intakte Immunüberwachung bis zu einem bestimmten Zeitpunkt immer wieder eliminiert. Wann der Organismus dazu nicht mehr in der Lage ist und warum den Tumor infiltrierende Lymphozyten zwar zytotoxische Aktivitäten zeigen, die Tumorzellen aber nicht mehr zerstören, entzieht sich bisher unserer Kenntnis. Genauere Informationen bezüglich der Einflussnahme des Tumors auf die Zellen des Immunsystems könnten eine Chance bieten, neue therapeutische Konzepte zu entwickeln und durch eine gezielte Ausschaltung immunsupprimierender Effekte die Wirksamkeit der körpereigenen Tumorabwehr zu erhöhen.

5.3. Prognostische Relevanz von Lymphozyteninfiltraten in Tumoren

5.3.1. Lymphozyteninfiltrate und Prognose von Lungentumorpatienten

Verschiedene Studien haben darauf hingewiesen, dass die Anwesenheit von Leukozyten in Tumoren auf eine günstige Prognose schließen lässt (30, 31, 81). Gegenstand der jüngeren Forschung ist es, über eine Lymphozytenphänotypisierung möglicherweise Aussagen über die Immunkompetenz des Patienten zu treffen, um die so gewonnenen Erkenntnisse in zunehmendem Maße in die Therapieentscheidungen mit einfließen zu lassen. In unserer Überlebensanalyse sollte geprüft werden, ob zwischen der Häufigkeit des jeweils bestimmten CD-Moleküls auf den TIL und der Überlebenszeit der Lungentumorpatienten ein Zusammenhang vorliegt. Unter Berücksichtigung früherer Untersuchungen (81) erfolgte die Einteilung der flowzytometrisch gewonnenen Daten in drei Gruppen. Die Gruppe 1 wurde als Referenzgruppe im Vergleich zu den beiden anderen festgelegt. Sie umfasste Patienten, deren T-Zellen nur wenige der beurteilten Oberflächenmarker exprimierten. Die Zuordnung zur Gruppe 2 fand bei einer moderaten Expression der Oberflächenmoleküle statt. Gruppe 3 schloss Patienten mit den höchsten Expressionsraten der untersuchten CD-Moleküle auf den TIL ein.

In Übereinstimmung mit anderen Autoren nahmen T-Zellen unter den TIL in unserer Untersuchung den größten Anteil ein, gefolgt von B- und NK-Zellen (11, 30, 71, 107). Eine Abweichung lag bei SCLC dahingehend vor, dass der ermittelte Anteil der B-Lymphozyten im Vergleich zu den vier NSCLC-Subtypen doppelt so hoch ($31,0 \pm 17,8$ % der Lymphozyten)

und der Anteil der T-Zellen deutlich geringer ($56,7 \pm 13,3$ % der Lymphozyten) war. Bei den großzelligen Lungenkarzinomen fiel ein sehr hoher Anteil der T-Zellen auf ($86,0 \pm 2,7$ % der Lymphozyten), wobei mit einer Ratio CD4/CD8 von 0,7 erheblich weniger CD4⁺- als CD8⁺-T-Zellen auftraten. Außerdem ließen sich in dieser Gruppe nur wenige B-Zellen finden ($7,2 \pm 5,1$ % der Lymphozyten) (Tab. 5 S. 33 und Abb. 10a - 10c S. 58).

Wir fanden keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Höhe des relativen Anteils der B-, T- und NK-Zellen an den TIL und der Überlebenswahrscheinlichkeit bei Lungenkarzinompatienten (univariates und multivariates Analysemodell). Demnach lassen die Ergebnisse der vorliegenden Studie die Definition eines aussagekräftigen Prognosemarkers unter T-, B- und NK-Zellen für NSCLC nicht zu. Andere Autoren berichten diesbezüglich von Ergebnissen, die B-Zellen als Prognosemarker für LCLC (n = 38) identifizieren (31). Auch wir wiesen in einer früheren Studie (81) nach, dass ein hoher Anteil an B-Lymphozyten (> 21 % der Lymphozyten) in 73 NSCLC-Proben signifikant mit einer höheren Überlebensrate korrelierte (Beobachtungszeitraum: 26 Monate). Damals ließ sich für die multivariate Analyse (Cox-Regression) ein gerade signifikanter p-Wert zwischen den Gruppen mit hoher und geringer CD19-Expression auf den TIL ermitteln (81). Der tendenzielle Verlauf der Überlebenskurven (Abb. 4/4 S. 23) stimmt mit den früheren Grafiken überein und zeigt für die Patientengruppen mit einer hohen CD19 Expression auf den TIL das geringste Sterberisiko an. Eine in der jetzt vorliegenden Untersuchung höhere Fallzahl von 119 Patienten und eine wesentlich längere Beobachtungszeit von 55 Monaten können für die nicht mehr signifikanten Ergebnisse mit verantwortlich sein. Für T-Lymphozyten und CD8⁺-T-Zellen stellten Eerola et al. für Patienten mit SCLC signifikante Korrelationen vor: ein hoher Anteil in den TIL der Tumorproben fand sich bei den Patienten (n = 56) mit der längsten Überlebenszeit (30). Berichte von einem signifikanten Zusammenhang zwischen hohen T-Zellzahlen im Tumorgewebe und einer besseren Überlebensrate für NSCLC-Patienten lassen sich nach der Auswertung unserer Ergebnisse nicht bestätigen (53). Eine entsprechende Tendenz ist in der Abbildung 4/2 (S. 23) nur für Gruppe 2 mit moderaten T-Zell-Anteilen gegenüber der Gruppe 1 mit den geringsten Anteilen erkennbar. Bei Johnson et al. wurden die Daten von 710 Patienten mit Lungenkarzinomen bezüglich der prognostischen Relevanz der Lymphozyteninfiltration des Tumorgewebes ausgewertet. Die umfangreiche Studie untersuchte Unterschiede zwischen den Charakteristika der peri- und intratumorösen Lymphozyteninfiltrate. Die Autoren wiesen dabei eine günstigere postoperative Prognose für Patienten mit einer relativ hohen Dichte CD3⁺-TIL im intratumoralen Lymphozyteninfiltrat nach. Bei Einbeziehung der peritumorösen Infiltrate in die Betrachtung verschwand die Signifikanz der Prognoseeinschätzung (51). Es wäre denkbar, dass eine heterogene Struktur der Tumorproben, die gleichzeitig auch entzündliche Infiltrate enthalten, zu veränderten Ergebnissen bei der flowzytometrischen Auswertung führt. Zur Prognose von NK-Zellen in Lungentumoren finden sich wenig vergleichbare Berichte. In einer aktuellen Studie von Takanami et al. erwiesen sich die aus 150 Adenokarzinomen der Lunge ermittelten NK-Zell-Werte als signifikante Prognosemarker für das Gesamtüberleben und für Tumore mit

Stadium I (100). Des Weiteren wurden für 50 Plattenepithelkarzinome der Lunge signifikante Korrelationen zwischen einer hohen absoluten NK-Zellzahl und einer längeren Überlebenszeit ermittelt, wobei die Unterschiede für Tumore im Stadium I besonders auffielen (109). In dieser erwähnten Arbeit erfolgte die Zellzählung für jede Probe in einem mikroskopischen Tumorauschnitt von 1 cm² mit Hilfe eines MICRON-Analysators (109). Die abweichenden Registrierungsmethoden von Villegas et al. Sprechen gegen einen Vergleich mit unseren Daten. Die von Takanami et al. beschriebenen Ergebnisse für NK-Zellen können durch die vorliegende Arbeit nicht bestätigt werden. Diesbezüglich zeigte auch eine separate Überlebensanalyse mit NSCLC-Patienten im Stadium I (n = 49) keine signifikanten Effekte (Daten hier nicht gezeigt). Im Gegensatz zu den zitierten Studien ist unser Patientengut breiter gefächert und umfasste für die Überlebensanalyse Plattenepithel- und Adenokarzinome, großzellige Lungenkarzinome und adenosquamöse Karzinome mit Stadium I bis III (Tab. 2 S. 21). Die Unterschiede in den Ergebnissen einzelner Autoren, die nach verlässlichen Parametern für eine Prognoseeinschätzung bei Tumorpatienten suchen, lassen sich möglicherweise auch durch die Inhomogenität des Patientengutes und unterschiedliche Analysemethoden erklären. Ein direkter Vergleich der Resultate wird dadurch deutlich beeinträchtigt. Die Ursachen für die Differenzen in den Untersuchungsergebnissen der einzelnen Forschungsgruppen könnten in zu kleinen Fallzahlen liegen, welche sich durch die Adjustierung in der multivariaten Analyse weiter verringern. Inwiefern die untersuchten Tumorproben für die gesamte Lymphozyteninfiltration des Tumors repräsentativ sind, lässt sich zudem nicht mit letzter Sicherheit feststellen. Aus den hier registrierten Daten für T-, B- und NK-Zellen in Lungenkarzinomen konnten wir keinen signifikanten Zusammenhang zwischen hohen Anteilen dieser TIL-Populationen und einer günstigen Prognose ableiten. Dennoch ist eine derartige Korrelation nicht auszuschließen.

5.3.2. T-Zellphänotyp und Prognose von Lungentumorpatienten

Wenn sich der Tumor etablieren konnte, sollte von einem vollständigen oder teilweisen Versagen der Immunsurveillance ausgegangen werden. Neben einer Behinderung der Immunfunktionen der TIL durch vom Tumor sezernierte Substanzen (8) sind die Ursachen für das Versagen der TIL auch in einer inadäquaten Reaktion der TIL auf den Tumor-Antigen-Reiz zu suchen. Weiterhin muss in Betracht gezogen werden, dass TIL entweder nur zufällig vor Ort auftreten oder spezifische Tumorantigene und/oder tumorassoziierte Antigene erkennen und entsprechend reagieren. Die in Tumoren registrierten Lymphozyteninfiltrate setzen sich zum größten Teil aus T-Zellen zusammen. Deren genaue phänotypische Charakterisierung könnte Rückschlüsse auf ihre funktionellen Fähigkeiten in der Tumorumgebung und eventuelle Gründe für ausbleibende tumorzerstörende Aktivitäten aufdecken. Wir waren der Meinung, dass prognostische Aussagen in Verbindung mit TITL eine differenziertere Analyse der exprimierten Oberflächenmoleküle erfordern. Die flowzytometrischen Messungen der Tumorproben entsprechen dabei allerdings nur einer Momentaufnahme der im betreffenden Tumorabschnitt befindlichen Lymphozyten zum Zeitpunkt der Resektion. Für die Überlebens-

analyse wurde nach folgenden Oberflächenstrukturen unter Verwendung der entsprechenden mAk gesucht: CD4 und CD8 (Prozent der Lymphozyten), HLA-DR, CD56 und/oder 16, CD13, CD11b, CD25, CD57, CD45RO, CD69, CD54, CD49a und CD26 (Prozent der T-Lymphozyten). Als Ratio wurde das Verhältnis $CD4^+/CD8^+$ -T-Zellen angegeben. Der im Vergleich zu ähnlichen Studien einmalige Umfang der Analyse und registrierten CD-Moleküle brachte für CD11b, CD26 und CD54 signifikante Ergebnisse bezüglich der Expression dieser CD-Moleküle auf T-Zellen in Beziehung zur Überlebenszeit der NSCLC-Patienten.

CD11b ist als α -Kette Bestandteil des Adhäsionsmoleküls Mac-1 (CD11b/CD18), welches durch eine β -Kette (CD18) komplettiert wird. Neben LFA-1 (CD11a/CD18) und p150/95 (CD11c/CD18) gehört es zur Familie der Leukozyten-Integrine. Adhäsionsmoleküle dieser Art vermitteln einen innigeren Kontakt der T-Lymphozyten und APC, was für eine effektive spezifische Abwehr unverzichtbar ist (10). Das CD11b-Molekül konnte mit einer Reihe weiterer Funktionen in Verbindung gebracht werden, wie beispielsweise der Phagozytose, Zellmigration, Extravasation der Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten zum Entzündungsgebiet, Adhäsion an das Endothel und Zellkontakt bei der Komplement-abhängigen Abwehr (Typ-III-Rezeptor) (35, 47). Wenige Studien befassten sich bisher mit der CD11b-Funktion im Zusammenhang mit humanen T-Lymphozyten oder TIL. Hoshino et al. untersuchten die Gewebeverteilung $CD11b^+$ -T-Zellen von Erwachsenen in verschiedenen Organen. Dabei wurde dieser T-Zell-Subtyp im Vergleich zu Leber und Milz kaum im Lungengewebe und in Lymphknoten gesunder Probanden nachgewiesen (47). In verschiedenen malignen Tumoren, wie Nierenzellkarzinomen, Magen- und Ösophaguskarzinomen konnten $CD11b^+$ -TIL registriert werden (33, 46, 65, 70, 99). $CD11b^+$ -T-Zellen traten in allen Lungentumorproben ($18,6 \pm 9,9$ % der T-Lymphozyten, Tab. 4) unserer Studie auf. Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse für $CD11b^+$ -TIL von Lungen- und Nierenzellkarzinomen ließen sich zudem signifikant höhere Werte für die Gruppe der Nierenzellkarzinome ($34,0 \pm 18,1$ % der T-Lymphozyten, $p < 0,01$) feststellen. In dieser Arbeit fielen auch die untersuchten Hirntumore (Gliome, Astrozytome) durch eine hohe $CD11b^+$ -Expression ($43,2 \pm 32,3$ % der T-Lymphozyten, Tab. 9) auf. In Anlehnung an die von Hoshino beschriebenen Unterschiede bezüglich der Verteilung $CD11b^+$ -T-Zellen zwischen einzelnen gesunden Organen (47), existieren anscheinend auch Differenzen zwischen einigen Tumorformen. Es stellt sich die Frage, in welchem besonderen Zusammenhang diese TIL-Population mit der Tumorerkrankung steht. Die univariate Analyse unserer Studie ergab bei der Beurteilung des Überlebens von Lungenkarzinompatienten für $CD11b^+$ -T-Zellen zwischen den 3 Gruppen signifikante Unterschiede (Abb. 4/21; $p = 0,01$). Nach Adjustierung und multivariater Analyse wurde für Gruppe 2 (≥ 12 - 20 % der T-Lymphozyten) gegenüber der Gruppe 1 (≤ 11 % der T-Lymphozyten) ein geringeres relatives Sterberisiko ermittelt (RR = 0,4; $p < 0,05$). Für Gruppe 3 (≥ 20 % der T-Lymphozyten) lag die ungünstigste Überlebensrate vor (Abb. 4/22). Angesichts dieser Zahlen scheint ein ausgewogenes Verhältnis der Adhäsionsmoleküle für die Effektivität der Abwehr eine entscheidendere Rolle zu spielen als die Quantität.

Weiterhin darf das Vorhandensein des CD11b-Moleküls auf den T-Zellen nicht isoliert betrachtet werden. Es ist bekannt, dass die Expression von CD11b⁺ und CD28⁺ in einem umgekehrt proportionalen Verhältnis zueinander stehen soll (119). Im Verlauf der Differenzierung naiver CD8⁺-Zellen kehrt sich das Verhältnis CD11b/CD28 dergestalt um, dass CD11b⁺ auf differenzierten T-Effektorzellen erscheint und CD28 fehlt. Der kürzlich erbrachte Nachweis von CD28 und CD11b auf CD8⁺-T-Zellen ließ die Autoren auf eine Übergangsform im Zuge ihrer Differenzierung schließen (36). Das Adhäsionsmolekül CD28 wirkt als Ligand für die kostimulatorischen Moleküle CD80(B7-1) und CD86(B7-2), welche von APC exprimiert werden. Über die Interaktion zwischen APC (B7-2) und T-Zellen (CD28) ist das CD28-Antigen an der T-Zell-Aktivierung mit beteiligt. Die Bestimmung der CD28-Antigen-Dichte auf CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen ermöglicht eine Separation in jeweils zwei funktionell unterschiedliche Subpopulationen. CD8⁺CD28⁺-Lymphozyten zeichnen sich durch eine proliferative Kapazität über einen langen Zeitraum aus, bei CD8⁺CD28⁻-Lymphozyten ist die Proliferationsfähigkeit begrenzt (14). Rotteveel et al. stellten bei der funktionellen Analyse von CD4⁺-T-Zell-Klonen, die aus PBL gewonnen wurden, sowohl Unterschiede bezüglich der CD28-Expression als auch der Zytokinsekretion fest. CD4⁺-T-Lymphozyten mit hoher CD28-Dichte produzierten kaum, CD4⁺CD28⁻-T-Zellen dagegen deutlich registrierbare Mengen an IL-2 und IFN- γ (83). Das Zytokinexpressionsmuster der CD4⁺CD28⁻-T-Zellpopulation entspräche dem von Th1-Zellen, welche vor allen Dingen die zelluläre Abwehr unterstützen (49). Außerdem ist es wahrscheinlich, dass sie an ihrer Zelloberfläche CD11b exprimieren (119). Für die Prognose könnte ein hoher Anteil dieser T-Zellen von Vorteil sein. In unseren statistischen Analysen bezüglich der CD11b⁺-TITL wiesen NSCLC-Patienten in Gruppe 2 ($\geq 12 - 20$ % der T-Lymphozyten) im Vergleich zur Patientengruppe 1 (≤ 11 % der T-Lymphozyten) ein signifikant geringeres Sterberisiko auf. Dennoch wird die einfache Schlussfolgerung, eine große Zahl differenzierter Effektor-T-Zellen müssten sich auf das Überleben von Tumorpatienten günstig auswirken, durch die vorliegenden Untersuchungsergebnisse für Gruppe 3 nicht bestätigt. Dies spricht für weitaus komplexere Interaktionen dieser T-Zell-Typen im Rahmen der Tumorabwehr. Mit Hilfe unserer Analysemethoden wiesen wir CD11b⁺-T-Zellen nach, ohne gleichzeitig eine weitere Differenzierung der möglichen Subtypen (CD4⁺ oder CD8⁺) vornehmen zu können. Zukünftige Untersuchungen sollten hier eine exakte Unterscheidung der CD11b⁺-Subtypen veranlassen, um die interessanten Daten der Überlebensanalyse auch retrospektiv genauer werten zu können. Auch der Nachweis von CD28-Antigenen auf den TIL wäre in diesem Kontext zu überdenken. Möglicherweise bietet sich dann eine schlüssige Interpretation für unserer Resultate, dass Lungentumor-Patienten mit einer moderaten Präsenz CD11b⁺-T-Zellen das beste Überlebensergebnis aufweisen.

Das Ektoenzym und Adhäsionsmolekül CD26/Dipeptidylpeptidase IV wurde auf den TITL in den von uns untersuchten Lungenkarzinomen in stark voneinander abweichenden Prozentsätzen exprimiert. Unter Berücksichtigung der fünf histologischen Subtypen wiesen die großzelligen Lungenkarzinome die geringsten ($36,0 \pm 19,8$ % der T-Zellen; n = 2), die kleinzelligen

Lungenkarzinome die höchsten Werte ($51,0 \pm 14,1$ % der T-Zellen; $n = 3$) auf (Tab. 5). Die multivariate Überlebensanalyse ergab nach Adjustierung auf NSCLC-Patienten für Gruppe 2 ($\geq 36 - 46$ % T-Lymphozyten) das geringste relative Sterberisiko (Abb. 4/34). Der Unterschied zwischen Gruppe 1 (≤ 35 % der T-Lymphozyten) und Gruppe 2 war signifikant ($p = 0,05$). Aus den Daten geht hervor, dass eine fehlende oder sehr geringe Expression der Dipeptidylpeptidase IV mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Ansorge und Mitarbeiter fanden bei erhöhten TGF- β -Konzentrationen eine Erniedrigung der CD26-Expression auf Lymphozyten (4). Damit könnte eine Verschlechterung der Prognose für den Tumorpatienten verbunden sein, was sich mit unseren Ergebnissen für NSCLC-Patienten decken würde. Mit unseren Untersuchungen direkt vergleichbare Studien, die Zusammenhänge zwischen der Expression von CD26-Molekülen auf TITL aus Lungenkarzinomen und der Überlebenszeit beschreiben, fehlen bisher. Die Ektopeptidase CD26 wurde auf aktivierten Lymphozyten (T-, B-, NK-Zellen) im peripheren Blut und auf TIL aus verschiedenen Tumoren, wie RCC und Lungentumoren, nachgewiesen (78, 81). Tumorzellen (6, 19, 97) können dieses Molekül ebenso exprimieren, wie Endothel-, Epithel- und Drüsenzellen unterschiedlicher Gewebe (19, 23, 44, 63). Funktionell ist CD26 in der Lage, Adenosindesaminase (ADA) zu binden (27). Dieser Komplex metabolisiert extrazelluläres Adenosin, welches die Proliferation von T-Lymphozyten hemmt (27, 28). Auf diese Weise, sowie durch die Spaltung von Chemokinen (77) kann CD26 auf die Proliferation und Chemotaxis von T-Lymphozyten modulierend Einfluss nehmen. Diesbezüglich ließen sich unsere Daten derart interpretieren, dass CD26⁺-TITL durch die Bindung von ADA einen Schutz vor dem proliferationshemmenden Einfluss des Adenosins besitzen, was die lokale Tumorabwehr begünstigen könnte. Die Ergebnisse werden durch Untersuchungen an einem transepithelialen Migrations-Modell ergänzt. Demnach scheint die Expression des CD26-Moleküls für die Migration von CD4⁺-T-Zellen in Epithelgewebe der Luftröhre mit verantwortlich zu sein (63). Eine fehlende oder eingeschränkte Expression könnte das Migrationsverhalten auch bei TIL negativ beeinflussen und so mit einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit bei den von uns untersuchten NSCLC-Patienten in ursächlichem Zusammenhang stehen. CD26 ist im Zuge der Aktivierung und Differenzierung der T-Lymphozyten neben anderen Markern (z. B. LAG-3, CCR-5, CXCR-3) mit einer T-Helfer-Typ1(Th1)-Zytokinsekretion assoziiert (3). Obwohl das CD26-Molekül allein nicht als selektiver Th1-Marker gelten kann, lässt eine geringe Konzentration des Moleküls auch einen Mangel an Th1-Zellen vermuten. Die damit verbundene zelluläre Immundefizienz könnte sich auch in den Resultaten unserer Studie widerspiegeln und zur Erklärung der schlechten Prognose von NSCLC-Patienten mit einem geringen Anteil an CD26⁺-TITL beitragen.

Die Resultate der statistischen Untersuchungen für CD54⁺-T-Zellen und der Verlauf der Überlebenskurve (Abb. 4/30) nach multivariater Analyse sprechen für eine günstigere Überlebensrate der Gruppen 2 und 3 gegenüber der Gruppe 1. Diese Ergebnisse werden für Gruppe 2 ($\geq 20 - 30$ % der T-Zellen) signifikant ($RR = 0,33$; $p = 0,03$), für Gruppe 3 (≥ 31 % der T-Zellen) marginal signifikant ($RR = 0,39$ $p = 0,08$) bestätigt und stimmen mit einer

früheren Studie unserer Arbeitsgruppe überein (81). In Bronchialkarzinomen zeigten TIL und PBL bezüglich der Expression von CD54-Molekülen unterschiedliche Muster. Dabei wurde das Adhäsionsmolekül an der TIL-Oberfläche häufiger registriert (81, 85, 122). Für T-Zellen, die aus dem peripheren Blut von gesunden Probanden stammten, ließen sich keine oder nur geringe Expressionsraten feststellen (85). Die erhöhte Präsenz dieser Oberflächenmoleküle könnte das Migrationsverhalten der TITL positiv beeinflussen und auf diese Weise mit den von uns ermittelten günstigeren Überlebensraten assoziiert sein. Das Erreichen des Tumors und ein aktivierter Status der T-Zellen garantieren jedoch noch keine wirksame Immunabwehr. Die Beeinflussung der TITL durch weitere Faktoren, wie das Mikromilieu in der unmittelbaren Tumorumgebung, scheint für eine optimale Funktion der T-Zellen mit verantwortlich zu sein. Man kann davon ausgehen, dass nicht die Expression einzelner Adhäsions- und Aktivierungsmarker entscheidend für die Funktion der T-Zellen ist, sondern die effektivste Kombination der Oberflächenstrukturen.

Bei der Gegenüberstellung der CD13-Expression durch die TITL der Lungenkarzinome unterschiedlichen Histologietyps bestanden keine signifikanten Differenzen. Die geringste CD13-Expression (Gruppe 1; $\leq 9\%$ der T-Lymphozyten) war mit einer günstigen Überlebensrate assoziiert. Dieser grafisch sichtbare Zusammenhang blieb ohne statistische Signifikanz (Abb. 4/17 und 4/18). In einer früheren Studie, welche die Phänotypisierung der TIL in Lungenkarzinomen mit einem kleineren Patientenkollektiv untersuchte, konnte CD13 als signifikanter und damit vielversprechender prognostischer Marker verifiziert werden. Patienten mit einer niedrigen Präsenz von CD13⁺-TITL zeigten eine bessere Überlebenschance (81). Diese Daten sind beim gegenwärtigen Kenntnisstand schwer zu interpretieren. Nicht hinreichend bewiesen ist bisher die Vermutung, dass die enzymatische Aktivität der Aminopeptidase N (CD13, APN) mit der Angiogenese im Tumor positiv korreliert. Dieser Effekt würde die Tumorumprogression begünstigen. Untersuchungen von Bhagwat et al. konnten die Metalloproteinase CD13 mit regulierenden Funktionen bei der endothelialen Morphogenese während der Angiogenese in Verbindung bringen. Die Behandlung mit CD13-Inhibitoren führte im Tierversuch unter anderem zu einem signifikant verminderten Tumorzustand (16, 75). Bei Patienten mit Nierenzellkarzinomen konnte man nachweisen, dass TIL VEGF (vascular endothelial growth factor) sezernieren und somit die Angiogenese des Tumors beschleunigen und die Prognose der Patienten verschlechtern (58). Ob hier eine Koexpression mit CD13 vorliegt, wurde bisher nicht untersucht. Angesichts der bereits erwähnten ermutigenden Erfolge mit der Inhibition von CD13 im Tierversuch (16), sollten künftige Studien hier einen möglichen Zusammenhang zwischen VEGF und CD13 verfolgen. Studien, die die CD13-Expression auf Tumorzellen untersuchten, berichten von signifikanten Zusammenhängen mit dem Überleben der Tumorpatienten (45, 104). Bei der Untersuchung von Hashida et al. waren APN-/CD13-negative Kolontumore gegenüber APN-/CD13-positiven Kolontumoren mit einer signifikant höheren Überlebensrate assoziiert (45). Unter Berücksichtigung aller bisher bekannten Funktionen des CD13-Moleküls ließe sich auch eine Regulationsfunktion von CD13

bei der Tumorgefäßbildung mit diesem signifikanten Effekt in Einklang bringen. Für Patienten mit NSCLC zeigte sich zudem eine günstige Prognose, wenn auf den Tumorzellen CD10 (Neprilysin) nachweisbar war und CD13 fehlte (104). Neprilysin hydrolysiert mitogene Bombesin-ähnliche Peptide und nimmt dadurch auf das Wachstum von SCLC hemmenden Einfluss (95). An NSCLC-Zelllinien wurde nach einer Hemmung der Neprilysin-Expression an der Zelloberfläche ein schnelleres Tumorzellwachstum registriert, was für eine Beteiligung bei der Tumorphiliferation spricht (39). Neben einer möglichen Expression auf TIL und den Tumorzellen selbst, wird APN auch von Makrophagen/Monozyten und Granulozyten im Tumor exprimiert. Diese sind zudem in der Lage, chemotaktische Peptide, wie das Monozyten-chemotaktische Protein (MCP)-1 in die Umgebung zu sezernieren. In einer Forschungsarbeit, welche sich mit Aktivitäten verschiedener MCP-1-Analoga beschäftigte, äußerten Weber et al. die Vermutung, dass MCP-1 durch CD13 gespalten werden könnte (115). MCP-1 induziert die Migration von Zellen, die den spezifischen Rezeptor CCR-2 besitzen. Über eine Blockade des Rezeptors, seine verminderte Expression oder eine veränderte Aktivität von MCP-1 ist die Zellmigration somit beeinflussbar (114). Da durch Zell-Zell-Kontakte (auch mit Monozyten/Makrophagen) die lymphozytäre Expression von CD13 erhöht wird (52), könnte im Hinblick auf die Peptidase-Wirkung von CD13 eine Minderung der MCP-1-Aktivität resultieren. Dieser Regelkreis würde bei einer hohen Dichte von Abwehrzellen, die sich in vermehrten Zell-Zell-Kontakten äußert, deren weitere Chemotaxis und Migration limitieren. In Bezug auf diesen Reaktionsweg könnte sich die vermehrte Expression von CD13 für das Überleben von Tumorpatienten nachteilig auswirken, was sich in unseren eingangs erwähnten Grafiken (Abb. 4/17 und 4/18) widerspiegelt. Obwohl CD13 mit seinem Funktionsspektrum über unterschiedliche Mechanismen auf die Prognose eines Tumorpatienten einwirkt, kann die Expression von CD13 auf TITL mit den vorliegenden Resultaten nicht als signifikanter Prognoseparameter für NSCLC-Patienten postuliert werden.

5.4. Gegenüberstellung von TIL-Phänotypen unterschiedlicher Tumore und Lungenmetastasen

Der zweite Teil der Studie widmet sich dem Vergleich der TIL-Expressionsmuster verschiedener Tumore und Metastasen: 125 Bronchialkarzinome, 116 Nierenzelltumore, 21 Magenkarzinome, 20 Lungenmetastasen, 10 Harnblasenkarzinome, 7 Ösophaguskarzinome, 5 Kolon-/Rektumkarzinome, 5 Hirntumore und 4 Mammakarzinome.

Im Vergleich zu den Lungenkarzinomen dominierten bei den TIL der Nierenzellkarzinome CD8⁺-Zellen gegenüber CD4⁺-Zellen. Diese Feststellung wird von einigen Autoren bestätigt (56, 60, 65, 106). Es finden sich jedoch auch gegensätzliche Aussagen (11, 55). Die genannten Studien weisen im Vergleich zu unserer Untersuchung deutlich geringere Fallzahlen auf, was bei der Beurteilung der Ergebnisse Berücksichtigung finden sollte. In Abhängigkeit vom Tumorstadium und Grading wurden von Igarashi et al. bei RCC- Patienten veränderte Infiltrationsmuster von CD4⁺- und CD8⁺-TIL beobachtet (48). Im Stadium III/IV und Grad III/IV ließ sich bei den meisten Patienten eine Zunahme der CD8⁺-T-Zellen, assoziiert mit einer Abnahme CD4⁺-T-Zellen feststellen, wobei die Prognose dieser Patienten als schlecht beurteilt wurde (48). Bei Vergleichen zwischen Nierenzellkarzinomen registrierten Nagase et al. signifikant höhere Anteile CD4⁺-TIL für Tumore mit Differenzierungsgrad I gegenüber II und III (65). In Abhängigkeit vom Grading zeigten auch unsere Daten diese Tendenzen. Für CD4⁺-TIL lies sich keine Signifikanz nachweisen. Der Anteil der CD8⁺-TIL in RCC korrelierte schwach positiv mit dem Tumorgrad. Zwischen Grad I (geringe zelluläre Anaplasie) und Grad III (schwere zelluläre Anaplasie) waren die Unterschiede signifikant (Abb. 7). Nach Osamu et al. (72) lässt sich der Umstand, dass mit der Entdifferenzierung eines Nierenzelltumors der Anteil an CD8⁺-Zellen unter den TIL ansteigt, mit der zunehmenden Antigenität der Tumorzellen bei steigendem Tumorgrading erklären. Die erhöhte Zahl CD8⁺-TIL ist als Reaktion auf die zunehmende proliferative Potenz der Tumorzellen zu werten. Da sich dadurch aber die Überlebenszeit nicht verbessert, sondern sogar negativ korreliert, erweist sich diese Immunreaktion im Hinblick auf eine erfolgreiche Tumorabwehr als ineffektiv (72).

Sowohl in unserer aktuellen Studie als auch in zurückliegenden Untersuchungen ließ sich für die TIL in Lungenkarzinomen ein hoher Anteil CD4⁺- und ein niedriger Anteil CD8⁺-T-Zellen gegenüber RCC aufzeigen (78). Wir konnten weiterhin nachweisen, dass sich die CD25-Expression der TITL beider Tumorentitäten signifikant unterscheidet. Die flowzytometrisch registrierten Daten lagen für CD25⁺-TITL in Lungenkarzinomen (20,8 ± 8,4 % der T-Lymphozyten) um das 2,5fache höher als bei RCC (8,4 ± 4,4 % der T-Lymphozyten). Eine Subpopulation der CD4⁺-T-Zellen, welche CD25 koexprimieren, können als Suppressor T-Zellen agieren und einer Aktivierung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen entgegen wirken (40, 93). Dabei erfolgt die Vermittlung der Suppression durch Kontakte zwischen den T-Zellen und Zytokinunabhängig (94). Woo et al. fanden bei NSCLC-Patienten in einem frühen Stadium einen

hohen Prozentsatz $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen, sowie $CD8^+$ -T-Zellen, welche nur in geringem Umfang CD25 exprimierten (118). Es wäre vorstellbar, dass es sich bei den von uns registrierten hohen Anteilen $CD4^+$ - und $CD25^+$ -TITL in Lungenkarzinomen um die eben beschriebenen Suppressor-T-Zellen handelt. Erst eine Dreifachfärbung unter Einbeziehung der CD25-Marker bei $CD4^+$ - und $CD8^+$ -TITL würde darüber genauen Aufschluss geben.

Neben den bereits diskutierten Unterschieden ergab sich ein signifikanter Effekt bezüglich der Herkunft des Primärtumors in Nierenzell- und Lungenkarzinomen (Tab. 4) für die Infiltration des Tumors mit B- und NK-Zellen, $HLA-DR^+$ -, $CD13^+$ -, $CD11b^+$ - und $CD57^+$ -TITL. In der Gruppe der Lungenkarzinome fielen im Vergleich zu den Nierenzellkarzinomen hohe Anteile von B-Zellen auf. Die Nierenzellkarzinome wurden stärker von NK-Zellen, $HLA-DR^+$ -, $CD13^+$ -, $CD11b^+$ - und $CD57^+$ -TITL infiltriert. Bei Gegenüberstellungen von TIL und PBL in RCC wiesen TIL eine höhere $CD8^+$ - und $HLA-DR^+$ - Expression (56,105) auf. Die gefundenen Verteilungscharakteristika scheinen auf ein Überwiegen von TIL bei RCC hinzuweisen, die im Rahmen einer unspezifischen Entzündung sowie bei Abwehrmechanismen in der Frühphase einer Immunreaktion auftreten. Makrophagen übernehmen mit dem direkten zytotoxischen Angriff auf körperfremde oder transformierte Zellen ebenfalls eine wichtige Position in der frühen Abwehrphase. Ihre Funktion wird durch Mediatoren, wie Komplementspaltprodukte (C3b) sowie durch Th1-Zellen sezernierte Zytokine moduliert und stimuliert. CD11b gilt neben CD18 als Rezeptorbaustein für die Komplementkomponente C3b. Anastassiou et al. wiesen auf Zusammenhänge zwischen der Expression von Adhäsionsmolekülen auf Tumorzellen und Lymphozyteninfiltraten und der Prognose in RCC hin (2). RCC mit einer hohen oder moderaten CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1)-Dichte zeigten eine stärkere Infiltration mit $PECAM-1^+$ -Leukozyten und eine höhere Überlebensrate im Gegensatz zu Tumoren mit einer geringen PECAM-1-Dichte (2). Für Adhäsionsmoleküle wie CD11b oder CD13 wären solche Korrelationen ebenfalls vorstellbar. $CD57^+$ -T-Lymphozyten treten vor allem in einer späteren Phase viraler Infektionskrankheiten auf (111). Dabei scheinen die $CD57^+$ -T-Lymphozyten suppressiv auf das Immungeschehen zu wirken (9, 112). Diese Suppressionseffekte würden sich bei Tumorpatienten eher nachteilig auf das Überleben der betroffenen Patienten auswirken, was sich in unseren Daten zur Überlebensanalyse von Lungentumoren auch tatsächlich tendenziell widerspiegelt (Abb. 4/24).

Im Gegensatz zur Tumorlokalisation in der Lunge oder Niere scheint in unserer Studie deren histologische Subklassifizierung in Bezug auf den TIL-Phänotyp weniger relevant zu sein. Auch die Faktoren Alter und Geschlecht der Patienten mit Nierenzell- und Lungenkarzinomen blieben bis auf eine Ausnahme für CD13⁺-TIL ohne einen nachweisbaren Effekt. Wir ermittelten eine schwach negative Korrelation zwischen CD13⁺-TIL und dem Patientenalter in den hellzelligen RCC-Proben (Abb. 6). Als immunrelevante Prognosefaktoren spielen das Alter und Geschlecht im Gegensatz zu Grading und TNM-Klassifikation eher eine untergeordnete Rolle. Dafür sprechen auch die Untersuchungen von Fujisawa et al. mit PBL von 42 NSCLC-Patienten. Für die Faktoren Alter, Geschlecht und Histologietyp wurde kein signifikanter Zusammenhang mit dem Überleben der Patienten gefunden (38).

In unserer Gegenüberstellung der Lungenmetastasen von unterschiedlichen Primärtumoren fällt auf, dass auch die TIL in Metastasen einen dem Primärtumor ähnlichen Phänotyp aufweisen. So konnten zwischen den ermittelten Daten für Mammakarzinome und Lungenmetastasen mit bekanntem primärem Mammakarzinom keine signifikanten Unterschiede gefunden werden (Tab. 8 und Abb. 13a - 13h S. 66). Besonders deutlich wird diese Ähnlichkeit auch bei der Expression von CD13⁺-TIL in den Lungenmetastasen der Nierenzellkarzinome, die weit über den Werten der anderen drei Metastasengruppen liegt (Tab. 7 und Abb. 12a - 12f S. 64). Die untersuchte Gruppe der Nierenzellkarzinome zeichnete sich im Vergleich zu den anderen Tumorentitäten ebenfalls durch einen deutlich höheren Anteil an CD13⁺-T-Zellen aus (Tab. 9 S. 39 und Abb. 14i S. 70). Diese Differenzen registrierten auch Ritz et al. (82). Ob andere Organmetastasen eines primären Nierenzellkarzinoms ein ähnliches phänotypisches Bild wie die hier beschriebenen Lungenmetastasen zeigen, müssen weitere Vergleiche aufdecken. Auf der Suche nach einem unbekanntem Primärtumor könnten charakteristische Infiltrationsmuster im Gewebe einer Metastase einen Hinweis geben. Weiterführende Studien in dieser Richtung werden wertvolle Impulse für die Tumordiagnostik nach erfolgter Metastasenentfernung liefern.

Besondere Erwähnung sollten die Ergebnisse zur Gruppe der Hirntumore (Tab. 9 S. 39 und Abb. 14a - 14i S. 69) finden. Das Gehirn zählt neben den Hoden zu den Bereichen des Körpers, die durch spezifische Barrieren das Eindringen von Lymphozyten behindern. Dies erklärt zum Teil, weshalb in Hirntumoren die Lymphozytenausbeute eher gering ist. Weiterhin bedingt das Vorhandensein der Blut-Hirn-Schranke das im Vergleich zu den anderen Tumorproben deutlich abweichende phänotypische Bild der Hirntumor-TIL. In Hirntumoren fanden wir nur wenige CD13⁺-TIL, wohingegen die Anteile für CD57, CD11b und CD56 und/oder CD16 im Vergleich zu den anderen fünf Tumorgruppen (Lunge, Magen, Ösophagus, Kolon/Rektum und Blase) doppelt so hoch, im Vergleich zu den Nierenzelltumoren um etwa ein Drittel höher lagen (Tab. 9). Es liegt die Vermutung nahe, dass nur bestimmte Lymphozytenpopulationen die Blut-Hirn-Schranke passieren und bis zum Tumor gelangen. Unsere Messungen sollten zur genaueren Charakterisierung des Phänotyps dieser TIL beitragen und Unter-

schiede zu anderen Tumorentitäten feststellen. Im Vergleich zu den in Tabelle 8 aufgeführten Tumoren fällt die Gruppe der Hirntumore mit einem deutlich geringeren Anteil B-Zellen ($3,4 \pm 2,8$ % der Lymphozyten) und einem hohen Anteil von NK-Zellen ($29,8 \pm 14,2$ % der Lymphozyten) auf. Ein CD4/CD8 Verhältnis von $0,4 \pm 0,2$ ergibt sich aus einem sehr kleinen Anteil CD4⁺-TIL gegenüber CD8⁺-TIL. Unsere Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungen anderer Autoren, die CD4⁺- und CD8⁺-TIL in Medulloblastomen/primitiven neuroektodermalen Tumoren und Astrozytomen immunphänotypisierten (18, 76). In einer Publikation zu TIL in malignen Gliomen wurde gegensätzlich zu unseren Untersuchungen ein CD4/CD8 Verhältnis von etwa 1:1 registriert (62). Ob Unterschiede zwischen Hirntumoren existieren, die histologisch von den Gliazellen (z. B. Astrozytome), den Hirnhäuten (z. B. Meningiome) oder anderen Hirnstrukturen abgeleitet werden, müssen weitere vergleichende Studien aufzeigen.

CD57, CD56 und CD16 gelten beim Menschen als prototypische NK-Zell-Marker, werden aber teilweise auch von CD8⁺-T-Zellen exprimiert. Die Expansion von Zellen mit diesen Charakteristika tritt nicht nur bei älteren Patienten sondern auch bei chronischer Aktivierung des Immunsystems, sowie viralen Infektionen, rheumatischen und autoimmunen Erkrankungen und Tumoren auf (102). Bei TIL in humanen Gliomen wurde im Vergleich zu PBL eine deutlich höhere CD56-Expression registriert (84). Zudem ließ sich in den TIL-Populationen eine gesteigerte IL-4-Expression nachweisen. Für IFN- γ fand sich gegenüber den Normalwerten von gesunden PBL kein erhöhter Wert. Die Autoren schlussfolgern daraus, dass im Tumor eine Typ-2-Reaktion dominiert (84). Dies wäre womöglich neben anderen Ursachen, wie der Sekretion immunsuppressiver Substanzen durch die Tumorzellen (117) oder die Behinderung der Diapedese durch die Blut-Hirn-Schranke, ein weiterer Grund für die Ineffektivität von Immunreaktionen gegen Gliome. Bei T-Zellen mit NK-Zell-Markern (CD56, CD16) könnte es sich auch um große granuläre Lymphozyten (large granular lymphocytes, LGL) handeln. Weshalb diese Zellpopulation in Hirntumoren in besonders großem Umfang zu finden war, bleibt unklar. Das Auftreten CD57⁺-Lymphozyten ist häufig mit Erkrankungen assoziiert, die Ausdruck oder Folge eines Immundefizits sind (HIV-Infektion, Transplantatempfänger). So dokumentierten Wang et al. einen signifikant hohen Anteil an CD8⁺CD57⁺-T-Lymphozyten bei CMV-Infektionen im Vergleich zu Gesunden (111). Es wurde die Vermutung geäußert, dass CMV einen persistierenden Aktivierungszustand der T-Zellen bedingt und dass diese T-Zell-Untergruppe eine wichtige immunmodulatorische, suppressive Rolle spielt (9, 112). In diesem Zusammenhang kann auch das Auftreten bei chronisch entzündlichen Erkrankungen verstanden werden, wenn die suppressive Wirkung der CD57⁺-Lymphozyten eine Herabregulation der Immunfunktion bewirkt, die im Rahmen der Entzündungsmodulation durchaus einen Vorteil für den betroffenen Patienten darstellt. Eine ähnliche Rolle könnte der CD57⁺-TIL-Phänotyp in Hirntumoren übernehmen, auch wenn durch das Vorhandensein der Blut-Hirn-Schranke die Tumorummunologie des Gehirns von der in anderen Organen abweicht. Bei chronischen Erkrankungen mit entsprechend prolongierten Aktivierungszuständen des Immunsystems verbessert die Suppression immunologischer Prozesse durch die Begrenzung

der destruktiven Entzündungsvorgänge die Situation des Patienten. Ist ein Tumor an einem solchen persistierenden Aktivierungszustand ursächlich beteiligt, kann sich der gleiche Regulationsmechanismus allerdings zum Nachteil des Patienten auswirken.

5.5. Zusammenfassende Bewertung

Wir untersuchten den Phänotyp von TIL und versuchten, unter Verwendung eines breiten Spektrums mAk und der flowzytometrischen Messmethodik, eine Momentaufnahme des Infiltrationsmusters abzubilden und daraus mögliche Schlussfolgerungen für das Überleben von Lungentumorpatienten zu ziehen. Bei der Interpretation der großen Datenmenge wurden klinische und histologische Fakten berücksichtigt, wobei wir an vorangegangene Studien unseres Institutes anknüpften. Trotzdem traten signifikante Effekte mit prognostischer Relevanz nur selten deutlich hervor. Die Untersuchung zeigt, dass das Schicksal des Patienten nicht von der Präsenz einzelner Lymphozytenpopulationen abhängt, sondern wohl von ihrem möglichst effektiven Zusammenspiel. Die Klärung einer gegenseitigen Einflussnahme der Lymphozytenpopulationen steht trotz der Fülle bisher gewonnener Erkenntnisse noch am Anfang.

Dank des besonders umfangreichen Spektrums an Lymphozytären Oberflächenmolekülen in unserer Studie konnten wir für drei TIL-Oberflächenmarker einen signifikanten Zusammenhang mit der Prognose von NSCLC-Patienten ableiten. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass sich ein hoher Anteil CD54⁺-T-Zellen und moderate Anteile CD54⁻-, CD11b⁺- und CD26⁺-T-Zellen auf TIL gegenüber geringen Anteilen als günstiger für das Überleben der Patienten erweisen. Gelingt es in weiteren Studien, Ursachen für diese Tendenzen zu eruieren, so bietet sich die Chance, nicht nur die Prognose einzuschätzen, sondern durch die Wahl eines geeigneten, immunologischen Therapieverfahrens das Überleben für den Patienten zu verbessern.

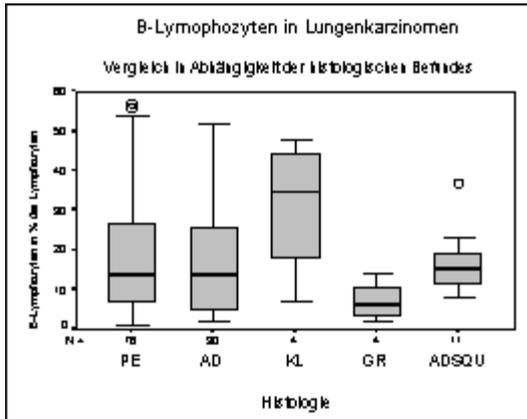
Den hohen Forschungsbedarf im Bereich der grundlegenden tumorbiologischen und immunologischen Prozesse offenbaren bestimmte Ergebnisse unserer Arbeit. Es zeigte sich, dass sich weder hohe Anteile einer bestimmten TIL-Population (CD11b und CD26) noch besonders geringe Anteile (CD11b, CD26 und CD54) positiv auf das Überleben der NSCLC-Patienten wirkten. Dies weist auf eine äußerst komplexe Interaktion der an der Tumorabwehr beteiligten Zellen hin. Je vielschichtiger sich die Wechselwirkungen darstellen, desto wichtiger ist die Größe der untersuchten Patientenkollektive, um aussagekräftige und verallgemeinerungsfähige Resultate zu erhalten. Weiterhin ist die Vergleichbarkeit der Forschungsergebnisse durch einen abweichenden methodischen Aufbau der verschiedenen Studien eingeschränkt. Da Informationen zum Lymphozytenvorkommen in Geweben von Gesunden nicht verfügbar sind, fehlen Vergleichsparameter als Referenz für die in den Tumoren nachgewiesenen Lymphozytenpopulationen. Vergleiche zwischen TIL- und PBL-Mustern bieten dafür keine

ausreichende Grundlage. Zuverlässige Prognosemarker stellen die Basis für eine patientengerechte Therapieentscheidung dar. Bestätigt sich auch in anderen Untersuchungen die Relevanz spezieller Membranmoleküle auf TIL für die Abschätzung der Prognose, muss in weiterer Forschungsarbeit ein schnelleres und ökonomisches Verfahren zur breiten Anwendung entwickelt werden, welches für die Diagnostik und Therapie von Tumorerkrankungen eine sichere Beurteilung der Prognose gestattet. Die inzwischen etablierte Methode der Flowzytometrie wird künftig in der Routinediagnostik von Tumorerkrankungen an Bedeutung gewinnen. Dabei sollten auch im Zusammenhang phänotypischer Analysen von TIL Drei- und Mehrfachfärbungen zum Einsatz kommen, um eine eindeutige Zellidentifizierung zu gewährleisten. Informationen zum Auftreten bestimmter TIL-Populationen mit entsprechenden differenzierten funktionellen Eigenschaften werden im Rahmen der immunologischen Grundlagenforschung der Gewinnung neuer Erkenntnisse nicht nur auf dem Gebiet der Tumorummunologie dienen.

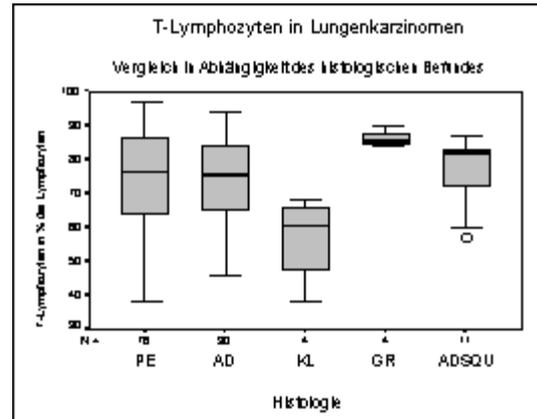
6. Tabellen und grafische Darstellungen

Abb. 10a - 10c: Grafische Darstellung der in Tabelle 5 (S. 33) ausgewiesenen Ergebnisse für Subtypen des Bronchialkarzinoms als Boxplots (PE= Plattenepithelkarzinom, AD= Adenokarzinom, KL= kleinzelliges Karzinom, GR= großzelliges Karzinom, ADSQU= adenosquamöses Karzinom)

10a



10b



10c

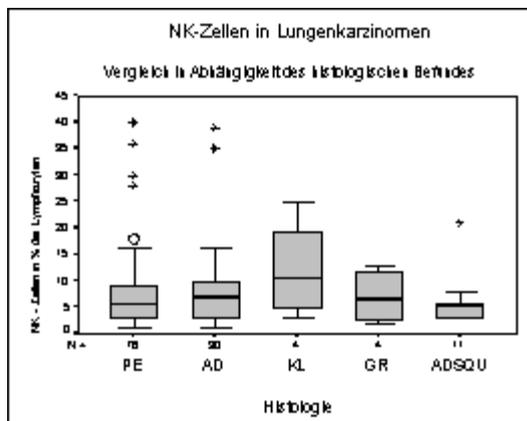
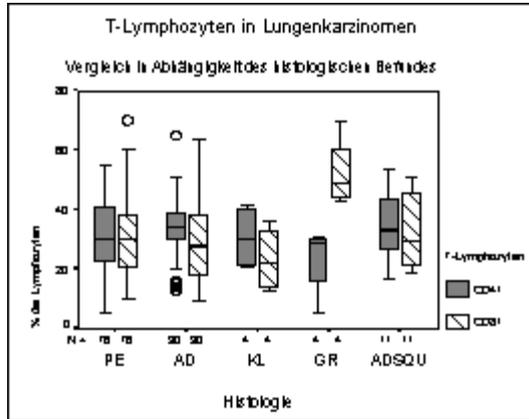
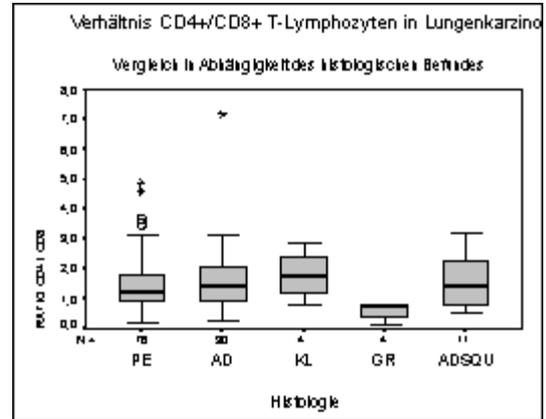


Abb. 10d - 10i: Grafische Darstellung der in Tabelle 5 (S. 33) ausgewiesenen Ergebnisse für Subtypen des Lungenkarzinoms als Boxplots (PE= Plattenepithelkarzinom, AD= Adenokarzinom, KL= kleinzelliges Karzinom, GR= großzelliges Karzinom, ADSQU= adenosquamöses Karzinom)

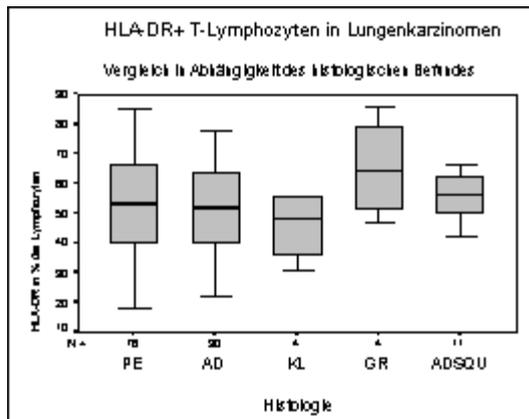
10d



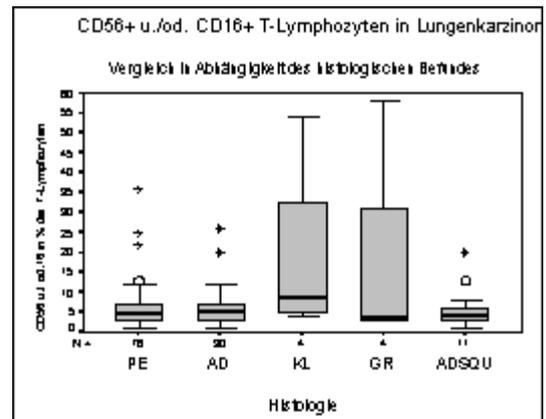
10e



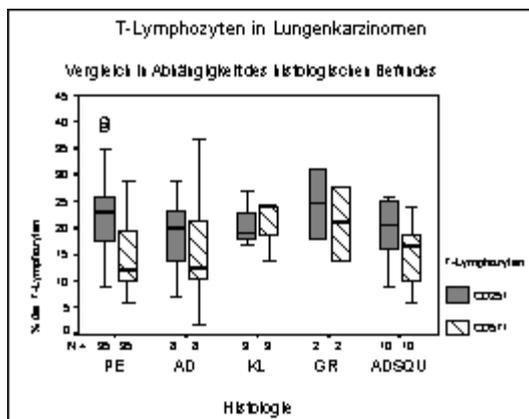
10f



10g



10h



10i

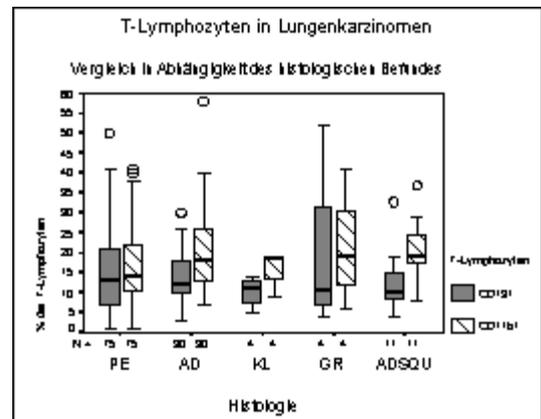
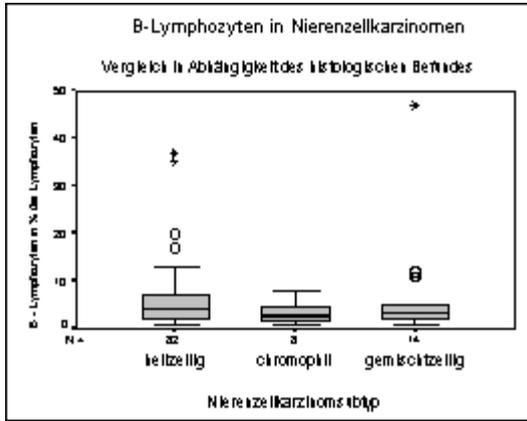
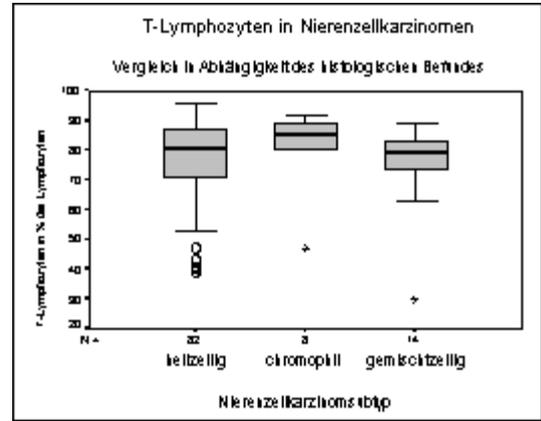


Abb. 11a - 11d: Grafische Darstellung der in Tabelle 6 (S. 36) ausgewiesenen Ergebnisse für hellzellige, chromophile und gemischtzellige Subtypen des Nierenzellkarzinoms als Boxplots

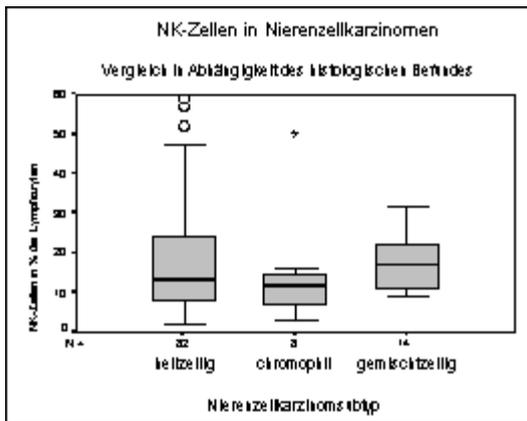
11a



11b



11c



11d

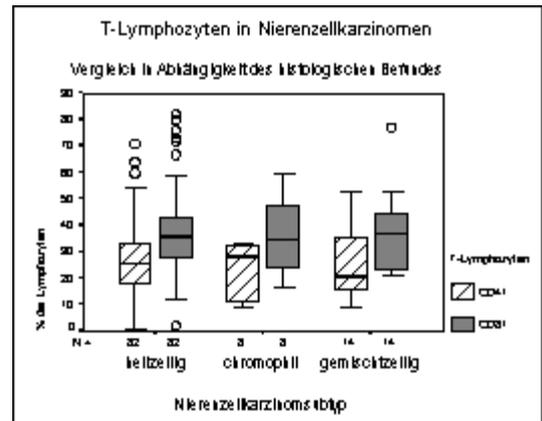
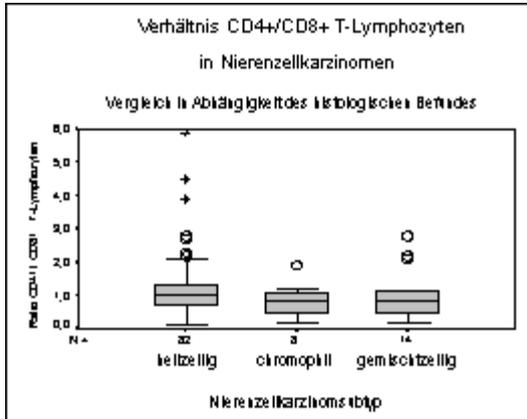
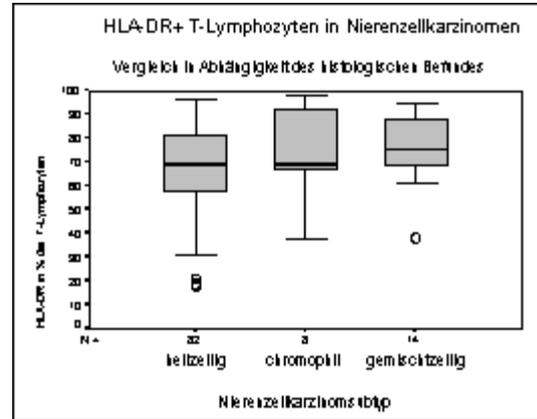


Abb. 11e - 11i: Grafische Darstellung der in Tabelle 6 (S. 36) ausgewiesenen Ergebnisse für Subtypen des Nierenzellkarzinoms als Boxplots

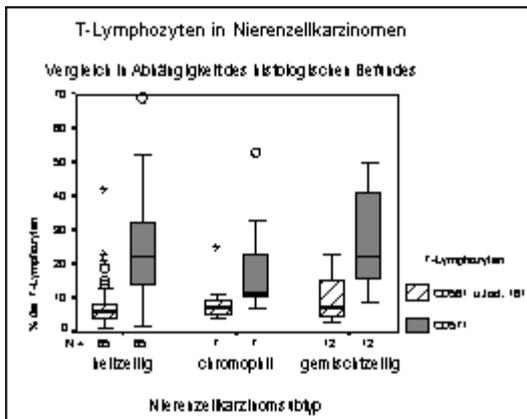
11e



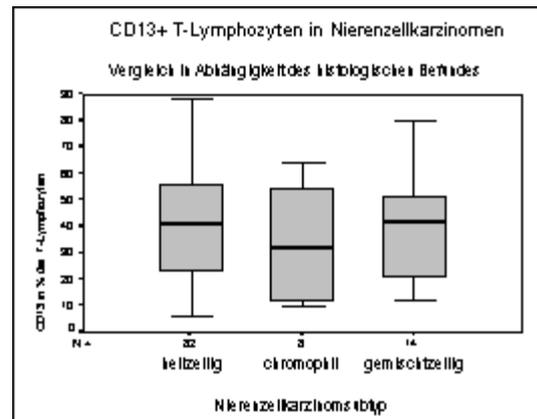
11f



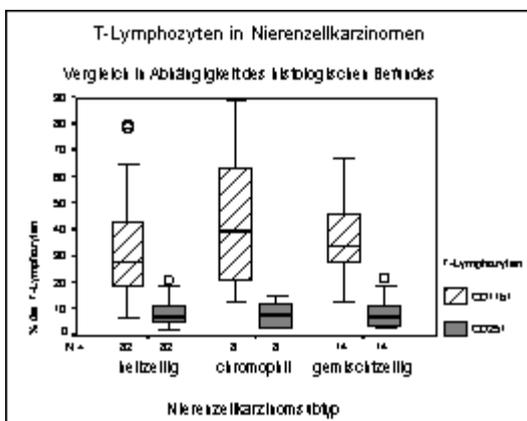
11g



11h



11i



% der Lymphozyten

% der T - Lymphozyten

Anteil im Gesamtpopulation

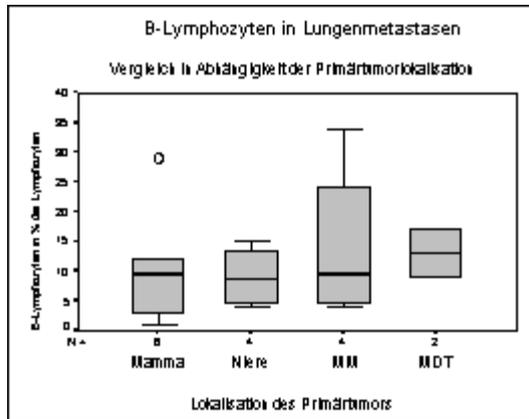
Tumorlokalisation des Primärtumors	Anteil im Gesamtpopulation												
	B - Lymph.	T - Lymph.	NK - Zellen	CD4	CD8	Ratio CD4/CD8	HLA-DR	CD56	CD13	CD11b	CD25	CD57	
Mamma	mean ± SD median range n	81,0 ± 8,9 82,0 65 - 91 6	8,0 ± 3,1 8,5 3 - 12 6	37,8 ± 8,6 40,0 21 - 46 6	22,1 ± 12,8 25,5 1 - 34 6	1,93 ± 0,6 1,2 - 2,9	69,5 ± 11,6 48 - 76 6	5,2 ± 2,7 4,3 2 - 10 6	12,8 ± 15,4 12,5 9 - 43 6	16,0 ± 5,7 15,0 9 - 24 6	27,3 ± 16,4 27,0 11 - 49 6	19,9 ± 17,7 19,5 7 - 46 4	
Niere	mean ± SD median range n	70 ± 5,3 8,5 4 - 15 4	76,8 ± 8,9 76,0 67 - 88 4	14,5 ± 8,7 14,0 7 - 23 4	28,3 ± 5,0 28,5 22 - 34 4	32,8 ± 14,7 31,5 12 - 44 4	8,97 ± 0,24 7,5 5,3 - 8,4 4	12,9 ± 23,8 12,5 4 - 55 4	65,0 ± 39,7 58,0 7 - 95 4	12,3 ± 4,8 11,0 8 - 19 4	29,7 ± 18,3 29,0 17 - 56 4	28,7 ± 10,8 28,5 15 - 41 4	
Malignes Melanom (Haut)	mean ± SD median range n	65,3 ± 13,9 85,0 4 - 34 4	81,2 ± 13,6 85,0 62 - 93 4	4,0 ± 1,4 3,5 3 - 6 4	23,7 ± 19,5 19,5 12 - 44 4	46,2 ± 16,3 51,0 24 - 59 4	0,77 ± 0,75 0,4 0,3 - 1,9 4	84,7 ± 14,9 84,0 46 - 81 4	5,2 ± 2,6 4,5 3 - 9 4	11,2 ± 9,8 11,0 5 - 26 4	10,7 ± 2,9 11,0 7 - 14 4	24,7 ± 7,8 22,0 19 - 36 4	7,2 ± 2,8 6,5 5 - 11 4
Magen-Darm-Primärtumors	mean ± SD median range n	13,0 ± 5,6 13,0 9 - 17 2	77,5 ± 10,6 77,5 70 - 85 2	9,5 ± 4,9 9,5 6 - 13 2	48,0 ± 8,5 48,0 42 - 54 2	17,0 ± 4,2 17,0 14 - 20 2	3,25 ± 1,2 3,25 2,4 - 4,1 2	54,5 ± 2,1 54,5 53 - 56 2	4,5 ± 2,1 4,5 3 - 6 2	12,5 ± 7,8 12,5 7 - 18 2	21,0 ± 4,2 21,0 18 - 24 2	20,0 ± 16,9 20,0 8 - 32 2	11,0 ± 7,0 11,0 6 - 16 2

Ergebnisse der flowzytometrischen Phänotypisierung tumorinfiltrierender Lymphozyten in

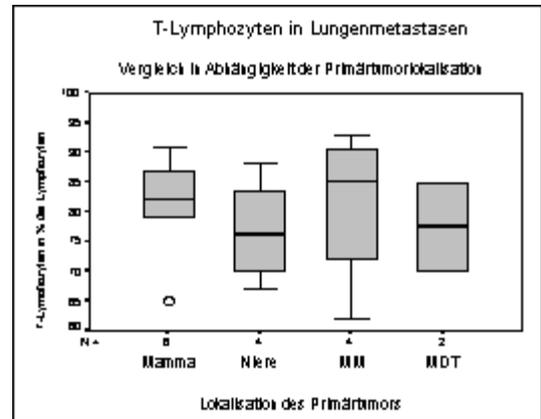
Tab. 7. Tumorlokalisation (mean = Mittelwert, median = Median, range = Spanne zwischen kleinstem und größtem gemessenen Wert, n = Anzahl)

Abb. 12a - 12f: Grafische Darstellung der in Tabelle 7 ausgewiesenen Ergebnisse für Lungenmetastasen mit bekannter Primärtumork Lokalisation als Boxplots (Mamma = Mammakarzinom, Niere = Nierenzellkarzinom, MM = Malignes Melanom, MDT = Karzinom im Bereich des Magen-Darm-Traktes)

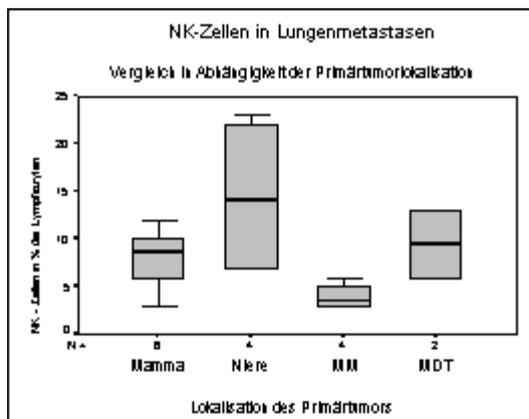
12a



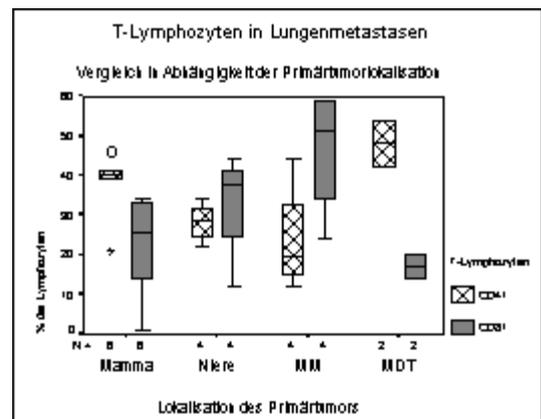
12b



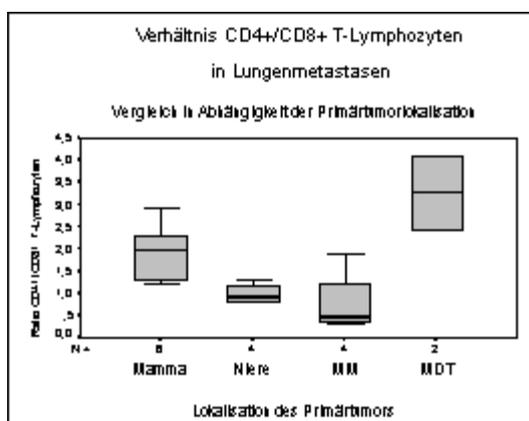
12c



12d



12e



12f

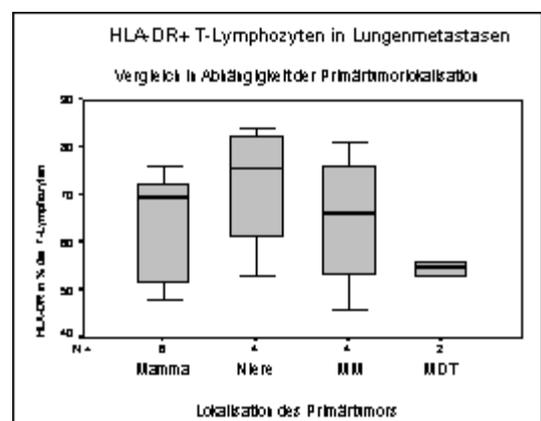
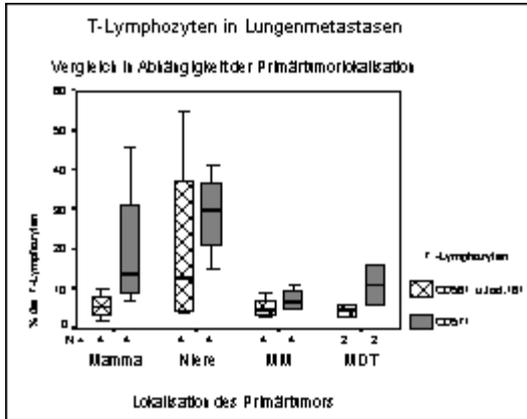
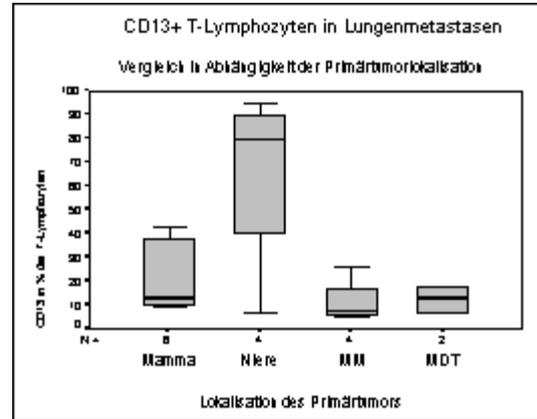


Abb. 12g - 12j: Grafische Darstellung der in Tabelle 7 ausgewiesenen Ergebnisse für Lungenmetastasen mit bekannter Primärtumorlokalisation als Boxplots (Mamma = Mammakarzinom, Niere = Nierenzellkarzinom, MM = Malignes Melanom, MDT = Karzinom im Bereich des Magen-Darm-Traktes)

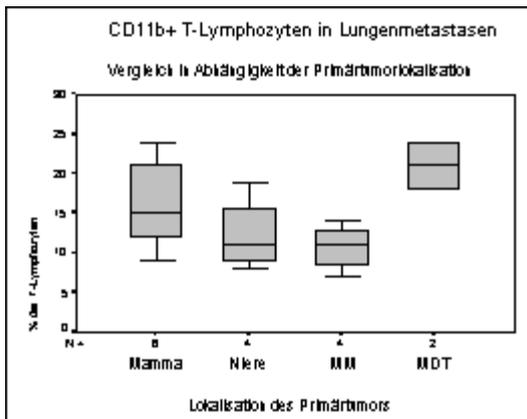
12g



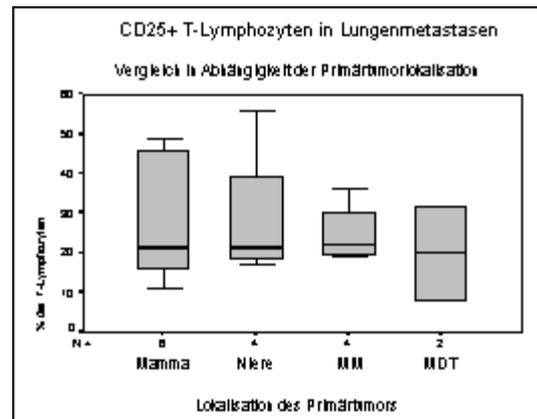
12h



12i



12j

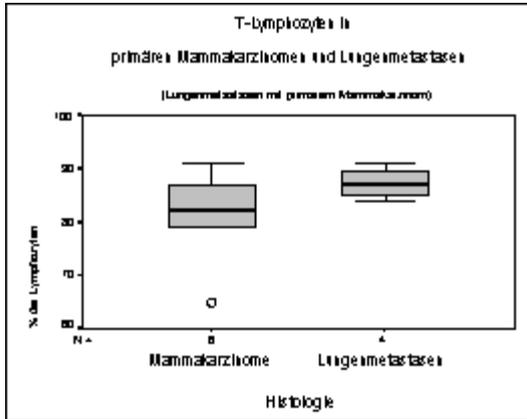


Tab. 8:
 bekanntem primären Mammakarzinom
 (mean = Mittelwert, median = Median, range = Spanne zwischen kleinstem und größtem gemessenen Wert, n = Anzahl)
 Zwischen dem flüssigen und festem Anteil der Lymphe in den Lymphknoten und Lungenmetastasen mit

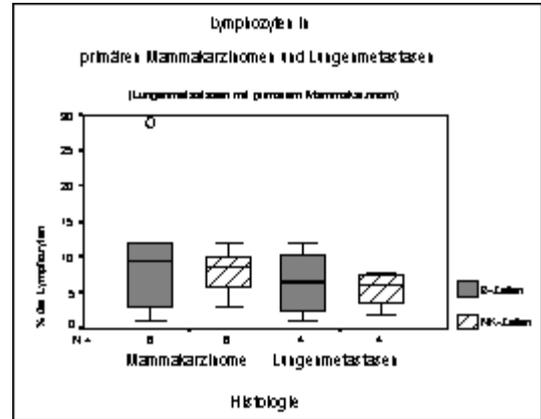
	B - Lymph.	T - Lymph.	NK - Zellen	CD4	CD8	Ratio CD4/CD8	HLA - DR	CD56 und/oder CD13	CD11b	CD25	CD57
Tumor	mean ± SD 6,5 ± 4,9	87,2 ± 2,9	5,5 ± 2,6	36,5 ± 6,0	30,0 ± 2,9	1,32 ± 0,17	60,7 ± 20,8	4,2 ± 1,2	20,2 ± 11,9	19,7 ± 6,2	13,0 ± 2,6
Mamma karzinome	median 6,5	87,0	6,0	36,5	30,5	1,35	60,0	4,0	18,0	19,0	13,0
	range 1 - 12	84 - 91	2 - 8	30 - 43	26 - 33	1,1 - 1,5	36 - 87	3 - 6	10 - 35	13 - 28	10 - 16
Lungen- metastasen (primäres Mammakarzinom)	mean ± SD 10,7 ± 9,9	81,0 ± 8,9	8,0 ± 3,1	37,8 ± 8,6	22,2 ± 12,8	1,93 ± 0,6	64,5 ± 11,6	5,2 ± 2,7	16,0 ± 5,7	27,3 ± 16,4	20,0 ± 17,7
	median 9,5	82,0	8,5	40,0	25,5	1,9	69,5	4,5	15,0	21,0	13,5
	range 1 - 29	65 - 91	3 - 12	21 - 46	1 - 34	1,2 - 2,9	48 - 76	2 - 10	9 - 24	11 - 49	7 - 46
n	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4

Abb. 13a - 13d: Grafische Darstellung der in Tabelle 8 ausgewiesenen Ergebnisse für Mammakarzinome und Lungenmetastasen mit bekanntem primärem Mammakarzinom als Boxplots

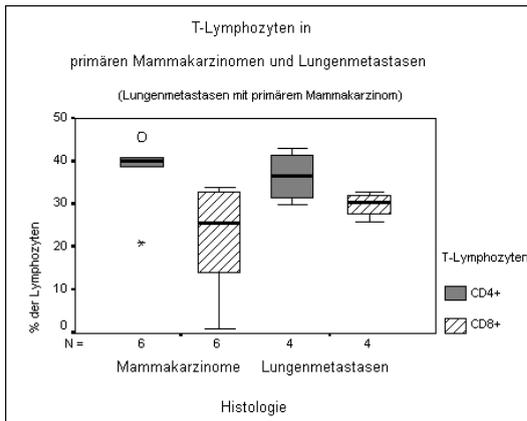
13a



13b



13c



13d

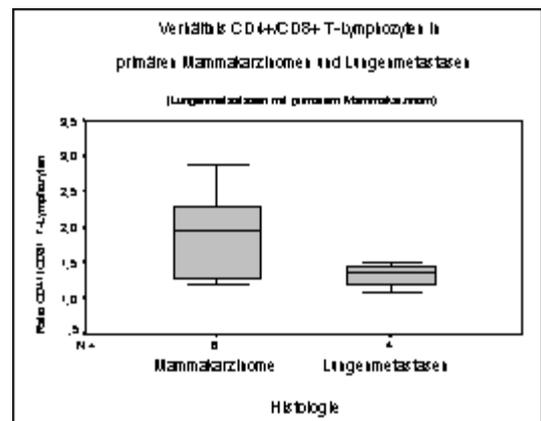
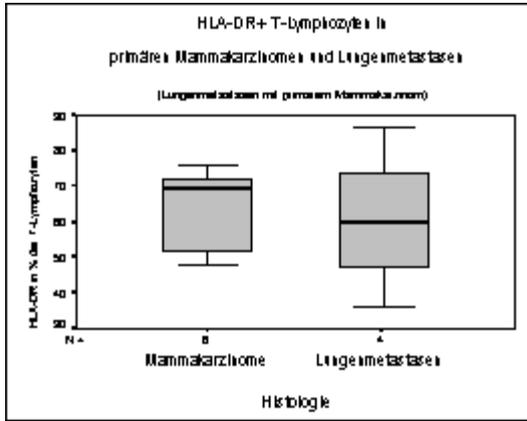
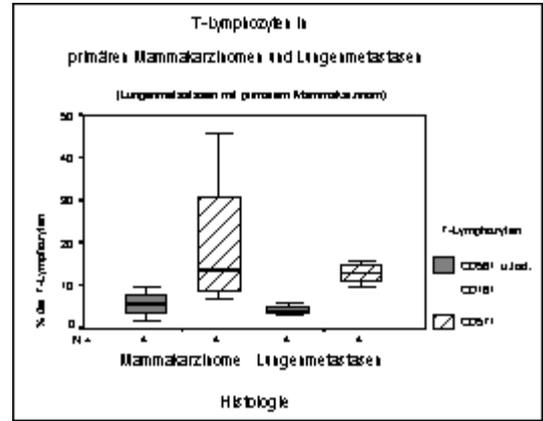


Abb. 13e - 13h: Grafische Darstellung der in Tabelle 8 ausgewiesenen Ergebnisse für Mammakarzinome und Lungenmetastasen mit bekanntem primärem Mammakarzinom als Boxplots

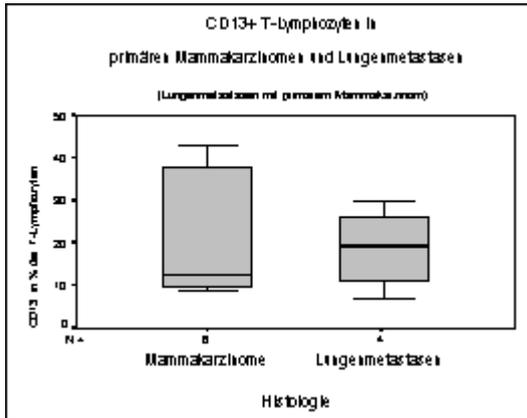
13e



13f



13g



13h

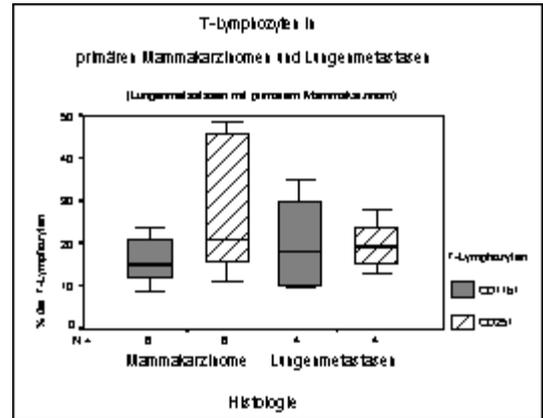
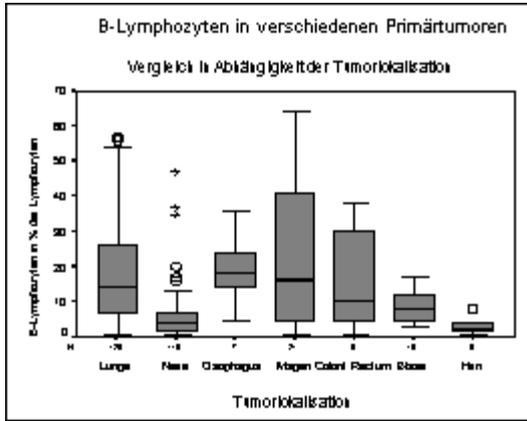
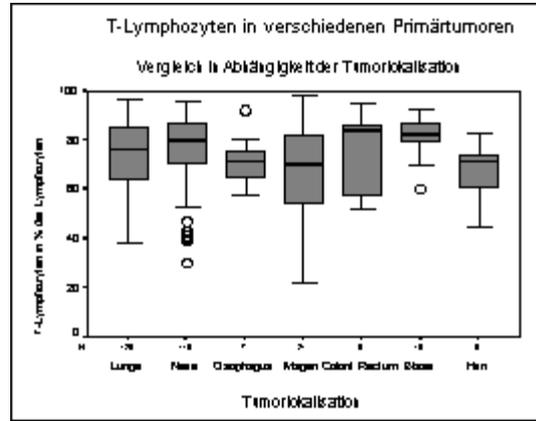


Abb. 14a - 14d: Grafische Darstellung der in Tabelle 9 (S. 39) ausgewiesenen Ergebnisse für TIL in verschiedenen Primärtumoren

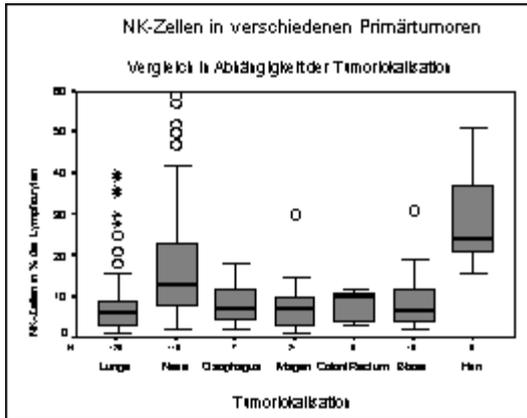
14a



14b



14c



14d

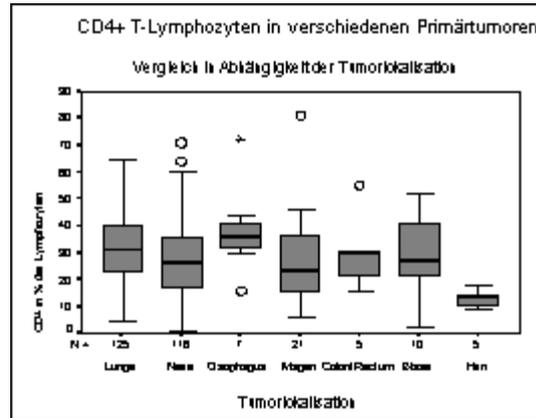
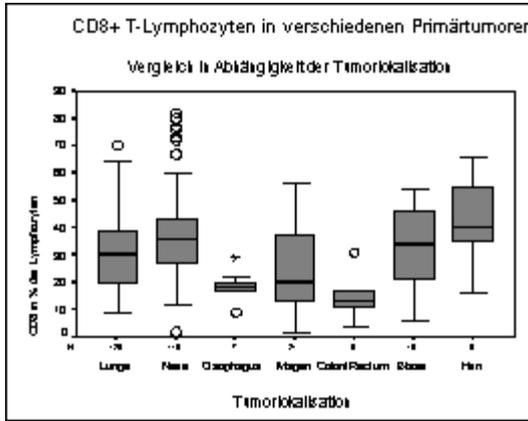
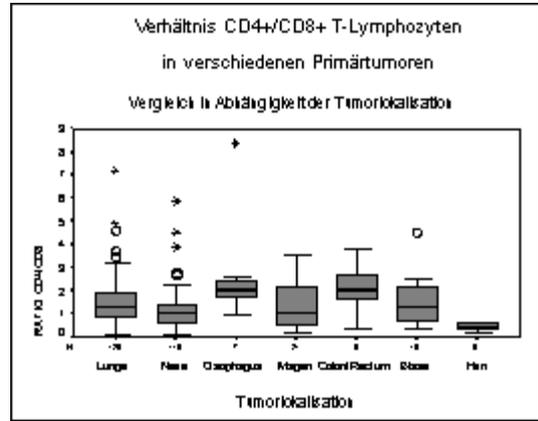


Abb. 14e - 14h: Grafische Darstellung der in Tabelle 9 (S. 39) ausgewiesenen Ergebnisse für TIL in verschiedenen Primärtumoren

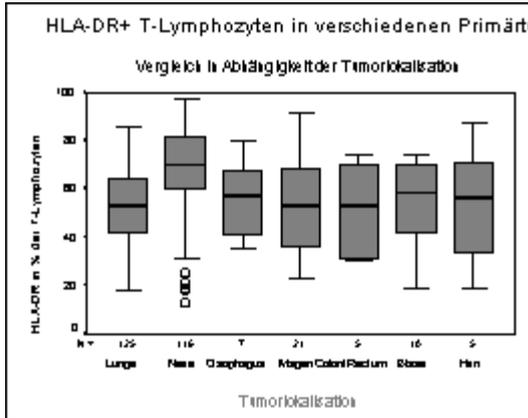
14e



14f



14g



14h

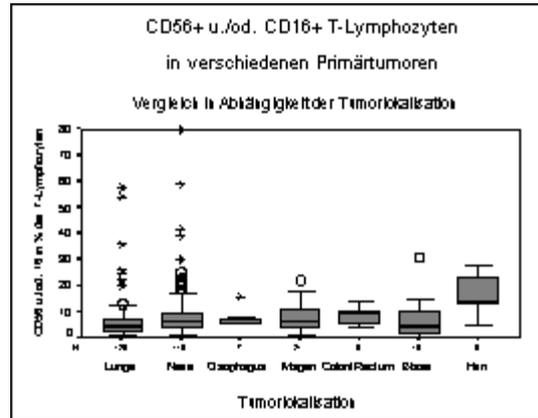
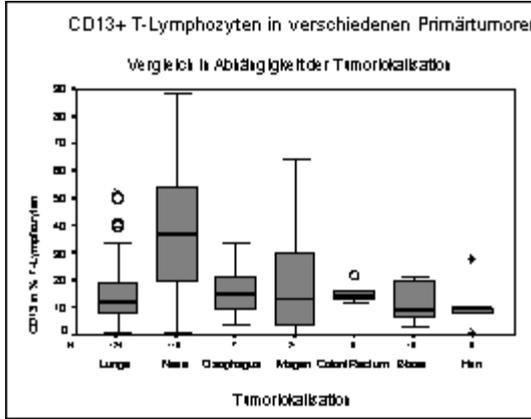
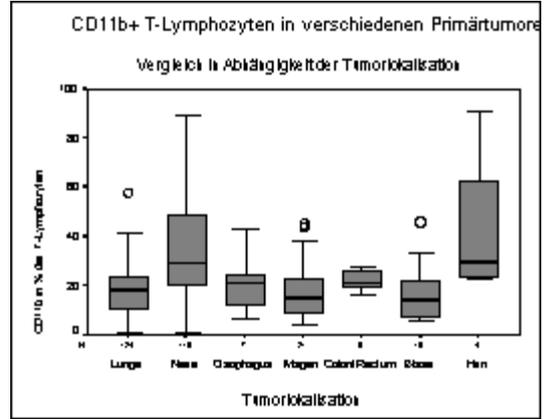


Abb. 14i -14l: Grafische Darstellung der in Tabelle 9 (S. 39) ausgewiesenen Ergebnisse für TIL in verschiedenen Primärtumoren

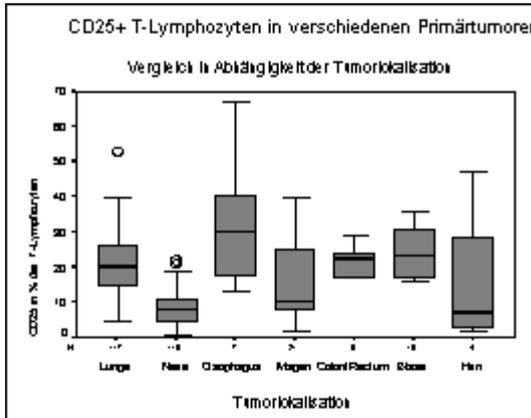
14i



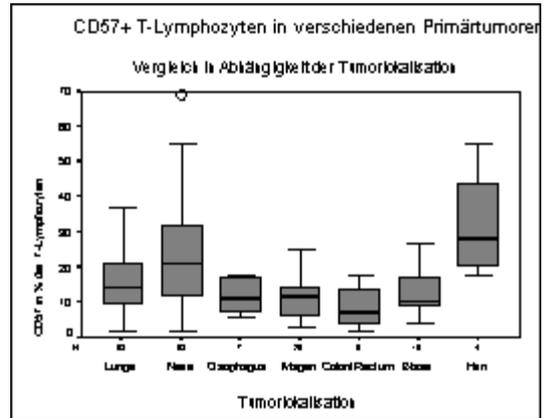
14j



14k



14l



7. Literaturverzeichnis

1. Alexander RB, Fitzgerald EB, Mixon A, Carter CS, Jacobsen M, Cohen PA, Rosenberg SA: Helper T cells infiltrating renal cell carcinomas have the phenotype of activated memory-like T lymphocytes. *J Immunother* 17 (1995) 39 - 46
2. Anastassiou G, Duensing S, Steinhoff G, Zorn U, Große J, Dallmann I, Kirchner H, Ganser A, Atzpodien J: Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1): a potential prognostic marker involved in leucocyte infiltration of renal cell carcinoma. *Oncology* 53 (1996) 127 - 132
3. Annunziato F, Galli G, Cosmi L, Romagnani P, Manetti R, Maggi E, Romagnani S: Molecules associated with human Th1 or Th2 cells. *Eur Cytokine Netw* 9 (1998) 12 - 16
4. Ansorge S, Buhling F, Kahne T, Lendeckel U, Reinhold D, Tager M, Wrenger S: CD26/dipeptidyl peptidase IV in lymphocyte growth regulation. *Adv Exp Med Biol* 421 (1997) 127 - 140
5. Archiv der Pressemitteilungen des Robert Koch-Institutes: Zahl der Neuerkrankungen an Lungenkrebs steigt bei Frauen weiter an. http://www.rki.de/PRESSE./PD/PD2001/PD01_16.HTM
6. Asada Y, Aratake Y, Kotani T, Marutsuka K, Araki Y, Othaki S, Sumiyoshi K: Expression of dipeptidyl aminopeptidase IV activity in human lung carcinoma. *Histopathology* 23 (1993) 265 - 270
7. Asamura H: State of the art treatment of lung cancer: non small cell lung cancer - surgical treatment. *Gan To Kagaku Ryoho* 24 (1997) 366 - 374
8. Asselin-Paturel C, Echchakir H, Carayol G, Gay F, Opolon P, Grunenwald D, Chouaib S, Mami-Chouaib F: Quantitative analysis of Th1, Th2 and TGF- β 1 cytokine expression in tumor, TIL and PBL of non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer* 77 (1998) 7 - 12
9. Autran B, Leblond V, Sadat-Sowti B, Lefranc E, Got P, Sutton L, Binet JL, Debre P: A soluble factor released by CD8+CD57+ lymphocytes from bone marrow transplanted patients inhibits cell-mediated cytotoxicity. *Blood* 77 (1991) 2237 - 2241
10. Baenkler HW: Medizinische Immunologie. Tumorimmunologie VI-2. Ecomed, Landsberg, 2001, S.1 - 33
11. Balch CM, Piley LB, Bae JJ, Salmeron MA, Platsoncas CD, von Eschenbach A, Itoh K: Patterns of human tumor-infiltrating lymphocytes in 120 human cancers. *Arch Surg* 125 (1990) 200 - 205
12. Barclay AN, Brown MH, Law SK, McKnight AJ, Tomlinson MG, van der Anton P: The leucocyte antigen factsbook. 2. Aufl. Academic Press 1997
13. Batzler WU, Bertz J, Eisinger B, Hentschel S, Husmann G, Kieschke J, Lehnert M, Obermann R, Schmidtman I, Schneider D: Krebs in Deutschland- Häufigkeiten und Trends. AG Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. 3. Aufl. Saarbrücken, 2002, S. 1 - 104

14. Becker H, Drings P, Havemann K, Hasse J, Schneider P, Schraube P, Vogt-Moykopf I, Wannemacher M, Zelt J: Therapie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms. Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinien, AWMF online-Leitlinien-Lungenkarzinom-htm. B16 (2000) 230 ff.
15. Becton Dickinson Immunocytometry Systems: Monoclonal antibodies detecting human antigens CD28. www.bdfacs.com.23-2108-02, S. 1 - 3
16. Bhagwat SV, Lahdenranta J, Giordano R, Arap W, Pasqualini R, Shapiro LH: CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. Blood 97 (2001) 652 - 659
17. Bielka H, Dörner T: Molekulare Biologie der Zelle. Gustav Fischer, Jena, Stuttgart, 1995, S. 237 - 243
18. Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, Kaiser HE: Controversies on the prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in solid human tumors. Anti-Cancer Res 20 (2000) 1759 - 1768
19. Bogenrieder T, Finstad CL, Freeman RH, Papandreou CN, Scher HI, Albino AP, Reuter VE, Nanus DM: Expression and localization of aminopeptidase A, aminopeptidase N, and dipeptidylpeptidase IV in benign and malignant human prostate tissue. Prostate 33 (1997) 225 - 232
20. Bowen Yacyshyn MB, Poppema S, Berg A, Mac Lean G, Reddish M, Meikle A, Longenecker B: CD69⁺ and HLA-DR⁺ activation antigens on peripheral blood lymphocyte populations in metastatic breast and ovarian cancer patients: correlation with survival following active specific immunotherapy. Int J Cancer 61 (1995) 470 - 474
21. Brauch H, Böhm J, Höfeler H: Das von Hippel-Lindau (VHL)- Syndrom und die sporadischen Nierenzellkarzinome: Pathogenese, morphologisches Spektrum und Molekulargenetik. Der Pathologe 16 (1995) 321 - 327
22. Chatani M: The state of the art: radiation therapy for non small cell lung cancer. Gan To Kagaku Ryoho 24 (1997) 373 - 378
23. Cheng HC, Abdel-Ghany M, Eible RC, Pauli BU: Lung endothelial dipeptidyl peptidase IV promotes adhesion and metastasis of rat breast cancer cells via tumor cell surface-associated fibronectin. J Biol Chem 273 (1998) 24207-24215
24. Dadmarz RD, Ordoubadi A, Mixon A, Thompson CO, Barracchini KC, Hijazi YM, Steller MA, Rosenberg SA, Schwartzentruber DJ: Tumor-infiltrating lymphocytes from human ovarian cancer patients recognize autologous tumor in an MHC class II-restricted fashion. Cancer J Sci Am 2 (1996) 263 - 267
25. Dadmarz RD, Sagagias MK, Rosenberg SA, Schwartzentruber DJ: CD4⁺ T lymphocytes infiltrating human breast cancer recognise autologous tumor in an MHC class-II restricted fashion. Cancer Immunol Immunother 40 (1995) 1 - 9

26. D' Angeac DA, Monier S, Pilling D, Travaglio-Encinoza A, Reme T, Salomon M: CD57+ T lymphocytes are derived CD57- precursors by differentiation occurring in late immune responses. *Eur J immunol* 24 (1994) 1503 - 1511
27. Dong RP, Kameoka J, Hegen M, Tanaka T, Xu Y; Schlossman SF, Morimoto C: Characterization of adenosine desaminase binding to human CD26 on T cells and its biologic role in immune response. *J Immunol* 156 (1996) 1349 - 1355
28. Dong RP, Morimoto C: Role of CD26 for CD4 memory T cell function and activation. *Hum Cell* 9 (1996) 153 - 162
29. Drings P: Kurzgefasste Leitlinie für Allgemeinärzte: Lungenkarzinome; Interdisziplinäre Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft, AWMF online-Leitlinien-Lungenkarzinom_htm. 1998
30. Eerola AK, Soini Y, Paakko P. A high number of tumor-infiltrating lymphocytes are associated with small tumor size, low tumor stage and a favorable prognosis in operated small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 6 (2000) 1875 - 1881
31. Eerola AK, Soini Y, Paakko P. Tumor infiltrating lymphocytes in relation to tumour angiogenesis, apoptosis and prognosis in patients with large cell lung carcinoma. *Lung Cancer* 26 (1999) 73 - 84
32. Evans TL, Lynch TJ: Lung Cancer. *The Oncologist* 6 (2001) 407 - 414
33. Esteban F, Redondo M, Delgado M, Garrido F, Ruiz-Cabello F: MHC class I antigens and tumour-infiltrating leucocytes in laryngeal cancer: long-term follow-up. *J Cancer* 74 (1996) 1801 - 1804
34. Finke JH, Tubbs R, Connelly B, Pontes E. Tumor-infiltrating lymphocytes in patients with renal cell carcinoma. *Ann NY Acad Sci* 532 (1988) 387 - 394
35. Fiorentini S, Licenziati S, Alessandri G, Castelli F, Caligaris S, Bonafede M, Grassi M, Garrafa E, Balsari A, Turano A, Caruso A: CD11b expression identifies CD8⁺CD28⁺ T-lymphocytes with phenotype and function of both naive/memory and effector cells. *J Immunol* 166 (2001) 900 - 907
36. Fischer C, Oberneder RB: Nierenparenchymkarzinom. Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinien, AWMF online-Leitlinien-Lungenkarzinom-htm. A25 (2000) 331 ff.
37. Ferreira CG, Huisman C, Giaccone G: Novel approaches to the treatment of non-small cell lung cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 41 (2002) 57 - 77
38. Fujisawa T, Yamaguchi Y: Autologous tumor killing activity as a prognostic factor in primary resected non small carcinoma of the lung. *Cancer* 79 (1997) 474 - 481
39. Ganju RK, Sunday M, Tsarwhas DG, Card A, Shipp MA: CD10/NEP in non-small cell lung carcinomas. Relationship to cellular proliferation. *J Clin Invest* 94 (1994) 1784 - 1791
40. Gavin NA, Clarke SR, Negrou E, Gallegos A, Rudensky A: Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T-cells in vivo. *Nat Immunol* 3 (2002) 33 - 41

41. Gianluigi M, Balzanelli M, Gianluigi A, De Cate A, La Viola M, Carella AM, Bianco G, Tarquini R: Lymphocyte subpopulations anomalies in lung cancer patients and relationship to the stage of disease. *In vivo* 13 (1999) 205-210
42. Gisler R: Prinzipien der Immunantwort. *J Allergologie* 7 (1997) 319-328
43. Goedegebuure PS, Eberlein TJ: The role of CD4⁺ tumor-infiltrating lymphocytes in human solid tumors. *Immunol Res* 14 (1995) 119 - 131
44. Gorrell MD, Gysbers V, McCaughan GW. CD26: A multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand J Immunol.* 54 (2001) 249 - 264
45. Hashida H, Takabayashi A, Kanai M, Adachi M, Kondo K, Kohno M, Yamaoka Y, Miyake M: Aminopeptidase N is involved in cell motility and angiogenesis: its clinical significance in human colon cancer. *Gastroenterol* 122 (2002) 376 - 386
46. Hersey P, Jamal O: Immunohistological relation between DR antigen expression on melanoma cells and infiltration by CD8⁺ T cells. *Pathology* 22 (1990) 133 - 139
47. Hoshino T, Yamada A, Honda J, Imai Y, Nakao M, Inoue M, Sagawe K, Yokoyama MM, Oizumi K, Ioh K: Tissue-specific distribution and age-dependent increase of human CD11b⁺ T cells. *J Immunol* 151 (1993) 2237 - 2248
48. Igarashi T, Murakami S, Takahashi H, Matsuzaki O, Shimazaki J: Changes on distribution of CD4⁺/CD45RA⁻ and CD8⁺/CD11⁻ cells in tumor-infiltrating lymphocytes of renal cell carcinoma associated with tumor progression *Eur Urol* 22 (1992) 323 - 328
49. Ito N, Nakamura H, Tanaka Y, Ohgi S: Analysis of T helper type 1 and 2 cells and T cytotoxic type 1 and 2 cells by intracellular cytokine detection with flow cytometry. *Cancer* 85 (1999) 2359 - 2367
50. Janeway CA, Travers P: *Immunologie*. 2. Aufl. Spektrum, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1997
51. Johnson SK, Kerr KM, Chapman AD, Kennedy MM, King G, Cockburn JS, Jeffrey RR: Immune cell infiltrates and prognosis in primary carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 27 (2000) 27 - 35
52. Kehlen A, Olsen J, Langner J, Riemann D: Increased lymphocytic aminopeptidase N/CD-13 promoter activity after cell-cell contact. *J Cell Biochem* 80 (2000) 115 - 123
53. Kerr KM, Johnson SK, King G, Kennedy MM, Weir J, Jeffrey R: Partial regression in primary carcinoma of the lung, does it occur? *Histopathology* 33 (1998) 55 - 63
54. Kiener C: *MSD-Manual der Diagnostik und Therapie*, 6. Aufl. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 2000, S. 1183 - 1198
55. Kim TY, von Eschenbach AC, Fauleck NIL, Hayakawa K, Parkinson DR, Balch CM, Itho K: Clonal analysis of lymphocytes from tumour, peripheral blood and non-tumorous kidney in primary renal cell carcinoma. *Cancer Res* 50 (1990) 5263 - 5268
56. Kowalczyk D, Skorupski W, Kwias Z, Nowak J: Flow cytometric analysis of tumour-infiltrating lymphocytes in patients with renal cell carcinoma. *Br J Urol* 80 (1997) 543 - 547
57. Leiber B: *Die klinischen Syndrome*; 8. Aufl. Urban & Schwarzenberg, München, Wien Baltimore, 1996, S. 286 - 295

58. Lummen G, Blass-Kampmann S, Rübber H, Suhr J, Otto T: Tumor-infiltrating lymphocytes express vascular endothelial growth factor in renal cell carcinomas. *Onkologie* 23 (2000) 458 - 462
59. Luque A, Sanchez-Madrid F, Cabanas C: Functional regulation of the human integrin VLA 1 (CD49a/CD29) by divalent cations and stimulatory β 1 antibodies. *FEBS-Lett* 346 (1994) 278 - 284
60. Markovic-Lipkovski J, Brasanac D, Todorovic V, Müller CA, Müller GA: Immunomorphological characteristics of renal cell carcinoma. *Histol Histopathol* 10 (1995) 651 - 659
61. Masuda N: Combination chemotherapy in the treatment of inoperable non-small cell lung cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 3 (1997) 373 - 383
62. Matsuhisa T: Subset analysis of tumor infiltrating lymphocytes and peripheral blood lymphocytes in malignant glioma patients. *NO TO Shinkei* 47 (1995) 466 - 473
63. Miller LA, Butcher EC: Human airway epithelial monolayers promote selective transmigration memory T cells: a transepithelial model of lymphocyte migration in airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19 (1998) 892 - 900
64. Mountain CF: A new international staging system for lung cancer. *Chest* 89 (1986) 225 -233
65. Nagase Y, Moriyama N, Kurimoto S, Hosaka Y, Tajima A, Higashihara E, Aso Y: Two-color flow cytometric analysis of lymphocytic subsets in renal cell carcinoma. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 85 (1994) 281 - 288
66. Nagashima H, Mori M: Expression of Fas ligand in gastric carcinoma relates to lymph node metastasis. *Int J Onkol* 18 (2001) 1157 - 1162
67. Naruse I, Saijo N: International consensus for lung cancer treatment. *Gan To Kagaku Ryoho* 24 (1997) 451 - 459
68. Nebe CT: Durchflußzytometrische Meßtechnik und Datenauswertung. *Infusionsther Transfusionsmed* 23 (1996) 111 - 113
69. Ohe Y: Prophylactic cranial irradiation in small cell lung cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 24 (1997) 412 - 417
70. Ohta T, Kikuchi H, Ogata H, Iwata K, Yoshida K, Katayama K, Watanabe H: Effect of anti-CD3 antibody on the generation of interleukin-2-activated lymphocytes from tumor tissue of gastrointestinal cancer. *Cancer* 70 (1992) 741 - 748
71. Ortegall JW, Staren ED, Faber LP, Warren WH, Braun DP: Cytokine biosynthesis by tumor-infiltrating T lymphocytes from human non-small-cell lung carcinoma. *Immunother* 48 (2000) 627 - 634
72. Osamu N, Makato S, Yoshitaka N, Kenichi S, Seiichi O, Masataka A, Yasuyoshi S, Ichirou S, Hiroshi N, Haruo O: Proliferative activity of intratumoral CD8⁺T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res* 61 (2001) 5132 - 5136
73. Palmer EM, Seventer GA: Human T helper cell differentiation is regulated by the combined action of cytokines and accessory cell dependent costimulatory signals. *J Immunol*

158 (1997) 2654 - 2662

74. Panayi GS: T-cell-dependent pathways in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 9 (1997) 236 - 240
75. Pasqualini R, Koivunen E, Kain R, Lahdenranta J, Sakamoto M, Stryhn A, Ashmun RA, Shapiro LH, Arap W, Ruoslahti E: Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res* 60 (2000) 722 - 727
76. Perrin G, Schnuriger V, Saas P, Quiquerez AL, Pannetier C, De Tribolet N, Tiercy JM, Aubry JP, Dietrich PY, Walker PR: Astrocytoma infiltrating lymphocytes include major T cell clonal expansions confined to the CD8 subset. *Int Immunol* 11 (1999) 1337 - 1350
77. Proost P, Menten P, Struyf S, Schutyser E, De Meester I, Van Damme J: Cleavage by CD26/dipeptidyl peptidase IV converts the chemokine LD78 beta into a most efficient monocyte attractant and CCR1 agonist. *Blood* 96 (2000) 1674 - 1680
78. Riemann D, Göhring B, Langner J: Expression of aminopeptidase N/ CD13 in tumour-infiltrating lymphocytes from human renal cell carcinoma. *Immunol Lett* 42 (1994) 19-23
79. Riemann D, Kehlen A, Langner J: CD13- not just a marker in leukemia typing. *Immunol Today* 2 (1999) 83 - 88
80. Riemann D, Schwachula A, Hentschel M, Langner J: Demonstration of CD13/aminopeptidase N on synovial fluid T cells from patients with different forms of joint effusions. *Immunobiol* 187 (1993) 24 - 35
81. Riemann D, Wenzel K, Schulz T, Hofmann S, Neef H, Lautenschläger C, Langner J: Phenotypic analysis of T lymphocytes isolated from non-small-cell lung cancer. *Int Arch Allergy Immunol* 114 (1997) 38 - 45
82. Ritz J, Schmidt RE, Michon J: Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Adv Immunol* 42 (1988) 181 - 211
83. Rotteveel FT, Kokkelink I, van Lier RA, Kuenen B, Meager A, Miedema F, Lucas C J: Clonal analysis of functionally distinct human CD4⁺ T cell subsets. *J Exp Med* 168 (1988) 1659 - 1673
84. Roussel E, Gringras MC, Grimm EA, Bruner LM, Moser RP: Predominance of a type 2 intratumoural immune response in fresh tumour-infiltrating lymphocytes from human gliomas. *Clin Exp Immunol* 105 (1996) 344 - 352
85. Roussel E, Gringras MC, Grimm EA, Roth JA: High expression of adhesion molecules/ activation markers with little interleukin-2, interferon gamma, and tumor necrosis factor beta gene activation in fresh tumor-infiltrating lymphocytes from lung adenocarcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 41 (1995) 1 - 9
86. Saito Y, Kanma K, Sagawa M, Sato M, Takahashi S, Usuda K, Fujimura S: Surgical treatment for small cell lung cancer. 24. *Gan To Kagaku Ryoho* 3 (1997) 390 - 397
87. Salgaller ML: The development of immunotherapies for non-small cell lung cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2 (2002) 265 - 278
88. Santos AN, Langner J, Herrmann M, Riemann D: Aminopeptidase N/CD13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes. *Cell Immunol* 201 (2000) 22 - 32

89. Sawyer TE, Bonner JA, Gould PM, Foote RL, Deschamps C, Trastek VF, Pairolero PC, Allen MS, Lange CM, Li H: Effectiveness of postoperative irradiation in stage IIIA non-small cell lung cancer according to regression tree analyses of recurrence risks. *Ann Thorac Surg* 64 (1997) 1402 - 1407
90. Schmid D: Neue Ansätze in der Melanom-Therapie. *Via medici* 4 (1998) 54 - 56
91. Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K: *Kompendium Internistische Onkologie*. 2.Aufl. Springer, Berlin, 1997, Teil 2, S. 521 - 591
92. Seeber S, Schütte J: *Therapiekonzepte-Onkologie*. 3. Aufl. Springer, New York, Berlin, Heidelberg, 1998, S. 289 ff , 447ff.
93. Semino C, Cilli M, Ratto GB, Deng W, Pietra G, Cangemi G, Melioli G: Limiting dilution analysis of peripheral blood lymphocytes reacting with non-small lung cancer: functionally heterogeneous effectors efficiently lyse autologous cancer cells. *Lung Cancer* 21 (1998) 27 - 36
94. Shevach EM, Mc Hugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM: Control of T-cell activation by CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells. *Immunol Rev* 182 (2001) 58 - 67
95. Shipp MA, Tarr GE, Chen CY, Switzer SN, Hersh LB, Stein H, Sunday ME, Reinherz EL: CD10/neutral endopeptidase 24.11 hydrolyzes bombesin-like peptides and regulates the growth of small cell carcinomas of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (1991) 10662 - 10666
96. Slaton JW, Balbay NID, Levy DA, Pisters LL, Nesbitt JC, Swanson DA, Dinney CP: Nephrectomy and vena caval thrombectomy in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Urology* 50 (1997) 673 - 677
97. Stange T, Kettmann U, Holzhausen HJ, Riemann D: Expression patterns of the ectopeptidases aminopeptidase N/CD13 und dipeptidyl peptidase IV/CD26: immunoultrastructural topographic localization on different types of cultured cells. *Acta Histochem* 100 (1998) 157 - 169
98. Stanton A, Glantz PHD: *Biostatistik ein Fach für die Praxis*. 4.Aufl. Mc Graw Hill, New York, San Francisco, St. Lois usw., 1997, S. 11 - 95.
99. Tahara H, Shiozaki H, Kobayashi K, Yano T, Yano H, Tamura S, Oku K, Miyata M, Wakasa K, Sakurai M: Phenotypic characteristics of tumour-infiltrating lymphocytes in human oesophageal tissues defined by quantitative two-colour analysis with flow-cytometry. *Histopathol* 416 (1990) 329 - 334
100. Takamami I, Taceuchi K, Giga M: The prognostic value of natural killer cells infiltration in resected pulmonary adenocarcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 121 (2001) 1058-1063
101. Takenoyama M, Yasumoto K, Harada M, Matsuzaki G, Ishida T, Sugimachi K, Nomoto K: Expression of activation-related molecules on regional lymph node lymphocytes in human cancer. *Immunobiology* 195 (1996) 140 - 151
102. Tarazona R, DelaRosa O, Alonso C, Ostos B, Espejo J. Pena J, Solana R: Increased expression of NK cell markers on T-lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effectors/senescent T cells. *Mech Ageing*

- Dev 121 (2000) 77 - 88
103. Tester W, Mora J: Innovative treatments for non-small cell lung cancer. *10* (2001) 1021 - 1032
 104. The World Health Organization Histological typing of lung tumors. *Am J Clin Path* 77 (1982) 123 - 136
 105. Tokuhara T, Adachi M, Hashida H, Ishida H, Taki T, Higashiyama M, Kodama K, Tachibana S, Sasaki S, Miyake M: Neutral endopeptidase/CD10 and aminopeptidase N/CD13 gene expression as a prognostic factor in NSCLC. *J Thorac Cardiovasc Surg* 49 (2001) 489 - 496
 106. Van den Hove LE, Van Gool SW, Baert L, Coorevits L, Van Damme B, Ceuppens JL: Phenotype, cytokine production and cytolytic capacity of fresh (uncultured) tumour-infiltrating T-lymphocytes in human renal cell carcinoma. *Clin Exp Immunol* 109 (1997) 501 - 509
 107. Viale M, Ferrini S, Serrano S, Serrano D, Ardizzoni A, Nicollin A: Peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in non-small cell lung cancer: Analysis at the population and clonal level. *Tumori* 76 (1990) 488 - 494
 108. Vignoli GC, Martorana G: Molecular genetics of renal cell carcinoma. *Arch Ital Urol Androl* 69 (1997) 265 - 269
 109. Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, Jimenez R, Chillon MJ, Jareno J, Zuñi M, Callol L: Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* 35 (2002) 23 - 28
 110. Wallache DL, Beverley PCL: Phenotypic changes associated with activation of CD 45RA⁺ and CD 45R0⁺ T cells. *Immunology* 69 1(990) 460 - 467
 111. Wang EC, Borysiewicz LK: The role of CD8⁺CD57⁺ cells in human cytomegalovirus and other viral infections. *Scand J Infect Dis* 99 (1995) 69 - 77
 112. Wang EC, Lehner PJ, Graham S, Borysiewicz LK: CD8^{high} (CD57⁺) T cells in normal, healthy individuals specifically suppress the generation of cytotoxic T lymphocytes to Epstein-Barr-virus-transformed B cell lines. *Eur J Immunol* 24 (1994) 2903 - 2909
 113. Warren HS: The CD Corner CD57. *J Biol Regul Homeost Agents* 14 (2000) 322-323
 114. Weber KS, Nelson PJ, Grone HJ, Weber C: Expression of CCR2 by endothelial cells: implications for MCP-1 mediated wound injury repair and in vivo inflammatory activation of endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19 (1999) 2085 - 2093
 115. Weber M, Uguccioni M, Baggiolini M, Clark-Lewis I, Dahinden CA: Deletion of the NH₂-terminal residue converts monocyte chemoattractant protein 1 from an activator of basophil mediator release to an eosinophil chemoattractant. *J Exp Med* 183 (1996) 681 - 685
 116. Weissler JC, Nicod LP, Toews GB: Pulmonary natural killer cell activity is reduced in patients with bronchial carcinoma. *Am Rev Res Dis* 135 (1987) 1353-1357
 117. Weller M, Fontana A: The failure of current immunotherapy for malignant glioma. Tumor-derived TGF-beta, T-cell apoptosis, and the immune privilege of the brain. *Brain Res Rev* 21 (1995) 128 - 151

118. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coucos G, Rubin SC, Kaiser LR, June CH: Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 61 (2001) 4766 - 4772
119. Yamada H, Martin PJ, Bean A, Braun MP, Beatty PG, Sadamoto K, Hansen JA: Monoclonal antibody 9.3 and anti-CD11 antibodies define reciprocal subsets of lymphocytes. *J Immunol* 15 (1985) 1164 - 1168
120. Yamamoto K, Masulo K, Takahashi S, Ikeda Y, Kato T, Mizushima Y: Accumulation of distinct T cell clonotypes in human solid tumors. *J Immunol* 154 (1995) 1804 - 1809
121. Yokojama A: Multimodality therapy for small-cell lung cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 24 (1997) 405 - 411
122. Zocchi MR, Poggi A: Lymphocyte-endothelial cell adhesion molecules at the primary tumor site in human lung and renal cell carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 85 (1993) 246 - 247
123. Zocchi MR, Poggi A, Crosti F, Tongiani S, Rugarli C: Signalling in human tumour infiltrating lymphocytes: The CD28 molecule is functional and is physically associated with the CD45R0 molecule. *Eur J Cancer* 28 (1992) 749 - 754

8. Thesen

1. Das Immunsystem spielt bei der Tumorentstehung eine bedeutende Rolle. Wichtige am Immun- und Abwehrgeschehen beteiligte Zellpopulationen stellen die Lymphozyten dar. Sie werden als sog. tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) in verschiedenen Tumoren nachgewiesen. Informationen zum Immunstatus innerhalb des Tumors lassen Rückschlüsse auf bestimmte Tumorcharakteristika zu und tragen zu einer Optimierung der Tumortherapie und besserer Erfolgskontrolle bei.
2. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie besteht die Möglichkeit, Zellen, wie z. B. TIL genauer zu charakterisieren und aus diesem Wissen auf deren Funktion oder Fehlfunktionen bei der Tumorabwehr zu schließen.
3. Die Phänotypisierung der TIL gleicht einer Momentaufnahme des Immungeschehens zum Zeitpunkt der Tumorentnahme. Sie gestattet Aussagen über die Immunkompetenz der Tumorpatienten.
4. Es gibt einen Zusammenhang zwischen dem vorgefundenen phänotypischen Muster der TIL bzw. der Häufigkeit der auf den Lymphozyten registrierten Oberflächenmoleküle und der Überlebenszeit von Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen.
5. Die flowzytometrische Bestimmung der Oberflächenmarker CD11b, CD26, CD54 und CD13 auf tumorinfiltrierenden T-Lymphozyten (TITL) von Lungentumorpatienten eignen sich als Prognosemarker.
6. Die Effektivität der lymphozytenvermittelten Tumorabwehr hängt nicht proportional von der Quantität der Lymphozytensubpopulationen ab. Für die adäquate Funktion der TIL ist eine starke Expression einzelner Adhäsions- und Aktivierungsmarker auf den Zellen nicht von ausschlaggebender Bedeutung, sondern deren effektivste Kombination.
7. Die Ergebnisse der flowzytometrischen Analyse werden durch die Zugabe des Enzyms Kollagenase bei der Aufbereitung von Tumorproben aus Nierenzellkarzinomen beeinflusst.
8. Für das phänotypische Profil der TIL in Lungen- und Nierenzellkarzinomen spielt die Tumorentität im Gegensatz zu weiteren Faktoren wie Alter, Geschlecht und histologische Subklassifizierung die dominante Rolle.

9. In nicht chromophoben Nierenzellkarzinomen besteht eine negative Korrelation zwischen dem Alter der Patienten und den registrierbaren Werten für das Adhäsionsmolekül CD13 auf den TITL.
10. In hellzelligen Nierenzellkarzinomen existiert ein Zusammenhang zwischen der CD8⁺-Expression auf TIL und dem Differenzierungsgrad des Tumors.
11. Mammatumore und Lungenmetastasen mit bekanntem primären Mammakarzinom gleichen sich hinsichtlich ihres TIL-Phänotyps.
12. Verschiedene Tumorentitäten lassen sich anhand charakteristischer phänotypischer Merkmale ihrer TIL unterscheiden.
13. Der TIL-Phänotyp von Hirntumoren weicht aufgrund der Blut-Hirn-Schranke deutlich von anderen Tumorentitäten ab.