

**Immunantwort nach Gabe von Interferon-alpha,
Interleukin-2 und 5-Fluorouracil bei Patienten mit
metastasiertem Nierenzellkarzinom**

Karl Rohrmann
aus
Bad Harzburg
2006

Aus der Urologischen Klinik und Poliklinik – Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München

ehemaliger Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. A. Hofstetter

jetziger Direktor: Prof. Dr. med. Christian G. Stief

**Immunantwort nach Gabe von Interferon-alpha,
Interleukin-2 und 5-Fluorouracil bei Patienten mit
metastasiertem Nierenzellkarzinom**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilian-Universität zu München

Karl Rohrmann

aus

Bad Harzburg

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. A. Hofstetter

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. D. Schlöndorff
Prof. Dr. med. R. Issels

Dekan: Prof. Dr. med. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2006

Inhalt

Seite

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie des Nierenzellkarzinoms	1
1.2 Risikofaktoren des Nierenzellkarzinoms	3
1.3 Histogenese des Nierenzellkarzinoms	3
1.4 Klinik des Nierenzellkarzinoms	4
1.5 Klassifikationen des Nierenzellkarzinoms	4
1.6 Diagnostik des Nierenzellkarzinoms	7
1.7 Therapie des Nierenzellkarzinoms	7
1.8 Prognosefaktoren des Nierenzellkarzinoms	10
1.9 Immunkompetenz des Nierenzellkarzinoms	12
1.9.1 Verbesserung immunologischer Reaktionen gegen Nierenzellkarzinom- Zellen	14
1.9.2 Immuntherapie beim metastasierten Nierenzellkarzinom	14

2. Ziel der Arbeit

3. Material und Methoden

3.1 Material	23
3.1.1 Geräte	23
3.1.2 Chemikalien	24
3.1.3 Kulturmedien, Puffer und sonstige Lösungen der Zellkultur	25
3.1.4 Zellen	28
3.1.5 Verbrauchsmaterial für die <i>In vitro</i> – Langzeitkultur	28
3.1.6 Verbrauchsmaterial für die Immunfluoreszenz	29
3.1.7 Lösungen für die FACS-Analyse (Durchflußzytometrie)	29
3.1.8 Sonstiges Verbrauchsmaterial	30
3.1.9 Material für Zytotoxizitätsmessungen	30
3.1.9.1 Chemikalien	30
3.1.9.2 Waschlösungen	30
3.1.9.3 Sonstiges Verbrauchsmaterial	31
3.1.10 Kulturmedien und sonstige Lösungen für die Proliferationsmessungen	31
3.1.10.1 Kulturmedium	31
3.1.10.2 Chemikalien	31

3.2 HLA-Typisierung der Spender 1, 2 und 3	32
3.3 Firmen- und Personenverzeichnis	32
3.4 Methoden	34
3.4.1 Methoden der Zellkultur	34
3.4.1.1 Auftauen von Zellen	34
3.4.1.2 Bestimmung der Zellzahl	34
3.4.1.3 Einfrieren von Zellen	35
3.4.1.4 Isolierung von peripheren Blutlymphozyten (PBL)	35
3.4.1.5 Kultivierung und Passagierung adhärent wachsender Tumorzellen	35
3.4.1.6 Langzeit-Stimulationsversuch	36
3.4.1.7 BrdU-Proliferations-Assay (5-bromo-2'-desoxyuridin)	37
3.4.1.8 Generierung von Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK)	38
3.4.2 Messung der zellvermittelten Lyse (CML)	38
3.4.2.1 Markierung der Zellen	38
3.4.2.2 Titration der Effektorzellen	39
3.4.2.3 Inkubationsansatz zur Lanthanid-Freisetzung	40
3.4.2.4 Messung der Lanthanid-Freisetzung	40
3.4.3 Analyse von Oberflächenmolekülen mittels direkter und indirekter Immunfluoreszenz	41
3.4.3.1 Direkte Immunfluoreszenz	42
3.4.3.2 Indirekte Fluoreszenz	42
4. Ergebnisse	43
4.1 Langzeitstimulation von PBL in Koinkubation mit Nierentumorzellen und Zytokinen	43
4.2 Proliferations-Assays von PBL in Kokultur mit Nierentumorzellen und Zytokinen	45
4.3 Die Zytotoxizität von Lymphozyten nach Gabe von Zytokinen und 5-FU	48
4.3.1 In vitro Stimulation von PBMC gesunder Spender	48
4.3.2 Zytotoxizität der PBMC von Patienten im Verlauf der Immunchemo- therapie	51
4.4 Die Durchflußzytometrie (FACS-Analysen) von PBL behandelter Patienten	52
4.5 Umkehrung der sequentiellen Gabe der einzelnen Pharmaka: Chemoimmuntherapie („Münchener Protokoll“)	53

5. Diskussion	56
5.1 Die Kombination der Zytokine erzielt keine signifikante Verbesserung der Stimulation der Lymphozytenfunktion als deren einzelne Gabe	56
5.2 Das Zytostatikum 5-Fluorouracil hat dosisabhängige zytostatische und zytotoxische Effekte auf proliferierende Zellen	58
5.3 Etablierung des Lanthanidfreisetzungstests zur Messung der Zytotoxizität stimulierter Lymphozyten	58
5.4 Verminderung der Lymphozytenaktivität nach Gabe von 5-FU im Rahmen der Immunchemotherapie	60
6. Schlussfolgerung	62
7. Literaturverzeichnis	63
8. Curriculum vitae	
9. Danksagung	

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie:

Das Nierenzellkarzinom (NZK) ist mit über 80 - 85% der häufigste primäre maligne Tumor der Niere, als solcher die zehnthäufigste Ursache des Krebs Todes in den USA. Es repräsentiert aber nur 2% der adulten Malignome [Tavani, 2000]. Die Inzidenz des NZK liegt bei 16,6 Männern und 6,8 Frauen je 100000 Einwohner mit steigender Tendenz [Boeing, 1997]. In Europa werden etwa 27000 Neuerkrankungen pro Jahr registriert, wobei etwa 14000 Patienten tumorabhängig versterben. Der Altersgipfel der Erkrankung liegt zwischen 55 und 71 Jahren, das Verhältnis von Männern zu Frauen liegt bei zirka 2 : 1 je hunderttausend Einwohner [Hölzel, 2003]. Bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung findet man bei etwa 20 – 30% der Patienten eine hämatogene Metastasierung. In bis zu 75% ist die Lunge dabei häufig als einziges Organ betroffen, seltener sind Lymphknoten (26 – 34%), Leber (20 – 33%), Knochen (22 – 32%), Nebenniere (19%), kontralaterale Niere (11%) oder Gehirn [Saitoh, 1997] beteiligt.

Beim Nierenzellkarzinom (NZK) handelt es sich um einen malignen epithelialen Tumor, der vom Nierenparenchym ausgeht. In der Häufigkeitsstatistik bösartiger Tumore der USA sind NZK für 2,4 % aller neu aufgetretenen malignen Neubildungen ursächlich. Beim Mann liegen sie in der Rangliste der häufigsten bösartigen Tumoren an 8. Stelle (2,9 % aller Krebserkrankungen) [American Cancer Society, 2001].

Pathologisch-anatomisch werden verschiedene Subtypen zusammengefasst, die in Abhängigkeit von der angewandten Klassifikation nach histologischen, zytologischen oder zytogenetischen Merkmalen differenziert werden. Der häufigste Subtyp mit einem Anteil von >75 % aller NZK ist das klarzellige NZK. Aufgrund seines häufigen Auftretens sowie seines biologischen Verhaltens ist klinisch gesehen das klarzellige NZK am häufigsten von den Subtypen ursächlich für die Metastasierung bei Patienten mit metastasiertem NZK. In der Regel sind daher die Therapiestrategien auf die Behandlung des klarzelligen NZK ausgerichtet.

Wie bei anderen Tumoren wird die Prognose des NZK vom Ausbreitungsgrad bestimmt. Jedoch haben beim NZK bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ca. 30 % der Patienten ein lokal fortgeschrittenes Tumorstadium und/oder Fernmetastasen. Dies macht die Therapie dieses Tumors ausgesprochen schwierig.

Bei den lokal begrenzten Stadien ist die nierenerhaltende Tumorexzision oder die radikale Tumornephrektomie das Mittel der Wahl. Beim metastasierten NZK ist die alleinige operative Therapie jedoch meist unzureichend.

Hinweise für die Möglichkeit, ein metastasiertes NZK immuntherapeutisch zu behandeln, ergaben sich aus folgenden Beobachtungen [Belldegrun, 1998, Young, 1998]:

1. Spätmetastasierung
2. wechselnde Tumorverdoppelungszeiten
3. erhöhte Inzidenz von NZK bei Patienten unter immunsuppressiver Therapie [Siebels, 2000, Feldmann, 1992, Williams, 1995]
4. Auftreten von Spontanremissionen [Young, 1998, Wyczolkowski, 2001]

1.2 Risikofaktoren

Als Risikofaktoren aus der Umwelt gelten Nikotingenuß und Exposition mit Cadmium, Blei, petrochemischen Substanzen, Thorotrast, Teer und Holzschutzmittel [Tavani, 2000]. Gesicherte Risikofaktoren sind weiterhin chronische Niereninsuffizienz, Zystennieren und die tubulöse Sklerose. Hereditäre Formen des NZK sind gewöhnlicherweise multifokal und bilateral. Sie erscheinen zu einem großen Teil (38 – 55%) in Patienten mit der von-Hippel-Lindau'schen Erkrankung (Hämangioblastome der Retina und des Zentralen Nervensystems, zystische Veränderungen in den parenchymatösen Organen). Diese Erkrankung, die autosomal dominant vererbt wird, ist assoziiert mit chromosomalen Translokationen zwischen den Chromosomen 3 und 11 und 3 und 8 und mit Abnormalitäten der Chromosomen 1, 11 (Deletion) und 17 [van Kessel, 1999].

Desweiteren gibt es Hinweise für eine Assoziation der Erkrankung mit chromosomalen Deletionen an 9p, 13q und 14q [Heath, 1997, Machtens, 1999].

1.3 Histogenese

In etwa 90% der Fälle findet man bei malignen Nierentumoren des Erwachsenen epitheliale Neubildungen (Karzinome) des Nierenparenchyms. Die übrigen 10% der renalen Malignome teilen sich auf in Urothel- und Plattenepithelkarzinome sowie selten Sarkome. Dem gegenüber stehen die seltenen, gutartigen Onkozytome, ebenfalls epitheliale Tumore, und die Angiomyolipome, bestehend aus Gefäßen, glatter Muskulatur und Fett, die nicht metastasieren.

Die NZK entstehen aus den Epithelien der verschiedenen Tubulusabschnitte, sind also renale Adenokarzinome. Wegen ihrer starken gelben Färbung und der Ähnlichkeit der Tumorzellen zu den Klarzellen der Nebenniere, nannte man sie auch Hypernephrome.

Das Wachstumsmuster variiert von papillär bis solide, trabekulär oder tubulär. Der häufigste Tumorzelltyp ist das klarzellige Nierenzellkarzinom (75 – 80% der Fälle). Daneben gibt es chromophile (papilläre) (10%), chromophobe (5%), aus dem Sammelrohrsystem hervorgehende NZK (2%) und Onkozytome (5%).

1.4 Klinik

Kleinere, lokal begrenzte Tumore rufen nur selten Symptome hervor. Aus diesem Grund verzögert sich die Diagnose oft bis die Erkrankung fortgeschritten ist. Die klinischen Befunde sind Hämaturie (50 bis 60% der Patienten), abdominelle Schmerzen (in 40%) und ein palpabler Tumor (in 30 bis 40%) [Ritchie, 1983]. Allerdings findet sich diese klassische Symptom-Trias in nur wenigen Fällen (weniger als 10%). Wenn sie angetroffen wird, ist sie ein zuverlässiger klinischer Symptomenkomplex, allerdings ist sie dann meist schon ein Hinweis für ein fortgeschrittenes Erkrankungsstadium. Häufig sind auch Symptome, die durch Metastasen hervorgerufen werden, wie Schmerzen, Gewichtsverlust, Fieber, Nachtschweiß. Bei zwei Prozent der männlichen Patienten tritt eine linksseitige Varikozele auf, die auf eine Obstruktion der Vena testicularis zurückzuführen ist.

1.5 Klassifikationen

Zur Beschreibung der Ausdehnung und der Festlegung der therapeutischen Möglichkeiten und der Prognosestellung maligner Tumorerkrankungen wurden verschiedene Klassifikationssysteme entwickelt.

TNM-Klassifikation [Guinan, 2000]

Diese in europäischen Ländern verbreitete Klassifikation berücksichtigt die lokale Tumorausbreitung, den Lymphknotenstatus, die Anwesenheit von Fernmetastasen und die histomorphologische Differenzierung der Nierenzellkarzinome. Die 2000 veröffentlichte Version der UICC (Union International Contre le Cancer) wurde 2002 bezüglich des T1- und N-Stadiums erweitert.

T: Primärtumor

T0: kein Anhalt für Primärtumor

T1: Tumor ≤ 7 cm in größter Ausdehnung, auf die Niere begrenzt

T1a: Tumor 4 cm oder weniger in größter Ausdehnung auf die Niere begrenzt

T1b: Tumor mehr als 4 cm aber nicht mehr als 7 cm in größter Ausdehnung auf die Niere begrenzt

- T2: Tumor ≥ 7 cm in größter Ausdehnung, auf die Niere begrenzt
- T3: Tumor breitet sich in größere Venen aus oder infiltriert Nebenniere oder perirenales Fettgewebe, überschreitet jedoch nicht die Gerotafaszie
- T3a: Tumor infiltriert perirenales Gewebe oder Nebenniere, aber nicht jenseits der Gerotafaszie (schließt peripelvines Fettgewebe mit ein)
- T3b: Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in die Nierenvene(n) (schließt segmentale Äste [mit muskulärer Wand] ein) oder V. cava (einschließlich Wandbefall) inferior unterhalb des Zwerchfells
- T3c: Tumor mit makroskopischer Ausbreitung in die V. cava (einschließlich Wandbefall) oberhalb des Zwerchfells
- T4: Tumor jeder Größe infiltriert über die Gerotafaszie hinaus
- TX: Primärtumor kann nicht beurteilt werden

N: Regionäre Lymphknoten

- N0: keine regionären Lymphknotenmetastasen
- N1: Metastase(n) in einem regionären Lymphknoten
- N2: Metastase(n) in mehr als einem regionären Lymphknoten
- NX: regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden

M: Fernmetastasierung

- M0: keine Fernmetastasen
- M1: Fernmetastasierung nachgewiesen
- MX: das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden

G: histologisches Grading

- G1: hoch differenziert
- GII: mäßig differenziert
- GIII: gering differenziert
- GIV: undifferenziert

Die pT- und pN-Kategorien (pathologischen T- und N- bzw. M-Kategorien) entsprechen den T- und N-Kategorien.

Stadieneinteilung nach dem UICC-System:

<u>UICC-Stadium</u>	<u>T-Stadium</u>	<u>N-Stadium</u>	<u>M-Stadium</u>
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1-3	N1	M0
	T3	N0	M0
IV	T4	N0-1	M0
	T1-4	N2	M0
	T1-4	N0-2	M1

Dem gegenüber steht das in den Vereinigten Staaten gebräuchliche System der Tumorstadieneinteilung nach Robson [Robson 1982].

Staging des Nierenzellkarzinoms nach Robson und Holland (mit vergleichender TNM-Klassifikation)

Stadium 1:	Tumor innerhalb der Kapsel (T1-2 N0 M0)
Stadium 2:	Tumorinvasion des perinephritischen Fettgewebes oder der Nebenniere (T3a N0 M0)
Stadium 3:	Tumorbefall
A)	der regionären Lymphknoten (T1-3a N1 M0)
B)	mit Einbruch in die Vena renalis und Vena cava (T3b-c N0 M0)
C)	Kombination von A) und B) (T3b-c N1 M0)

- Stadium 4:**
- A) Infiltration von Nachbarorganen außer Nebennieren (T4 N0-1 M0)
 - B) Fernmetastasen (T1-4 N0-1 M1)

1.6 Diagnostik

Selten findet man die klinische Trias aus Makrohämaturie, Flankenschmerz (gelegentlich verbunden mit Fieber und Gewichtsverlust) und palpablem Tumor (in 9 % der Fälle [Skinner, 1972]). Laborchemische Untersuchung (Urin-Analyse, Blutbild, Kreatinin, Leberenzyme) werden standardmäßig durchgeführt, wobei hier die prognostische Bedeutung der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BKS) und der Lactatdehydrogenase (LDH) hervorgehoben werden muss.

Unerlässlich für die bildgebende Diagnostik sind die Sonographie und die Computertomographie des Abdomens und des Thorax (bei unklaren Befunden im konventionellen Röntgen-Thorax) bzw. Kernspintomographie des Abdomens. Zusätzliche Verfahren (Cavographie, Infusionsurographie, Skelettszintigraphie und Isotopennephrogramm) werden bei unklaren Befunden (Verdacht auf Cavazapfen, Urothelkarzinom, eingeschränkte Nierenfunktion, Hinweise auf Skelettmetastasen) eingesetzt.

1.7 Therapie:

Die Standardtherapie des lokal begrenzten Nierenzellkarzinoms bei gesunder kontralateraler Niere ist die radikale Tumornephrektomie. Sie umfasst die Entfernung der tumortragenden Niere einschließlich der Nierenfettkapsel, der renalen Lymphabflusswege und der ipsilateralen Nebenniere als En-Bloc-Präparat [Guillonneau, 1992]. Die ipsilaterale Adrenalektomie wurde seit den Ergebnissen von Robson [1982] als integraler Bestandteil einer radikalen Tumornephrektomie durch das Erreichen einer deutlich verbesserten 5-Jahresüberlebensrate gesehen. Die Inzidenz des Nebennierenbefalls variiert zwischen 2,4% und 10% [Angervall, 1972]. Dennoch wird der Nutzen der ipsilateralen Adrenalektomie durch die Erkenntnis, dass eine unauffällige computertomographische Darstellung der ipsilateralen Nebenniere eine adrenale Metastasierung weitgehend ausschließt, und die Tatsache, dass eine Nebennierenmetastasierung in der Mehrzahl der Fälle mit simultanen Lymphknoten oder Fernmetastasen assoziiert ist [Sagalowsky, 1994, 1999], in Frage gestellt.

Die organerhaltende Tumorresektion ist in Situationen indiziert, in denen nach vollständiger Entfernung der tumortragenden Niere eine dialysepflichtige Niereninsuffizienz (z.B. bei funktioneller oder anatomischer Einzelniere, doppelseitigen Nierentumoren) droht (imperative Indikation). Bei Vorliegen von kleineren (< 4 cm) einseitigen Nierentumoren wird die organerhaltende Nierentumor Chirurgie inzwischen auch bei funktionierender Gegenniere standardmäßig durchgeführt (elektive Indikation) [Stahler, 1985, Leibovich, 2004].

Bei einem lokal infiltrierender Nierentumor, der in bereits 3 – 5% der Fälle bei Diagnosestellung gefunden wird, oder bei Vorliegen von synchronen Lymphknotenmetastasen (in bis zu 40% der Fälle bei Erstdiagnose) bzw. von Fernmetastasen (in 20 – 30% der Fälle bei Erstdiagnose) ist nach neueren Erkenntnissen die Tumornephrektomie im Rahmen einer zytoreduktiven Chirurgie bei Patienten in gutem Performance-Status indiziert. Sie ist nicht nur bei Auftreten von lokalen Komplikationen (palliative Nephrektomie bei Harnstau, Schmerzen durch Tumorkompression, Hämaturie), sondern auch als Bestandteil einer supradikalen Nierentumor Chirurgie mit nachfolgender Exstirpation von Fernmetastasen für ein selektioniertes Patientengut [Campbell, 2003] sinnvoll. Neuere Studien zeigen bei Patienten ein verlängertes Überleben nach einer Tumornephrektomie und anschließender Immuntherapie mit Interferon-alpha [Mickisch, 2001, Flanigan 2004]. Aufgrund dieser Publikationen sollte bei synchroner Metastasierung die Möglichkeit der Tumornephrektomie im Kontext zu einer geplanten Immuntherapie erwogen werden (Flanigan et al., 2001, Mickisch et al., 2001)

Übersicht über Behandlungsoptionen beim Nierenzellkarzinom:

- *operativ:*
 - organerhaltende Tumorresektion
 - radikale Tumornephrektomie, mit regionärer Lymphadenektomie
 - laparoskopische Tumornephrektomie oder Nierenteilresektion
 - Metastasektomie

- *nicht-operativ:*
 - Immuntherapiestrategien:

- ◆ Zytokin-basierte Therapien, Mono- oder Kombinationstherapien auch mit Zytostatika (Interleukin-2, Interferon-alpha, 5-Fluorouracil, Vinblastin)
 - ◆ Antikörpertherapie
 - ◆ gegen Nierentumor-assoziierte Antigene (z.B. G250)
 - ◆ gegen Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF)
 - ◆ Genetisch-veränderte (Tumor-)Vakzine
 - ◆ Dendritische Zellen beladen mit Tumorzell-Lysat
 - ◆ Angiogenesehemmer
- ◆ Strahlentherapie bei Knochenmetastasen mit lokaler Symptomatik

Die genannten nicht-operativen systemischen Verfahren werden derzeit im Rahmen von Studien überprüft. Ein Einsatz außerhalb von Studien sollte nur in Ausnahmefällen erfolgen.

Versagen klassischer Therapieverfahren

Die klassischen Therapieverfahren wie Chemotherapie oder Bestrahlung sind beim metastasierten NZK (mNZK) nahezu wirkungslos.

Amato [2000] fasste in einer Übersichtsarbeit zahlreiche Studien zur Chemotherapie für >3600 Patienten mit mNZK anhand von Literaturanalysen zusammen. Die höchsten Ansprechraten werden für Vinblastin (im Mittel 6,67 % objektive Remissionsrate) und für 5-Fluorouracil (im Mittel 6,57 % objektive Remissionsrate) als Monotherapeutikum angegeben. Diese beiden Zytostatika haben in der Kombination mit der Zytokinbasierten Immuntherapie weitere Bedeutung. Im Gegensatz hierzu waren Kombinationstherapien verschiedener Chemotherapeutika (Polychemotherapie) ohne größeren Antitumoreffekt als die o.g. Monochemotherapie, wurden jedoch durch eine höhere Rate an Nebenwirkungen belastet. Ursächlich für die geringe Erfolgsquote der zytostatischen Therapie sind vermutlich die Überexpression von Multiple Drug Resistance Proteinen (MDR, z.B. Membranglykoprotein P-170) und der Gluthation-S-Transferase sowie die Niederregulation der Topoisomerase-2 [Amato, 2000, Mickisch, 1990]. Klinische Untersuchungen zur Blockade des Membranglykoprotein P-170 mit

Calziumantagonisten waren jedoch ohne den erhofften Erfolg, da die Resistenzmechanismen gegenüber den Zytostatika meist multipel in NZK auftreten [Volm 1993].

Auch die Bestrahlung hat beim mNZK nur ihren Stellenwert im Rahmen einer Palliation, der Schmerzreduktion bei Knochenbefall oder der Gefahr vom Einbruch in den Wirbelkörperkanal mit drohendem Querschnitt. Brinkmann et al. konnten zeigen, dass die Bestrahlung durch Kombination mit der Immuntherapie einen additiven Effekt hat [1999].

Positiv wirkt sich jedoch die Bestrahlung im Falle von Hirnfiliae aus. Es konnte an einem großen Patientenkollektiv gezeigt werden, dass mit Hilfe der Gamma-Knife-Bestrahlung auch bei multiplen Hirnfiliae in allen Fällen eine komplette Remission zu erreichen ist [Siebels 2002, Wowra, 2002].

Die Hormontherapie kann beim mNZK inzwischen als obsolet angesehen werden. Nach den von Hrushesky et al. [1977] initial berichteten und später revidierten, ermutigenden Remissionsraten durch Medroxyprogesteronacetat (MPA) wurde auch der adjuvante Einsatz der Hormontherapie erprobt. Pizzocaro et al. konnten anhand einer prospektiv randomisierten adjuvanten Studie an 120 Patienten nach radikaler Tumornephrektomie keinen Überlebensvorteil für MPA-therapierte Patienten nachweisen.

1.8 Prognosefaktoren:

Bislang erfolgte die Erstellung von Prognosekriterien anhand klinischer und histopathologischer Patienten- und Tumorcharakteristika. Erweiternd wurde eine orientierende Risikoabschätzung im Hinblick auf Tumorrezidiv bzw. Tumorprogress nach operativer Behandlung entwickelt (klassische „klinische“ Prognosefaktoren). Die zunehmende Auswahl individueller (Patienten-angepasster) Therapiemöglichkeiten führte zur Erweiterung des Spektrums an prognostisch relevanten biologischen Parameter [Machtens, 1999]

Die „klassischen“ bzw. etablierten prognostischen Marker beinhalten die lokale Tumorausbreitung, Lymphknotenbefall und Fernmetastasierung (klinisch TNM-, pathologisch pTNM-Klassifikation). Hinzu kommen Histologie, Differenzierung mit Grading des Nierentumors, Tumorlast, das Alter und der Allgemeinzustand des Patienten [Citterio, 1997].

Als „neue“ biologische Marker werden Proliferationsmarker (Ki67, PCNA („proliferation cell nuclear antigen“) und NOR („nuclear organizer regions“)), Marker für zytogenetische Aberrationen, Tumorsuppressorgene (von Hippel-Lindau-(VHL)-Gen, p53-Tumorsuppressorgen, Retinoblastoma (Rb)-Gen, nm23 (Metastasierungsinhibitor)), Onkogene (bcl-2-Protoonkogen, EGFR („epidermal growth factor receptor“), TGF („transforming growth factor“), ras-Protoonkogene, erbB, c-jun, c-raf-1, HER-2/neu, c-myc-Protoonkogen), Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle (Cadherine), Wachstumsfaktoren (EGF, TGF- α , TGF- β 1, PDGF-A, PDGF-B, bFGF, IGF-1, VEGF), Angiogenese-induzierende Faktoren, Zellzyklus-assoziierte Proteine (Cyklin-assoziierte Kinasen (z.B. Cyklin D-cdk4)), Proteasen und Proteaseninhibitoren (Matrix-Metalloproteinasen (z.B. MMP-2 und MMP-9)) angesehen und sind Bestandteil aktueller Forschungsarbeiten.

Eine weitere Unterteilung in *low-risk* und *high-risk* Patienten-Populationen erfolgt u.a. über den Motzer-Score [Motzer, 1999]. Dieser beinhaltet folgende fünf Kriterien:

- Karnofsky Performance Scale < 80 %
- Hämoglobinkonzentration im Blut unterhalb des Normbereichs
- Kalziumkonzentration im Serum erhöht (> 2,5 mmol/l)
- keine Tumornephrektomie durchgeführt
- LDH-Konzentration im Serum (> 1.5 x der oberen Normgrenze)

Zu den *low-risk*-Populationen gehören Patienten, die höchstens zwei der genannten Kriterien erfüllen. Die übrigen werden zu den *high-risk*-Populationen gezählt. Vergleicht man beide Gruppen, so zeigt sich ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben.

Das pathologische Stadium (Tumorgröße) ist ein wichtiges Einzelkriterium für die Prognose [Maldazys, 1986].

Tumore, die größer als 10 cm in ihrer größten Ausdehnung sind, haben eine schlechte Prognose. Dagegen ist die Prognose für Tumore, die kleiner als 5 cm in ihrer größten Ausdehnung sind, besser.

Das wichtigste mikroskopische Merkmal der Tumorzellen ist das *Grading*. Das Grading beschreibt den Differenzierungsgrad einer maligne entarteten Zelle. Es korreliert mit der Überlebenswahrscheinlichkeit unabhängig vom Stadium [Medeiros, 1997].

5-Jahresüberlebensraten nach den Tumorstadien nach Robson:

Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV	Referenz
81 – 92%	-	-	-	Hafez, 1999
93%	63%	39%	13%	Selli, 1983
88%	67%	40%	2%	Golimbu, 1986
66%	64%	42%	11%	Robson, 1982

Ohne weitere Behandlung versterben 15% der Patienten im fortgeschrittenem Stadium innerhalb eines Jahres.

50 – 60% aller Patienten mit Nierenzellkarzinom entwickeln im Verlauf ihrer Erkrankung Metastasen.

Spontanremissionen von Metastasen wurden in 0,8% der Fälle beschrieben.

Prognose des Nierenzellkarzinoms bezüglich der Metastasierungswahrscheinlichkeit [Selli, 1983]

Stadium der Erkrankung	Prognose
Primärtumor < 3 cm	Metastasierung < 5 %
Primärtumor begrenzt auf die Niere	Metastasierung < 20 %
Positive regionäre Lymphknoten	Metastasierung bei 90 %
Metastasierung	Mittlere Überlebenszeit 12 Monate

1.9 Immunkompetenz des NZK

Experimentelle Untersuchungen (Nachweis von CD3+-T-Lymphozyteninfiltrate in NZK-Tumoren), aber auch die Beobachtung der Spontanregression von Metastasen bei bis zu 1% Prozent der Fälle sprechen für die Immunkompetenz des NZK [Finke, 1992, Kim, 1990, Koo, 1991, Wyczolkowski, 2001, Young, 1998]. Die Induzierbarkeit von objektiven Remissionen durch Interleukin-2 (IL-2), Interferon (IFN) oder tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) bestätigt diese Annahme. Inzwischen sind verschiedene Genprodukte (z.B. MAGE, GAGE, RAGE, gp75) charakterisiert, die als Antigene auf Melanomen, aber auch teilweise auf NZK tumorspezifisch exprimiert

und durch zytotoxische T-Lymphozyten erkannt werden können [Boon et al., 1997, Brändle et al., 1996, Brouwenstijn et al., 1996, Flad et al., 1998, Gaudin et al., 1995, Gaugler et al., 1996, Jantzer et al., 1998, Neumann et al., 1998]. Die Zytotoxizität dieser T-Lymphozyten konnte für das NZK in vitro bestätigt werden [Schendel et al. 1993]. Es handelt sich dabei meistens um CD8+-zytotoxische T-Zellen mit MHC-Klasse-I-restringierter Tumorzellerkennung. MHC-Klasse-II erkennende CD4+ T-Zellen scheinen ebenfalls eine Rolle zu spielen [Hung et al., 1998, Ossendorp et al. 1998, Ostrand-Rosenberg et al. 1990, Pardoll, 1998]. Durch adoptiven Transfer von zytotoxischen T-Zellen lassen sich Remissionen manifester Tumoren erreichen [Cheever et al. 1997, Greenberg et al., 1991]. Der größere Teil der Tumoren kann sich jedoch der Erkennung durch T-Zellen durch die bereits o.g. Mechanismen entziehen (Downregulation von MHC- oder Adhäsionsmolekülen etc.). Eine effektive Immunantwort kann auch durch immunsuppressive Zytokine wie IL-10 oder TGF-alpha und durch Expression Apoptose-induzierender Liganden wie FasL verhindert werden [Qin et al., 1997, Seeliger et al., 1997, Wick et al., 1997].

Tumorerkrankung und Immunüberwachung

Das Modell der Immunüberwachung postuliert von Burnet [1959] beruht auf der Annahme, dass prinzipiell viele entartete Zellen vom natürlichen oder erworbenen Immunsystem erkannt und eliminiert werden können. Für die Beteiligung der erworbenen Immunantwort bei der Tumorerkennung sprechen vor allem Untersuchungen beim malignen Melanom. Das maligne Melanom gilt, wie das NZK, als immunogen, da damit assoziierte Tumorantigene wie z. B. MART-1 [Abdel-Wahab, 2003], sogenannte gewebespezifische Differenzierungsantigene, die u.a. durch MHC-Klasse I präsentiert werden, spezifisch von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden können. Auch andere Tumorantigene (z.B. MAGE, BAGE, GAGE, RAGE, gp75) können in somatischen Zellen exprimiert werden und führen dann über die Präsentation HLA-A2 restringierter Epitope zur Immunerkennung. Spontanmutationen in somatischen Zellen sind ein häufiges Ereignis. Das steigende Krebsrisiko bei Menschen mit zunehmenden Alter deutet daher darauf hin, dass entartete Zellen über lange Zeit in ihrem Wachstum und ihrer Ausbreitung gehindert werden. Schwachstellen des Immunsystems des menschlichen Körpers werden bei der Krebsentwicklung aufgesucht und erlauben über unterschiedliche Mechanismen unkontrolliertes Wachstum von Tumorzellen. Normalerweise werden MHC-I-Moleküle

von fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert, manche Tumorzellen entgehen durch fehlende MHC-Klasse-I-Expression der Erkennung durch das spezifische Immunsystem. Weiterhin spielen wohl in manchen Fällen die in der Umgebung vorherrschenden Zytokine eine Rolle. Auch von Tumoren können Stoffe wie z.B. der transformierende Wachstumsfaktor-beta freigesetzt werden, der eine immunsuppressive Wirkung hat.

1.9.1 Verbesserung immunologischer Reaktionen gegen NZK-Zellen

Da die meisten NZK-Zellen prinzipiell Antigene exprimieren, wurden verschiedene Strategien entwickelt, um eine Immunreaktion gegen NZK zu induzieren bzw. zu verstärken. Diese umfassen im Wesentlichen die aktive und passive Immunisierung sowie die Unterstützung einer Reaktion durch exogene Zugabe von Mediatoren (Zytokine). Immunisierungsstrategien konzentrieren sich hierbei auf die Induktion humoraler und/oder zellulärer Immunreaktionen.

Dabei wurden diese Strategien sowohl in vivo an murinen Tiermodellen bzw. an Patienten als auch in vitro untersucht.

1.9.2 Immuntherapie beim mNZK

Beim mNZK ist die derzeit erfolgsversprechenste und klinisch am häufigsten angewandte Behandlung die systemische Immuntherapie mit IL-2 und/oder IFN-alpha. Ursprünglich wurde IL-2 in der Monotherapie intravenös (i.v.) eingesetzt und führte zu Ansprechraten von 13 - 20% [Fisher et al., 1997]. Bessere Ergebnisse ergaben sich in der adoptiven Immuntherapie durch die zusätzliche Gabe von TILs [Kradin et al., 1989] oder Lymphokin-aktivierten Lymphozyten (LAK) [Rosenberg et al., 1987, Thompson et al., 1992]. Aufgrund des ausgeprägten Nebenwirkungsspektrums von IL-2 war diese Therapie nur unter intensivmedizinischen Bedingungen durchführbar. Eine kürzlich publizierte Multicenterstudie konnte keine Verbesserung der Ansprechrate bei Patienten mit mNZK nach Gabe von CD8+-TILs plus IL-2 Dauerinfusion im Vergleich mit der alleinigen Gabe von IL-2 zeigen [Figlin et al., 1999]. Heute dominiert die subkutane (s.c.) Applikationsweise. Bei Lungen- beziehungsweise Mediastinalmetastasen kann

IL-2 auch per inhalationem verabreicht werden [Heinzer et al., 2002]. Auch mit IFN-alpha (s.c.) wurden monotherapeutische Behandlungsversuche unternommen, die Ergebnisse waren jedoch enttäuschend [Minasian et al., 1993]. Die Entwicklung führte über die Kombination von IFN-alpha 2a/b und Vinblastin [Kriegmair et al., 1995] oder 5-Fluorouracil (5-FU) [Sella et al., 1992] mit Ansprechraten von bis zu 25%, zur Immun- (chemo-) therapie mit IL-2 s.c., und IFN-alpha2a s.c. bzw. plus 5-FU i.v. mit vereinzelt nochmals gesteigerten Ansprechraten [Hänninen et al., 1996, Hofmockel et al., 1996]. Die Rationale für die Kombination von IFN-alpha 2a mit 5-FU ergab sich aus dem experimentell beobachteten Synergismus dieser Substanzen, der jedoch klinisch bisher nicht bewiesen ist [Wadler et al., 1989]. Im Gegensatz dazu gibt es jedoch auch klinische Studien, die in der Zugabe von 5-FU keinen Vorteil sehen [Negrier et al., 2000].

Das relativ nebenwirkungsarme orale Capecitabine (enzymatische Konvertierung zu 5-FU) stellt möglicherweise eine Weiterentwicklung dar [Cassidy et al., 1998]. Erste klinische Studien an Tumoren liegen vor (Blum et al., 1999). Inwieweit die additive orale Therapie mit Isotretinoin die Ergebnisse der Immuntherapie verbessern kann, ist noch unklar [Stadler et al., 1998]. Eigene Untersuchungen dazu zeigen keine Verbesserung dieser Modifikation [Atzpodien, 2003].

In neueren Studien werden immunmodulierende Substanzen (IL-2, IFN-alpha) auch mit GM-CSF kombiniert. Die Erfolgsraten dieser Therapie sind in den bisherigen wenigen Studien widersprüchlich [Ryan et al., 2000, Westermann et al., 2001].

Die in Deutschland inzwischen als Quasi-Standard-Protokoll eingesetzte Immunchemotherapie besteht aus der sequentiellen Gabe der beiden Zytokine IL-2 und IFN-alpha und dem Zytostatikum 5-FU [Huland et al., 2002]. Die Verabreichung der beiden Zytokine erfolgt subkutan in verschiedenen Dosierungen (IFN-alpha 6×10^6 U/ m^2 und 9×10^6 U/ m^2 , IL-2 5×10^6 U/ m^2 und 20×10^6 U/ m^2), die des 5-FU intravenös ($750 - 1000$ mg/ m^2 Körperoberfläche) über einen Zeitraum von 8 Wochen. In den ersten vier Wochen werden die Zytokine als Zweierkombination gegeben. In den anschließenden vier Wochen wird IFN-alpha dreimal wöchentlich verabreicht mit der einmal wöchentlichen Gabe von 5-FU.

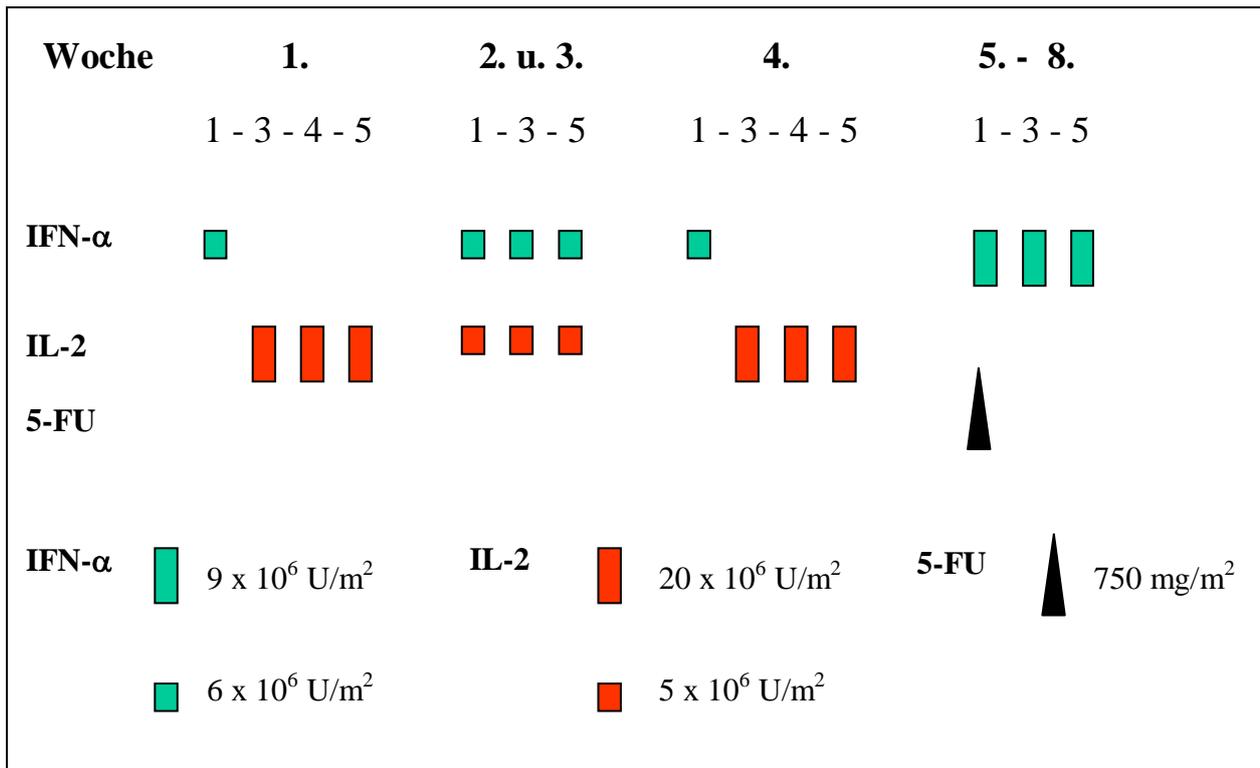
Immunchemotherapie (nach Atzpodien et al. [2001]):

Abbildung 1: Schema der Immunchemotherapie nach dem Hannover-Protokoll.

Zytokine

Zytokine sind von Zellen freigesetzte Proteine, die para- und autokrine Aktivität besitzen. Werden die Zytokine von Lymphozyten sezerniert, nennt man sie Lymphokine, Interleukine oder Interferone (z.B. IL-1, IL-2, IFN-alpha etc.). Zytokine wirken durch Bindungen an einen Zytokinrezeptor an der Zelloberfläche der zu beeinflussenden Zellen.

Interferon-alpha

Interferone (IFNs) sind natürlich vorkommende Glykoproteine, die bei der Immunantwort gegenüber viralen Erkrankungen, Antigenen und Mitogenen produziert werden. Die Synthese von IFNs kann aber auch durch andere Zytokine, wie Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α) und Interleukine, stimuliert werden. Man konnte bislang drei Kategorien von rekombinanten IFNs identifizieren: IFN- α (hauptsächlich von Leukozyten stammend), IFN- β (hauptsächlich von Fibroblasten produziert) und IFN- γ (hauptsächlich von T-Lymphozyten freigesetzt). „Natürlich vorkommende“ IFNs werden von Leukozyten oder von Lymphozyten produziert.

IFNs können über die Bindung an spezifische IFN-Rezeptoren folgende Effekte ausüben:

1. Immunmodulation
 - a. Aktivierung Natürlicher Killerzellen
 - b. Aktivierung von zytotoxischen Zellen
 - c. Induktion von Major Histokompatibilitäts (MHC bzw. HLA) Klasse I Antigenen
2. Antiproliferative Aktivität
3. Antiangiogenese
4. Regulation der Differenzierung in Effektorzellen
5. Interaktion mit Wachstumsfaktoren
6. Modulation der Genexpression

andere Effekte: antivirale Aktivität, Regulation des Fettmetabolismus (durch IFN- γ)

IFN- α wird intramuskulär oder subkutan appliziert, wodurch eine Bioverfügbarkeit von etwa 80% erreicht wird. Spitzenkonzentrationen erhält man eine Stunde bis sechs Stunden nach Applikation, die Spiegel bleiben für weitere sechs Stunden stabil, eine langsame Abflutung erfolgt innerhalb der darauffolgenden 18 bis 36 Stunden. Eine intravenöse wie auch eine inhalative Verabreichung sind ebenso möglich aber eher unüblich.

Seit den 90-iger Jahren sind Interferone häufig mit IL-2 kombiniert worden, nachdem *in vitro* Untersuchungen synergistische Effekte der beiden Zytokine zeigten. Die intravenöse Applikation von IL-2 führte in der Kombination mit IFN-alpha zu beträchtlichen Nebenwirkungen (capillary leak syndrome, akutes Herzversagen). Dagegen ist die subkutane Verabreichung von IL-2 verträglicher, auch in der Dreierkombination mit 5-FU.

Nebenwirkungen von IFN-alpha (Subtyp Interferon-alpha2a):

Neben erheblichen Nebenwirkungen im Bereich des Gastrointestinaltraktes (z.B. Hepatitis, Magen-Darm-Blutungen und Rezidiv eines Magengeschwürs) zeigen sich auch andere, die Lebensqualität einschränkende Effekte, wie Suizidgefährdung, Ödembildung, Zyanose, Nasenbluten. Im Kardiopulmonalen System treten zwar eher selten, aber dennoch intensive medizinische Versorgung anfordernde Nebenwirkungen, wie Lungenödem, Herzstillstand, Myokardinfarkt, Pneumonie und Nierenversagen auf. Noch seltener sind Schilddrüsenfunktionsstörungen (Autoimmunthyreoiditis), Muskel- und Gelenkschmerzen, vorübergehende Impotenz, ischämische Retinopathie, Neuropathie und Schlafstörungen.

Interleukin-2

Seit den 80-iger Jahren werden Untersuchungen zur Funktion des IL-2 vorgenommen. Es ist ein ursprünglich als T-Zell-Wachstumsfaktor identifiziertes Molekül. Das IL-2 hat die dosisabhängige Eigenschaft, Lymphozyten zur Differenzierung und Proliferation anzuregen und aktivierte Lymphozyten zu stimulieren (z.B. Generierung von Lymphokin aktivierten Killerzellen, LAK-Zellen).

Die immunologischen Effekte des IL-2 werden initiiert durch die Signaltransduktion über intrazelluläre Domänen der β - und γ -Untereinheiten des $\alpha\beta\gamma$ *high-affinity* IL-2 Rezeptors (IL-2R), der konstitutionell nur in einem geringen Anteil von ruhenden NK-Zellen exprimiert ist. Der übrige Anteil der NK-Zellen exprimiert einen *lower-affinity* $\beta\gamma$ IL-2R, der höhere Konzentrationen von IL-2 für die Aktivierung benötigt. NK-Zellen werden durch IL-2 zur Sekretion von einer Reihe anderer Zytokine stimuliert, die Zellen des Makrophagen/Monozyten-Systems aktivieren können, wie IFN- γ , Granulozyten-Makrophagen Colony stimulierender Faktor (GM-CSF), Tumornekrose-Faktor-alpha (TNF- α), IL-1 β und IL-6. Weiterhin sind zytolytische Moleküle sowohl der Perforin- als auch der Granzym-Gruppe in NK-Zellen induziert. Die verstärkte Antikörper-abhängige zelluläre Toxizität kann auch durch die IL-2-Wirkung verursacht sein.

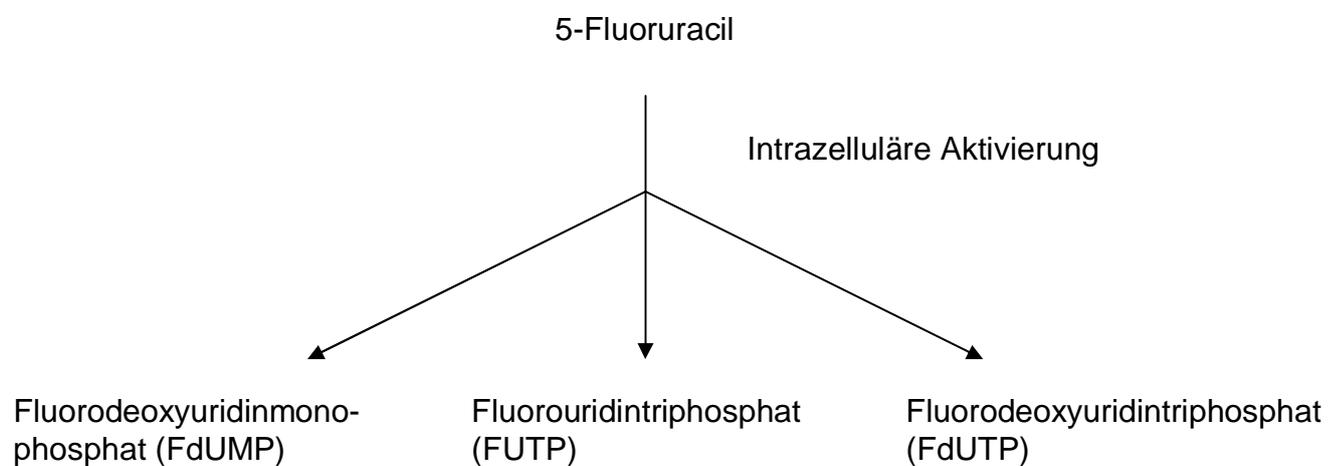
Die systemische IL-2-Applikation kann die Aktivierung von Endothelzellen, die Veränderungen der Expression vaskulärer zellulärer Adhäsionsmoleküle und die lokale Sekretion von hohen Konzentrationen von Nitrooxid durch endotheliale Zellen als Antwort auf TNF- α bewirken.

Nebenwirkungen von IL-2:

Die verbreitete Organsystem-Toxizität von IL-2 wurde mit dem klinischen Bild des septischen Schocks verglichen [Ognibene, 1988]. Die besonderen Nebenwirkungen, die die individuelle Dosierung des Patienten limitieren, reichen von relativ spezifischen Organsystemwirkungen, wie Nephrotoxizität, arterieller Hypotonie, Azidose oder Neurotoxizität, bis allgemeine Effekte, wie Gewichtszunahme oder schwere konstitutionelle Nebenwirkungen, wie Fieber, Schüttelfrost, Diarrhöe, Übelkeit, Erbrechen. Ebenso beschrieben wurde das Auftreten von Ödembildung, Hautausschlag, Bronchospasmus, Myalgien, Stomatitis, ulzeröse Läsionen, erhöhte Empfindlichkeit gegenüber bakteriellen Infektionen („loss of neutrophil chemotaxis“), Gewichtszunahme (extravasaler Flüssigkeits-Shift, Volumenretention bei Hypotension), Anorexie, Schwäche, Unwohlsein.

5-Fluorouracil

Das Pyrimidinanalogon 5-Fluorouracil (5-FU) wird in drei Metabolite (siehe Abbildung 2) FdUMP, FUTP und FdUTP aktiviert, die in die Reaktionsschritte der DNA-Synthese eingreifen. Dabei inhibiert Fluorodesoxyuridinmonophosphat (FdUMP) das Enzym Thymidylatsynthase und die Synthese von dTTP (Desoxy-Thymidintriphosphat). Fluorouraciltriphosphat wird in die RNA eingebaut und führt zu einer gestörten RNA-Prozessierung und -Funktion. Fluorodesoxyuridintriphosphat wird in die DNA eingebaut und kann zu DNA-Strang-Brüchen führen.



- FdUMP → inhibiert die Thymidylatsynthase und die Synthese von dTTP
- FUTP → wird in die RNA inkorporiert, interferiert mit ihrer Prozessierung und Funktion
- FdUTP → wird in die DNA inkorporiert führt zum Bruch des DNA-Stranges

Abbildung 2: Die intrazelluläre Metabolisierung von 5-FU und die Effekte der Metabolite.

Nebenwirkungen der 5-FU-Therapie

Die Toxizität von 5-FU ist abhängig von der Applikationsweise. Bei der Bolusinfusion steht die Knochenmarkssuppression im Vordergrund, während bei der kontinuierlichen Infusion die gastrointestinale Toxizität eher vorherrschend ist. 5-FU ist gelegentlich mit einem myokardialen ischämischen Syndrom verbunden. In der Regel reversible neurologische Symptome beinhalten Kopfschmerzen, zerebelläre Ataxie und Somnolenz. Dermatologische Beschwerden wie Dermatitis, Hyperpigmentation und Hautatrophie sind nicht selten.

2. Ziel der Arbeit

Die Effektivität der Immunchemotherapie bei Patienten mit metastasiertem NZK beträgt Ansprechraten von maximal 30 – 40 %. Die Zusammensetzung dieses Therapieschemas beruht nur auf empirischen Daten. Die Reihenfolge der einzelnen Pharmaka mit den Zytokinen IL-2 und IFN-alpha in den ersten vier Wochen und der anschließenden Gabe von IFN-alpha und 5-FU in den zweiten vier Wochen ist rein willkürlicher Natur. In der derzeitigen Reihenfolge erfolgt nach Stimulation der Lymphozyten eine zytostatische Therapie mit 5-FU. Immunologisch sinnvoll erscheint dieses nicht.

In unserer Klinik sollte des weiteren eine Methode zur nicht-radioaktiven Messung zytotoxischer Aktivitäten von Lymphozyten eingesetzt werden. Hierzu wurde der Lanthanidfreisetzungstest nach Blomberg [1996] etabliert.

Im Rahmen der Dissertation wurden die immunologischen Effekte der Zytokine IL-2 und IFN-alpha in Kombination mit dem Zytostatikum 5-Fluorouracil auf Lymphozyten von Patienten mit metastasiertem NZK und gesunden Probanden untersucht. Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Erfolgt durch die Kombination der Zytokine Interleukin-2 und Interferon-alpha eine verbesserte Stimulation der Lymphozytenfunktion (Proliferation und Zytotoxizität) als bei deren Einzelgabe?
2. Hemmt die Gabe von 5-Fluorouracil die Lymphozytenaktivität, auch in Kombination mit Interleukin-2 und Interferon-alpha?
3. Sind die Effekte der Immunchemotherapie auf die Zytotoxizität der stimulierten Lymphozyten *ex vivo* mit dem Lanthanidfreisetzungstest reproduzierbar messbar?
4. Welchen Einfluss hat der Zeitpunkt der Gabe von 5-FU im Rahmen der Immunchemotherapie mit IL-2 und IFN-alpha?

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Bestrahlungsanlage <i>Gammacell 40</i>	Atomic Energy
Bidestilliergerät <i>Easypure RF</i>	Barnstead
CO ₂ Inkubator <i>BB6220</i>	Heraeus
Digestorium	Prutscher
Eismaschine	Ziegra
ELISA-reader mit 450 nm Filter	Molecular Devices
FACSCalibur	Becton Dickinson
Fluorometer <i>Victor</i>	Wallac
Gefrierschränke	
▪ -20 °C	Liebherr
▪ -20 °C	Bosch
▪ -80 °C <i>HFU86</i>	Heraeus
▪ -80 °C <i>UF80-450S</i>	Colora/Fischer
Heizrührer <i>Ret basic</i>	IKA Labortechnik
Horizontalschüttler	IKA Labortechnik
Kühlschrank (4 °C) <i>Kirsch</i>	Bosch
Magnetrührer <i>Ret basic</i>	IKA Labortechnik
Mikroskope	
▪ Mikroskop <i>DMIL</i>	Leica
▪ Fluoreszenzmikroskop Axiolab	Zeiss
Mischgerät <i>Minishaker</i>	Bender & Hobein
Neubauer-Zählkammer	Brand
Pipettierhilfen	
▪ Makropipetten	Abimed
▪ Makropipetten	Brand
▪ Makropipetten <i>Pipetus standard</i>	Hirschmann
▪ Makropipetten	Unia Equia
▪ Mehrkanalpipetten	Dunn Labortechnik
▪ Mikropipetten	Eppendorf reference

▪ Mikropipetten	Nichiryo
▪ Multipetten	Eppendorf Multipette plus
pH-Meter <i>Microprozessor</i>	WTW
Sterilwerkbank <i>Heraafe HS18/2</i>	Heraeus
Stickstofftank <i>Chronos Biosafe</i>	Messer Griesheim
Stoppuhr <i>Digital Timer</i>	Casio
γ -Strahlendetektor <i>Wizard 1480</i>	Wallac
Waagen	
▪ Präzisionswaage <i>BP2100</i>	Sartorius
▪ Analysenwaage <i>MC1</i>	Sartorius
▪ Feinwaage <i>Harvard Trip Balance</i>	O`Haus
Wasserbad <i>T-M12</i>	Lauda
Zentrifugen	
▪ Kühlzentrifuge <i>5417R</i>	Eppendorf
▪ Tischzentrifuge <i>Biofuge pico</i>	Heraeus
▪ Tischzentrifuge <i>Megafuge 2.0</i>	Heraeus

3.1.2 Chemikalien

Dimethylsulfoxid (DMSO) [(CH ₃) ₂ SO]	Merck
5-FU (5-Fluorouracil) 50 mg/ml	Lederle
Hygromycin B	Roche Diagnostics
L-Glutamin 200 mM	Life Technologies
Natriumpyruvat 100 mM	Life Technologies
Penicillin/Streptavidin 1000 U/ml	Life Technologies
Phytohämagglutinin (PHA)	Difco
Proleukin rIL-2 18 x 10 ⁶ IE	Chiron
Roferon A 9 rIFN- α 2b 9 x 10 ⁶ IE	Hoffmann-LaRôche
Trypsin-EDTA Lösung 10x	Life Technologies

3.1.3 Kulturmedien, Puffer und sonstige Lösungen der Zellkultur

Alle Angaben mit FKS beziehen sich auf bei 56 °C 45 min hitzeinaktiviertes FKS.

Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 6,5 % CO₂ und 37 °C.

Alle Verbrauchsmaterialien und Kulturmedien, Puffer und Lösungen wurden autoklaviert bzw. sterilisiert.

Fetales Kälberserum (FKS)	Life Technologies
„Rosewell Park Memorial Institute“ (RPMI) 1640 mit L-Glutamin	Life Technologies

Auftaumedium:

- 50 % FKS
- 50 % RPMI III

Basismedium (RPMI III)

- RPMI 1640
- L-Glutamin 2 mM
- Natriumpyruvat 1mM
- Penicillin/Streptavidin 5000 U/ml

DMSO-Lösung

- RPMI III
- 20 % DMSO

Einfriermedium

- 50 % FKS
- 50 % DMSO-Lösung

IL-2-Lösung

- Proleukin[®] wird in RPMI resuspendiert (10⁶ U/ml)
- Verdünnung auf 10⁵ U/ml und 10⁴ U/ml Stocklösungen mit RPMI III

IFN- α -Lösung

- Roferon[®]-A wird in RPMI resuspendiert (10^6 U/ml)
- Verdünnung auf 10^5 U/ml und 10^4 U/ml Stocklösungen mit RPMI III

5-FU-Lösung

- 5-FU wird in RPMI resuspendiert (1 mg/ml)

Medium für die Generierung von Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK)

- 15 % FKS
- 85 % RPMI III
- bei Stimulation PHA 1 % (w/v)
- 1000 U rIL-2 /ml

Medium für K562

- RPMI III
- 10 % FKS

Medium für RCC-26, KT-N15, KT-53, KT-111

- RPMI III
- 10 % FKS

Medium für Transduktante NN-26

- RPMI III
- 10 % FKS
- 0,8 mg/ml Hygromycin B

PBS (phosphate buffered saline) Waschpuffer pH 7,4

- Aqua bidest
- 150 mM NaCl
- 3 mM KCl
- 8 mM Na₂HPO₄
- 2 mM KH₂PO₄

Trypanblaulösung (0,4 % (w/v)
in physiologischer NaCl-Lösung)

Sigma

Trypsin-EDTA-Lösung 2x

- 5 ml Trypsin-EDTA 10x
- 20 ml PBS

Die Berechnung der verwendeten Pharmakadosierungen erfolgte nach Berechnung des freien Körperwassers einer 170 cm großen und 70 kg schweren Normalperson (Münchener Formelsammlung der Medizin).

Gesamtkörperwasser bei einer Normalperson (männlich):

$$\text{GKW} = 2,447 - 0,09516 t_J + 0,1074 l_k + 0,3362 m_k$$

Gesamtkörperwasser bei einer Normalperson (weiblich):

$$\text{GKW} = - 2,097 + 0,1069 l_k + 0,2466 m_k$$

Normalperson männlich:

t_J : Alter in Jahren = 65 Jahre

l_k : Körperlänge in cm = 170 cm

m_k : Körpermasse in kg = 70 kg

GKW = 38 Liter

Normalperson weiblich:

l_k : Körperlänge in cm = 165 cm

m_k : Körpermasse in kg = 60 kg

GKW = 30 Liter

3.1.4 Zellen

Name	Zelltyp und Herkunft	Quelle
K562	präerythrozytäre Zelle	ATCC
KT-N15	Nierenzellkarzinom	DKFZ Heidelberg
KT-53	Nierenzellkarzinom	DKFZ Heidelberg
KT-111	Nierenzellkarzinom	DKFZ Heidelberg
LAK NP.1	PBL von Normalperson 1	Prof. Schendel
LAK NP.2	PBL von Normalperson 2	Prof. Schendel
NN-26	Transduktantenlinie von Normalniere Patient 26	Prof. Schendel
PBL NP.1	PBL von Normalperson 1	Prof. Schendel
PBL NP.2	PBL von Normalperson 2	Prof. Schendel
PBL NP.3	PBL von Normalperson 3	Prof. Schendel
RCC-26	Nierenzellkarzinom	Prof. Schendel

Die verwendeten Nierenzellkarzinomzelllinien sind HLA-A2A1 positiv, die Zelllinie K562 zeigen keine Expression eines HLA-Musters.

3.1.5 Verbrauchsmaterial für die *In vitro* - Langzeitkultur

- Kulturmedien und Chemikalien wie oben genannt
- Mikrotiterplatten 24 well Falcon

3.1.6 Verbrauchsmaterial für die Immunfluoreszenz

Antikörper	Isotyp	Konjugation	
- anti-CD3	IgG1 Maus	FITC	Beckman Coulter
- anti-CD3	IgG1	PE	Beckman Coulter
- anti-CD8	IgG1 Maus	PE	Beckman Coulter
- anti-CD3/CD4	IgG1 Maus	FITC/PE	Beckman Coulter
- anti-CD3/CD8	IgG1 Maus	FITC/PE	Beckman Coulter
- anti-CD3/CD25	IgG1 Maus	FITC/PE	Beckman Coulter
- anti-CD14	IgG1 Maus	FITC	Beckman Coulter
- anti-CD19	IgG1 Maus	FITC	Beckman Coulter
- anti-CD28	IgG1 Maus	FITC	Beckman Coulter
- anti-CD56	IgG1 Maus	PE	Beckman Coulter
- anti-CD69	IgG1 Maus	PE	Beckman Coulter
- anti-CD94	IgG1 Maus	PE	Beckman Coulter
- anti-CD122	IgG1 Maus	PE	Beckman Coulter
- anti-CD152	IgG1 Maus	PE	Beckman Coulter
- anti-CD158a	IgG1 Maus	PE	Beckman Coulter
- anti-CD158b	IgG2 Maus	PE	Beckman Coulter
- NKB1	IgG1 Maus	FITC	Beckman Coulter
- Isotypkontrollen	IgG1/IgG1	FITC/PE	Beckman Coulter
- Isotypkontrollen	IgG1/IgG2a	FITC/PE	Beckman Coulter
- W6/32	IgG2a		ATCC
	Überstand von Maus Hybridoma		
- 5.133	IgG2		von Marco Colonna, The Basel Institute for Immunology

3.1.7 Lösungen für die FACS-Analyse

FACS-Rinse (NaCl, Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ , KCl)	Becton Dickinson
FACS-Safe	Becton Dickinson

FACS-Flow (NaCl, Na ₂ EDTA, KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , KCl)	Becton Dickinson
PBS	Apotheke Klinikum Großhadern

3.1.8 Sonstiges Verbrauchsmaterial

Kryoröhrchen	Nunc
Ethanol	Apotheke Klinikum Großhadern
Ficoll-Paque	Pharmacia Biotech Uppsala, Schweden
Kulturflaschen	Falcon
Pasteurpipetten (kurz/lang)	Flint Glass
Pipettenspitzen	Greiner
Mikrotiterplatten 24 well	Falcon
Zentrifugenröhrchen (12 ml, 15 ml, 50 ml)	Greiner

3.1.9 Material für Zytotoxizitätsmessungen

3.1.9.1 Chemikalien

Europium Bis(Acetoxyethyl)2,2':6',2''-Terpyridin-6,6''-Dicarboxylat-Lösung	
Fluorescence-enhancing ligand	
Lysis buffer	
Triton-X 100	Sigma

3.1.9.2 Waschlösungen

- Waschmedium
- RPMI III
 - 10 % FKS

- Inkubationsmedien
- RPMI III
 - 10 % FKS

3.1.9.3 Sonstiges Verbrauchsmaterial

Einmalpipetten	Falcon
Gewebekulturplatten 96 U Boden	TPP
Mikropipettierhilfen	Brand / Uni Equia
Mikropipettierhilfen	Eppendorf reference
	Nichiryo
Pipettenspitzen	Greiner
Pipettenspitzen	Linbro
PS Abdeckplatte	Greiner
Mikrotiterplatten C96 Polysorb	Nunc

3.1.10 Kulturmedien und sonstige Lösungen für die Proliferationsmessungen (BrdU-Assay)

3.1.10.1 Kulturmedium

- RPMI III
- 10 % FKS

3.1.10.2 Chemikalien

BrdU labeling reagent

- 10 mM 5-bromo-2'-deoxyuridine in PBS, pH 7,4; 1000 x
- Verdünnung mit Kulturmedium 1:100

FixDenat-Lösung (nicht näher bezeichnet)

Anti-BrdU-POD

- monoklonaler Antikörper aus Maus-anti-Maus Hybridoma (Klon BMG 6H8, Fab-Fragmente) mit Peroxidase (POD) konjugiert, lyophilisiert, stabilisiert
- Verdünnung mit *Antibody dilution solution* 1:100 (= *Antibody working solution*)

Antibody dilution solution (nicht näher bezeichnet)

Washing buffer

- PBS 10 x
- Verdünnung mit Aqua bidest 1:10 (= *washing solution*)

Substrate solution

- Tetramethylbenzidin (TMB)

Stopplösung

- Salzsäure 1 M

3.2 HLA-Typisierung der Spender 1, 2 und 3

NP.1 HLA- A9, A24; B8, B35; Cw3, Cw04

NP.2 HLA- A1, A3; Bw8, Bw18; Cw7

NP.3 HLA- A2, A1

(NP = Normalperson)

3.3 Firmen- und Personenverzeichnis

Von folgenden Personen und Firmen wurden die oben genannten Materialien bezogen. In Klammern angegeben sind die deutschen Vertriebsstellen ausländischer Firmen.

Prof. Dr. D. J. Schendel	Institut für Immunologie, GSF	München
Aldrich		Steinheim
Becton Dickinson	Cockeysville Maryland USA	(Heidelberg)
Becton Dickinson	Oxnard California USA	(Heidelberg)
Bender & Hobein		München
BioRad Laboratories	California USA	(München)
Biozym		Hessisch
Oldendorf		

Roche Diagnostics GmbH, Roche Molecular Biochemicals			Mannheim
Brand			Wertheim
Beckman Coulter GmbH			
DAKO			Hamburg
Eppendorf			Hamburg
FMC Bioproducts	Rockland Maine	USA	(Neu-Ulm)
Greiner			Nürtingen
Heraeus			Hanau
Hirschmann			Eberstadt
Klinikum Großhadern			München
Lerdele			Wolfratshausen
Leica			Bensheim
Life Technologies	Gaithersburg Maryland	USA	(Eggenstein)
Merck			Darmstadt
Messer Griesheim			Düsseldorf
Nunc			Wiesbaden
Pharmacia LKB	Bromma	Schweden	(Freiburg)
Satorius			Göttingen
Schott			Mainz
Sigma	St. Louis Missouri	USA	(Deisenhofen)
Wallac	Turku	Finnland	(Freiburg)
Zeiss			München

3.4 Methoden

3.4.1 Methoden der Zellkultur

3.4.1.1 Auftauen von Zellen

Die Kryoröhrchen mit den Zellen werden aus dem Stickstofftank rasch in ein Wasserbad (37°C) überführt. Zur Beschleunigung des Auftauvorganges werden die Röhrchen ständig im Wasserbad geschüttelt, bis ein erbsengroßes Eisstück übrigbleibt. Diese Zellsuspension wird schnell in 2 ml vorgelegtes Auftaumedium überführt und das Röhrchen nochmals mit dem Medium ausgespült. Anschließend werden die aufgetauten Zellen bei 470 g für 4 Minuten zentrifugiert, das Pellet in Kulturmedium resuspendiert und erneut bei 470 g für 8 Minuten abzentrifugiert, erneut resuspendiert und schließlich gezählt.

3.4.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgt mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Diese ist aufgebaut aus fünf Großquadraten aufgebaut, wobei das zentrale durch 25, die anderen durch 16 Kleinquadrate unterteilt sind. Die Neubauer-Zählkammer hat eine definierte Fläche von 1 mm² und eine tiefe von 0,1 mm. Die zu untersuchende Zellsuspension wird im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt. Trypanblau färbt abgestorbene Zellen blau an (Trypanblau passiert die defekte Zellmembran), wogegen vitale Zellen ungefärbt erscheinen.

Das Gemisch wird mit Hilfe von Kapillarkräften in den Zwischenraum zwischen Deckglas und Neubauer-Zählkammer eingesogen, so dass ein Gesamtvolumen von 1 µl entsteht. Die in einem Großquadrat gezählten lebenden Zellen werden mit 1×10^4 und dem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert, woraus sich die Zellzahl pro ml der Suspension ergibt.

3.4.1.3 Einfrieren von Zellen

Die Konzentration der einzufrierenden Zellsuspension wird auf eine Größenordnung von etwa $2 - 10 \times 10^6$ Zellen/ml je Kryoröhrchen eingestellt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt bei 470 g für 8 Minuten wird der Überstand verworfen, das Zellpellet in 0,5 ml FKS pro Röhrchen resuspendiert und auf die vorgekühlten Einfrierampullen verteilt. Zu jeder Ampulle werden langsam 0,5 ml 20 % DMSO-Lösung zugefügt, wodurch die Kristallbildung des H₂O in den Zellen verhindert wird. Das Arbeiten sollte möglichst schnell und auf Eis erfolgen. Die Kryoröhrchen werden über Nacht bei -80 °C eingefroren und ab dem folgenden Tag zur langfristigen Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert.

3.4.1.4 Isolierung von peripheren Blutlymphozyten

Frisch entnommenes heparinisiertes Vollblut wird 1:2 mit PBS verdünnt, vorsichtig auf 15 ml Ficoll in 50 ml Zentrifugenröhrchen geschichtet und für 25 Minuten bei 840 g ohne Bremse zentrifugiert. Mit Hilfe des *Ficoll*-Dichtegradienten (Dichte: 1,077 g/ml) verteilen sich die Blutzellen ihrer Dichte nach im Zentrifugenröhrchen. Dabei sinken die Erythrozyten als Pellet zu Boden, die weniger dichten Lymphozyten und Monozyten verbleiben in der Interphase zwischen Ficoll und Blutplasma. Die von dort entnommenen PBMC werden einem ersten Waschschrift mit RPMI zugeführt (12 Minuten, 760 g mit Bremse), der Überstand danach verworfen, das Pellet in RPMI resuspendiert, die Zellen gezählt und erneut für 8 Minuten bei 470 g abzentrifugiert, um schließlich nach Bedarf eingefroren oder in Kultur genommen zu werden. Die gewonnene Zellzahl beträgt in der Regel $0,8 - 1,5 \times 10^6$ Zellen pro ml Vollblut.

3.4.1.5 Kultivierung und Passagierung adhärent wachsender Tumorzellen

Adhärent wachsende Zellen, wie z.B. RCC-Zelllinien, werden durch Trypsin-EDTA-Lösung vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Das verbrauchte Kulturmedium wird abgesaugt und die Zellschicht mit gleichem Volumen PBS gewaschen, um verbliebene Serumproteine zu eliminieren, die das Trypsin (Spaltung der Adhäsionsproteine) und das EDTA (Komplexierung der von diesen Proteinen benötigten Calcium- und Magnesiumionen) in ihrer Aktivität mindern können. Für

eine 75 cm² Kulturflasche werden beispielsweise 0,7 ml Trypsin-EDTA eingesetzt und durch Schwenken der Flasche so verteilt, dass die Zellschicht auf dem Boden der Flasche vollständig damit benetzt wird. Adhärent wachsende Zellen runden sich beim Ablösen vom Boden ab, was unter dem Mikroskop überprüft werden kann. Unterstützt werden kann das Ablösen durch leichtes Beklopfen der Kulturflasche. Wenn sich alle Zellen abgelöst haben, werden sie in 10 ml Kulturmedium aufgenommen, zu gleichen Volumina auf zwei Kulturflaschen verteilt und mit Medium supplementiert. Mit diesem Vorgang erhöht sich die Passage für die Kultivierung dieser Zellen um 1 Schritt.

Die Tumorzellen werden wie auch alle anderen verwendeten Zellen bei 6,5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit bei 37 °C im Inkubator kultiviert.

3.4.1.6 Langzeit-Stimulationsversuch

Die PBL (1×10^6 /ml) werden in Parallelansätzen kultiviert und einmal wöchentlich mit 1×10^5 bestrahlten (100 Gray) Nierentumorzellen (RCC-26, KT-111 und KT-53) restimuliert. Die Gabe der verwendeten Pharmaka erfolgt sequentiell nach dem Immun-Chemotherapieschema nach Atzpodien et al. in entsprechenden Dosierungen über einen Zeitraum von insgesamt 2 Monaten. Für Interleukin-2: 200 und 1000 U/ml; für Interferon-alpha: 200 und 400 U/ml; für 5-Fluorouracil: 35 µg/ml. Gleichzeitig mit der Gabe der Pharmaka werden 500 µl des Mediums der 24-well Kulturplatten entnommen und durch frisches RPMI III ersetzt. Vor jeder Restimulation wird zur Bestimmung des Proliferationsindex die Zellzahl der kultivierten PBL in der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Aus den Parallelansätzen werden die stimulierten PBL nach 15 und nach 28 Tagen geerntet und im Zytotoxizitäts-Assay getestet. Ansätze ohne Pharmaka und ohne Restimulation, nur mit Pharmaka und nur mit Restimulation bilden die Kontrollgruppen.

3.4.1.7 BrdU-Proliferations-Assay (5-bromo-2'-desoxyuridin)

Über einen Zeitraum von 4 Tagen werden PBL (5000 Zellen pro well) gesunder Spender in 96-well Platten in einem Gesamtvolumen von 200 µl je well in unterschiedlichen Ansätzen (Pharmakadosierungen und –kombinationen) in Gegenwart verschiedener Nierentumorzelllinien kultiviert. Für Interleukin-2 und Interferon-alpha: 50, 100, 200, 500 und 1000 U/ml. Für 5-Fluorouracil: 0,002 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,2 µg/ml, 2 µg/ml und 20 µg/ml. Am Tag 4 erfolgt die Zugabe von 20 µl BrdU zu den kultivierten Zellen, das anstelle des Thymidins in die DNA der proliferierenden Zellen eingebaut wird. Am Tag 5 wird das Kulturmedium entfernt und die zu untersuchenden Platten werden mit einem Fön 15 Minuten lang getrocknet. Die Ansätze werden durch Zugabe von *FixDenat* in einem Zeitraum von 30 Minuten fixiert und ihre DNA denaturiert. Die Denaturierung der DNA verbessert die Erreichbarkeit und Bindung des eingebauten BrdU durch Antikörper. Nach Entfernung des Überstandes wird pro well 100 µl der *Anti-BrdU-POD working solution* dazugegeben. Diese Antikörper binden an das BrdU, das in die neu synthetisierte, zelluläre DNA aufgenommen wurde. Nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten bei Raumtemperatur erfolgen drei Waschschriffe mit PBS. Anschließend wird in jedes well 100 µl der *substrate solution* gegeben und die Ansätze werden erneut bei Raumtemperatur für maximal 30 Minuten inkubiert. Die induzierte Substratreaktion führt zur Ausbildung einer Farbreaktion, die mit Hilfe von 25 µl 1 M HCl gestoppt werden kann. Die Absorption dieser Versuchsansätze wird mit Hilfe eines *ELISA readers* bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) gemessen.

Die Proliferationsmessung von Lymphozyten

Der nicht-radioaktive 5-Brom-2-desoxyuridin-Proliferations-Assay zeigt eine vergleichbare Sensitivität und Spezifität wie der radioaktive H³-Thymidin-Proliferations-Assay.

Sensitivität: Üblicherweise sind 0,1 – 1,0 x 10⁴ Zellen pro well für die meisten experimentellen Ansätze ausreichend abhängig vom jeweiligen Zelltyp der etablierten Zelllinien und von der Inkubationszeit. Wenn mit primären Lymphozytenkulturen gearbeitet wird, sind etwa 1 – 40 x 10⁴ Zellen pro well notwendig.

Spezifität: Die Antikörperverbindung reagiert mit dem Thymidinanalogon 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) und mit dem BrdU, das in die zelluläre DNA eingebaut worden ist. Der Antikörper zeigt keine Kreuzreaktion mit einer endogenen zellulären Bestandteil, wie z.B. Thymidin, Uridin oder DNA.

3.4.1.8 Generierung von Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK)

Für eine Erststimulierung werden PBL mit RPMI-Medium und 15 % FKS sowie 1 % PHA als unspezifisches Mitogen und 1000 U/ml IL-2 auf 1×10^6 Zellen pro ml verdünnt in Kultur genommen. Die Zellansätze bleiben mindestens drei Tage unberührt und können dann nach Bedarf eingefroren oder eingesetzt werden. Zur weiteren Expansion werden die Zellen in 24-well Platten in ca. $0,5 \times 10^6$ Zellen / 1,5 ml ausgesät und ohne PHA weiterkultiviert. Die hohe Konzentration des Interleukin-2 bewirkt eine Aktivierung von Lymphozyten (T- und NK-Zellen), die keine MHC-Restriktion aufweisen und wenig zellspezifisch als Effektorzellen in der Zytotoxizitätsmessung einsetzbar sind.

3.4.2 Messung der zellvermittelten Lyse (CML)

Europium-TDA (6',2''-Terpyridin-6,6''-Dicarboxylat) Freisetzung
Der Lanthanidfreisetzungstest [Blomberg, 1996]

3.4.2.1 Markierung der Zellen

Die Konzentration der zu markierenden Zielzellen wird auf 1×10^6 Zellen /ml eingestellt. Prinzipiell gilt es zu beachten: Je höher die Inkubationstemperatur (max. 37°C), desto kürzer ist die Inkubationsdauer (5 – 30 min). Es werden 5 µl des *fluorescence enhancing ligand* (BATDA = Bis(Acetoxymethyl)2,2':6',2''-Terpyridin-6,6''-Dicarboxylat) zu 2 – 4 ml der Zellsuspension dazugegeben, die während der Inkubation (10 min bei 37 °C) alle 2 – 3 min durch Kippen und Schwenken der Röhrchen neu vermischt wird. Dieser Ligand ist eine Acetyl-Ester-Verbindung, die passiv durch die Zellmembran in das Zellinnere gelangt. Dort werden ihr von unspezifischen Acetyl-Esterasen die Acetylreste abgespalten. Das daraus hervorgehende TDA (6',2''-Terpyridin-6,6''-Dicarboxylat) ist nun nicht mehr fähig, die

Zellmembran von lebenden Zellen zu passieren. Nach der Inkubation wird die Zellsuspension für 8 min bei 470 g abzentrifugiert, das Pellet in Kulturmedium resuspendiert, in fünf weiteren Waschschrritten (5 min bei 500 g) gereinigt und schließlich auf eine Konzentration von etwa 50000 Zellen /ml eingestellt.

3.4.2.2 Titration der Effektorzellen

In einer 96-well Rundboden-Mikrotiterplatte werden 100 µl Medium in jedes well vorgelegt. In den ersten fünf Reihen werden darin die Effektorzellen titriert, die übrigen Reihen sind Ansätze für die Spontanfreisetzung, die Maximalfreisetzung und den Background (Hintergrundfluoreszenz). Die Titration der Effektorzellen erfolgt nach folgendem Schema:

Es werden in die wells der ersten Reihe 100 µl der Effektorzellsuspension pipettiert und durch auf- und abpipettieren gut durchmischt. Danach werden aus den nun 1 : 1 Verdünnungen wieder 100 µl entnommen und in die nächste Reihe pipettiert usw., so dass am Ende eine Verdünnungsreihe erstellt wurde. Aus dem fünften well werden die letzten 100 µl Zellsuspension verworfen (siehe Abbildung).

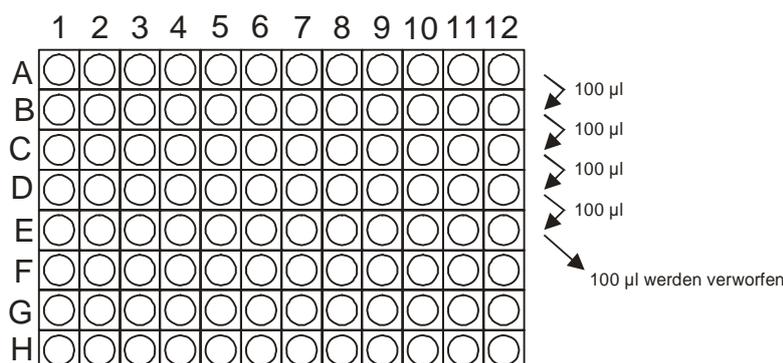


Abbildung 3: Schema der Titration der Effektorzellen in einer 96-well Mikrotiterplatte

Während der Markierung der Zielzellen wird die Platte mit den Effektorzellen im Kulturschrank bei 37 °C und 6,5% CO₂ gelagert.

3.4.2.3 Inkubationsansatz zur Lanthanid-Freisetzung

Zu den vorgelegten Effektorzellen werden schließlich 100 µl der markierten Zielzellsuspension pipettiert. Als Kontrollgruppen dienen 100 µl Inkubationsmedium (Negativkontrolle) und 100 µl *lysis buffer* bzw. Triton-X Lösung als Kontrolle für die maximale Freisetzung. Nach der Verteilung der Zielzellen werden die restlichen Zellen nochmals bei 470 g für 4 Minuten abzentrifugiert. Einhundert Mikroliter des zellfreien Überstandes werden jeweils zu den Ansätzen der Hintergrundfluoreszenzbestimmung pipettiert.

Die Mikrotiterplatten werden in einer feuchten Kammer für mindestens 2 Stunden bei 37 °C und 6,5 % CO₂ inkubiert.

3.4.2.4 Messung der Lanthanid-Freisetzung

Entsprechend der MHC-abhängigen oder MHC-unabhängigen lytischen Reaktion befindet sich im Überstand der freigesetzte *fluorescence enhancing ligand* (TDA-Ligand). Nach Inkubation werden die Platten bei 300 g für 5 min abzentrifugiert. Vom Überstand werden 20 µl entnommen und in speziell dafür vorgesehene Flachboden-Mikrotiter-Meßplatten überführt. Abschließend werden jeweils 150 µl *Europium solution* zupipettiert und für 15 min auf einem Horizontalschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgt in einem Fluorometer (Victor 1420) der Firma Wallac.

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte aus den Mittelwerten der Triplikate nach folgenden Formeln:

$$\% \text{ Spontanfreisetzung} = \frac{\text{spontane Freisetzung (SR) in cps} - \text{Freisetzung des Hintergrundes (BGR) in cps}}{\text{maximale Freisetzung (MR) in cps} - \text{Freisetzung des Hintergrundes (BGR) in cps}} \times 100$$

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{cps der Lyse-Reaktion} - \text{spontane Freisetzung (SR) in cps}}{\text{maximale Freisetzung (MR) in cps} - \text{spontane Freisetzung (SR) in cps}} \times 100$$

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Standardabweichung (BGR)} \times 2}{\text{Mittelwert (MR)} - \text{Mittelwert (BGR)}} \times \text{Zielzellzahl}$$

3.4.3 Analyse von Oberflächenmolekülen mittels direkter und indirekter Immunfluoreszenz

Für die FACS (fluorescence activated cell sorter) Analyse stehen zwei grundsätzliche Vorgehensweisen zur Verfügung: Zum einen, die Oberflächenmarkeranalyse mit bereits markierten Fluoreszenz-Antikörpern (direkte Immunfluoreszenz) und zum anderen, der Einsatz von unkonjugierten Primärantikörpern (indirekte Immunfluoreszenz).

3.4.3.1. Direkte Immunfluoreszenz

Für jede Antikörperkombination werden etwa 2×10^5 Zellen eingesetzt. Für jede untersuchte Zelllinie wird eine Isotypkontrolle angesetzt, um die Autofluoreszenz der Zellen abgleichen zu können. In jedes well einer 96-well-Rundboden-Mikrotiterplatte werden 3 µl Antikörper vorgelegt und mit 100 µl Zellsuspension in PBS pro Ansatz 30 bis 45 Minuten bei Dunkelheit und 4 °C inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit 150 µl PBS werden die Ansätze mit 200 µl 1% PFA fixiert. Die Messung erfolgt im *FACSCalibur* der Firma Becton Dickinson.

3.4.3.2 Indirekte Fluoreszenz

Pro Ansatz werden 30 µl des Primärantikörpers vorgelegt und 2×10^5 Zellen in 100 µl dazu gegeben und für 45 bis 60 Minuten bei 4°C und bei Dunkelheit inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit 150 µl PBS werden die Ansätze mit 50 µl FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) oder PE (Phycoerythrin) konjugiertem Antikörper im Verhältnis 1:50 versetzt und für weitere 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Das weitere Vorgehen entspricht dem oben beschriebenen Vorgehen bis zur Fixierung in 1 % PFA.

4. Ergebnisse

4.1 Langzeitstimulation von PBL in Koinkubation mit Nierentumorzellen und Zytokinen: Die Gabe von 5-FU führt zum Zelltod stimulierter PBL

Am Tag 0 wurden für jeden Ansatz 1×10^6 Zellen / well eingesetzt. PBL in Kokultur mit der RCC-26-Tumorzelllinie und Zytokinen zeigten während der ersten 27 Tage einen kontinuierlichen Anstieg der Zellzahl unter Interferon-alpha und Interleukin-2. Mit der Gabe des Zytostatikums 5-Fluorouracil am Tag 28 jedoch sank die Zellzahl drastisch ab. Am Tag 43 waren keine vitalen Zellen mehr nachweisbar.

Die Zellzahl der Kontrollgruppe PBL + RCC-26 zeigte einen Abfall bis etwa zwei Wochen nach Versuchsbeginn. Im weiteren Verlauf variierte die Zellzahl in einem unspezifischen Niveau und blieb anschließend konstant bei etwa 1×10^6 Zellen je well.

Die Zellzahl der beiden übrigen Kontrollgruppen (PBL + Schema und PBL allein) lagen in einem Bereich um 1×10^6 Zellen/well. Schließlich waren auch hier ab Tag 43 keine vitalen Zellen mehr nachweisbar (Abbildung 4).

Die Ergebnisse der Langzeitstimulationstests wurden mehrfach reproduziert. Es zeigte sich jeweils ein Anstieg der Lymphozytenzahl mit Gabe von IL-2 und IFN- α unter wöchentlicher Restimulation mit verschiedenen bestrahlten allogenen Nierentumorzelllinien (RCC-26, KT-53 und KT-111). Mit der Gabe von 5-FU und dem Absetzen des Interleukin-2 sank die Zahl der Lymphozyten drastisch ab. Bereits nach wenigen Tagen waren keine vitalen Lymphozyten mehr in den Kulturplatten nachweisbar. In den Kontrollgruppen fand keine signifikante Proliferation der eingesetzten Lymphozyten statt.

In Kapitel 4.2 wird die Bedeutung der Wirkung von IL-2 auf die Proliferation von Lymphozyten verdeutlicht.

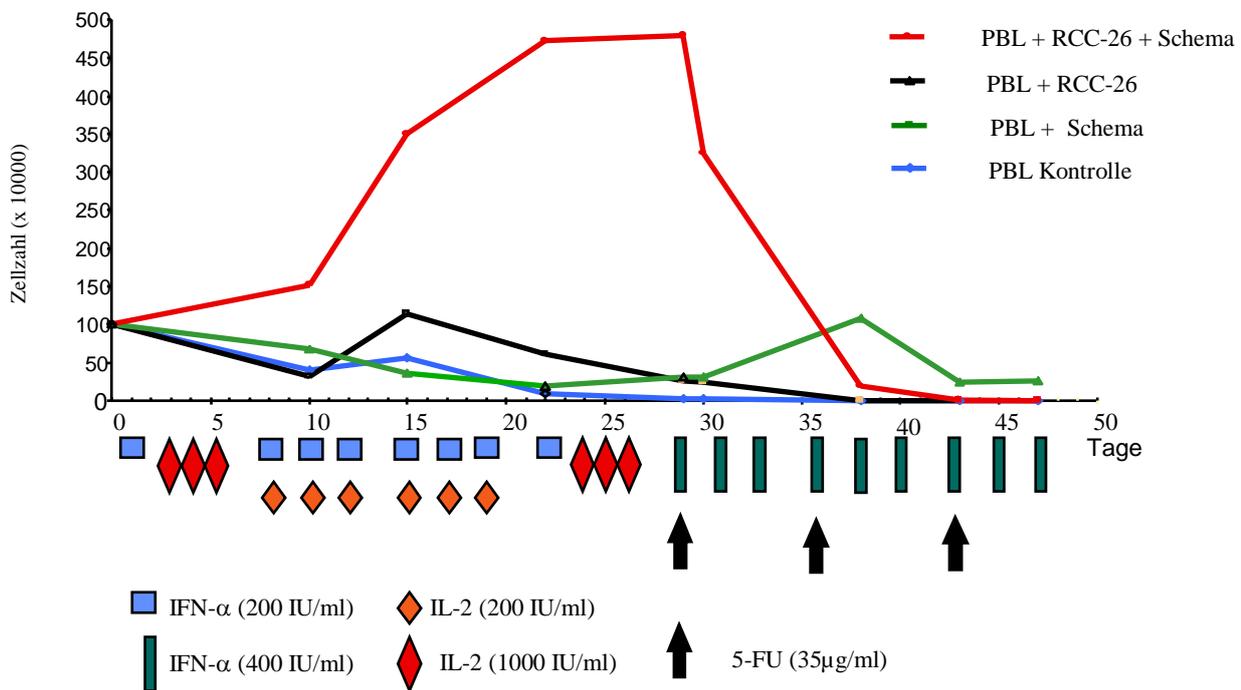


Abbildung 4: Langzeitkultur mit PBMC eines gesunden Spenders. Einmal wöchentlich wurden bestrahlte RCC-26 Zellen in die Kultur gegeben. Die Applikation der einzelnen Substanzen der Immunchemotherapie erfolgte nach entsprechender Umrechnung in die Konzentration im freien Körperwasser (s.o.). Die rote Linie zeigt den Verlauf der Zellzahl der PBMC eines gesunden Spenders unter Koinkubation mit RCC-26 Zellen und der Pharmaka der Immunchemotherapie. Dieser Versuch wurde dreimal wiederholt und war reproduzierbar. Als Zielzellen wurden neben RCC-26 auch die Zelllinien KT-111 und KT-53 eingesetzt.

4.2 Proliferations-Assays von PBL in Kokultur mit Nierentumorzellen und Zytokinen: 5-FU inhibiert die Proliferation von stimulierten PBL

Die Analysen zur Proliferation von allogenen PBL gesunder Spender unter Stimulierung mit RCC und unter der Applikation der Pharmaka der Immunchemotherapie nach Atzpodien et al. zeigten folgende Ergebnisse: In den Abbildungen 5, 6 und 7 sind repräsentative Ergebnisse von unterschiedlichen NZK-Zelllinien (KT-53, RCC-26, KT-111 und KT-N15) dargestellt. Es zeigten sich keine bzw. nur geringe Unterschiede zwischen den Zelllinien. Während die Gabe von IFN- α allein nur geringe Effekte auf die Lymphozyten-Proliferation hatte, führte die Inkubation der Zellen mit IL-2 zu einer Verdopplung der Zellproliferation. In der kombinierten Gabe von IL-2 und IFN- α ergab sich keine Verbesserung im Vergleich zu IL-2 alleine. Minimale Dosen 5-FU (0.2 $\mu\text{g/ml}$) inhibierten die Lymphozyten-Proliferation vollständig. IL-2 oder IFN-alpha oder ihre Kombination konnte die 5-FU-Gabe nicht revertieren. Diese Daten konnten mit PBMC eines weiteren gesunden Spenders reproduziert werden.

In dieser Versuchsreihe konnte jeweils reproduzierbar gezeigt werden, dass die Gabe von 5-FU auch in 10- bis 100-facher Verdünnung die Proliferation der mit unterschiedlichen bestrahlten allogenen Nierentumorzelllinien koinkubierten Lymphozyten im Vergleich zu den Kontrollgruppen deutlich hemmte. Die stärkste antiproliferative Wirkung wurde mit der höchsten getesteten Konzentration von 5-FU erreicht (10 $\mu\text{g/ml}$). Diese Konzentration liegt immer noch unter der nach intravenöser Gabe auftretenden Konzentration im errechneten freien Körperwasser (35 $\mu\text{g/ml}$).

Abbildungen 5-7: BrdU-Proliferations-Assay mit PBMC eines gesunden Spenders (siehe obigen Text), Tc=T-Zellen. Dosierungen: IL-2: 200 IU/ml, IFN- α : 200 IU/ml, 5-FU: 0,2 μ g/ml.

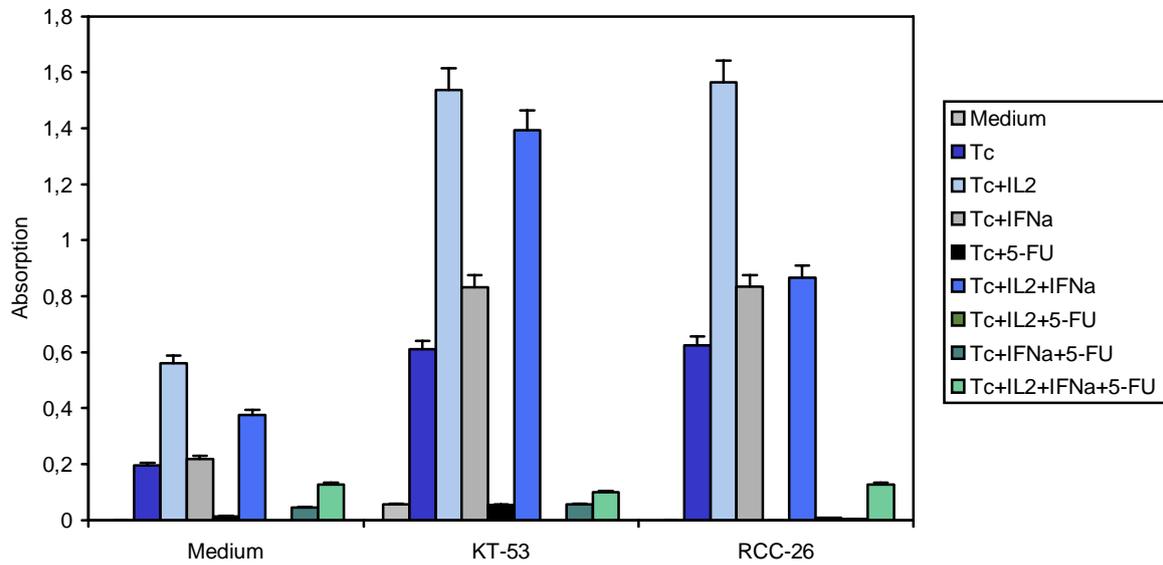


Abbildung 5

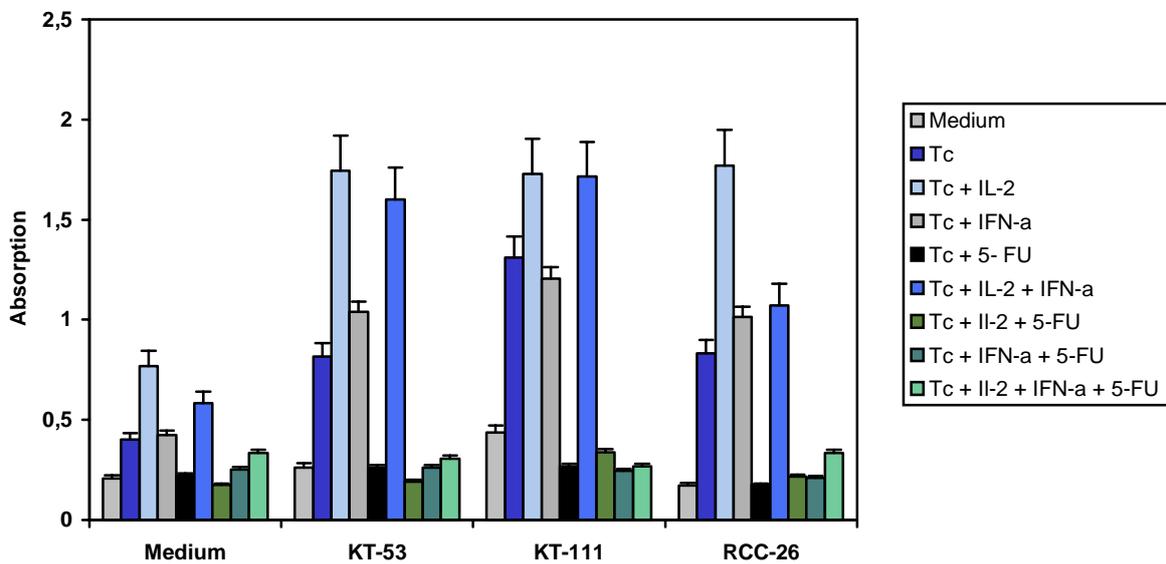


Abbildung 6

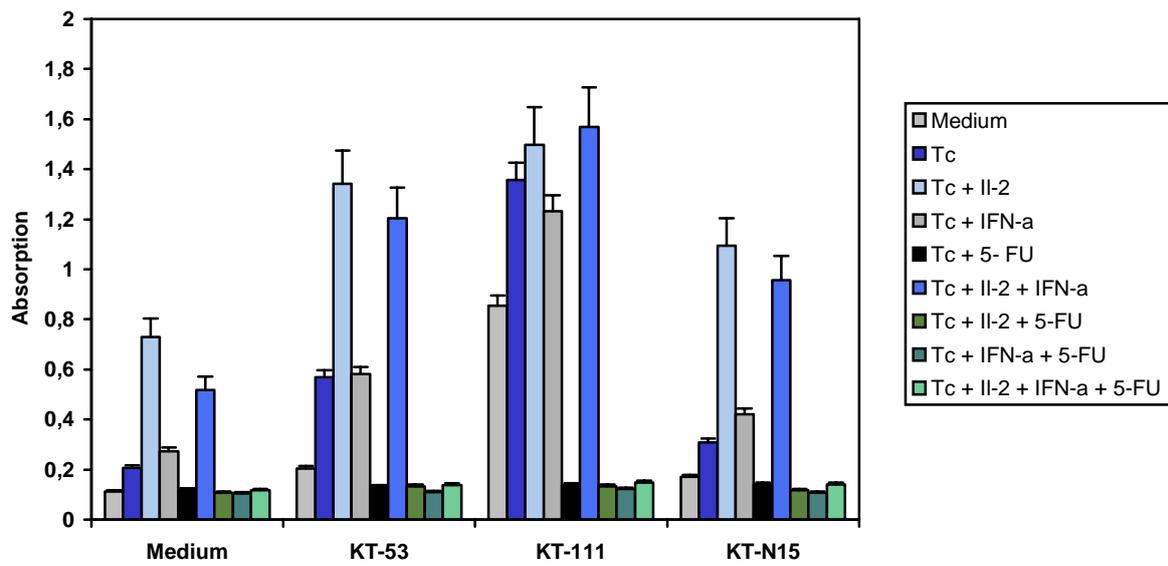


Abbildung 7

4.3 Die Zytotoxizität von Lymphozyten nach Gabe der Zytokine zeigen eine stärkere lytische Aktivität als unstimulierte PBL

4.3.1 In vitro Stimulation von PBMC gesunder Spender

PBMC eines gesunden Spenders (NP.1) wurden nach 27 Tagen Langzeit-Stimulation mit IL-2, IFN- α und RCC-26 der Kultur entnommen und auf ihre zytolytische Aktivität untersucht. Hierbei zeigten die aktivierten Lymphozyten eine sehr hohe Lyse von RCC-26 Zellen mit 90% bei einer Effektorzell : Tumorzell Ratio (E:T) von 2.5:1. Die Lyse einer weiteren NZK-Linie (KT-53) und von K562, einer MHC-Klasse-I-negativen Erythroleukämiezelllinie, mit 20% bzw. 25% wesentlich geringer ausfiel bei identischer E:T Ratio (Abb. 8). Dieser Unterschied deutet daraufhin, dass sich in den PBMC eine nur gegen RCC-26 gerichtete Aktivität entwickelt hat. Bei höherer E:T wurden KT-53 und K562 Zellen ebenso stark lysiert, was für die zusätzliche Anwesenheit von NK-Zellen spricht.

In einer weiteren Untersuchung zeigte sich, dass mit IL-2, IFN- α und bestrahlten RCC-26 stimulierte PBMC eine höhere lytische Aktivität gegen RCC-26 entwickelten als unstimulierte PBMC (Abb. 9). Ein vergleichbares Ergebnis zeigte sich, wenn anstelle von RCC-26 die Zelllinie KT.N15 verwendet wurde (Abb. 10).

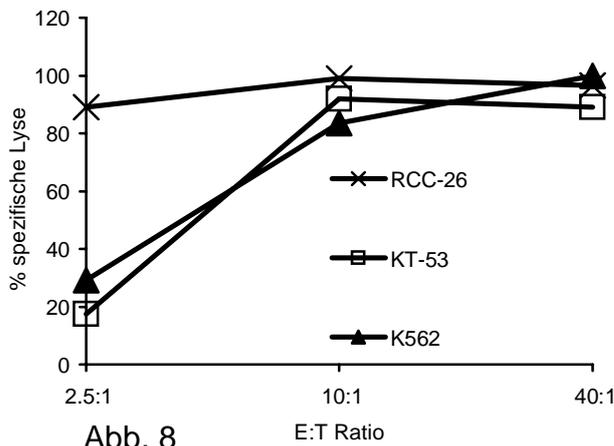


Abb. 8

Abb. 8: Lytische Aktivität von PBMC eines gesunden Spenders nach 28 Tagen Kultur mit RCC-26 und Zugabe von IL-2 und IFN-alpha nach dem Hannover Protokoll. Als Zielzellen wurden verschiedene Nierentumorzelllinien eingesetzt. Die stärkste Lyse zeigte sich gegen RCC-26.

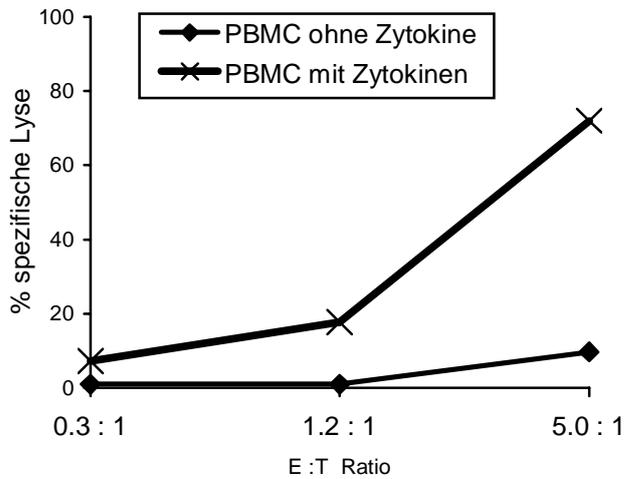


Abb. 9

Abb. 9 und 10: Lytische Aktivität gegen RCC-26 von PBL eines gesunden Spenders nach 28-tägiger Kokultur mit RCC-26 (Abb. 9) bzw. KT-53 (Abb. 10) ohne und mit Zytokingabe nach dem Hannover-Protokoll

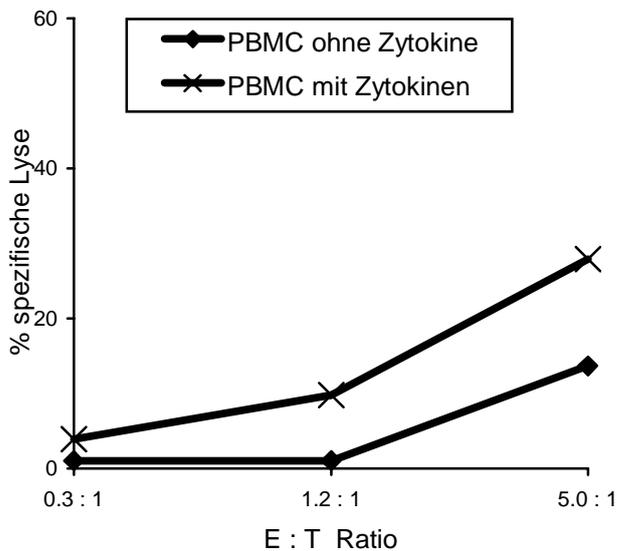


Abb. 10

4.3.2 Zytotoxizität der PBMC von Patienten im Verlauf der Immunchemotherapie

Tabelle 1 zeigt eine Zusammenstellung der NK-Zell vermittelten Zytotoxizität von PBMC von fünf Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom, die mit der Immunchemotherapie nach dem Hannover-Protokoll therapiert wurden. Die Blutentnahmen erfolgten vor (Tag 0), während (Tag 14 und 28) und nach (Tag 56) der Therapie.

Tabelle 1: Zytotoxizität der NK-Zellen vor (Tag 0), während (Tag 14 und 28) und nach (Tag 56) der Immunchemotherapie bei fünf untersuchten Patienten

Patient #	Tag	2.5 : 1	5 : 1	10 : 1	20 : 1	40 : 1
1	0	2.9	0	8.3	1.1	0
	14	22.0	33.6	49.4	62.2	83.6
	28	31.1	30.8	42.6	57.9	66.0
	56	6.9	1.8	16.4	14.0	49.1
2	0	6.6	13.3	26.2	38.7	58.4
	14	10.8	16.5	24.5	37.1	63.8
	28	0	0	6.7	11.8	25.9
	56	1.1	0	0	1.1	1.1
3	0	14.0	14.2	18.5	26.5	28.5
	14	0	0	13.8	34.4	39.3
	28	2.4	0	7.8	20.5	24.8
	56	1.9	5.2	13.0	19.5	24.3
4	0	0.1	1.0	6.0	11.0	15.0
	14	8.2	12.6	8.4	40.1	46.8
	28	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	56	2.5	5.5	10.9	15.8	22.5
5	0	0.7	16.2	20.5	32.7	35.7
	14	15.0	51.7	69.6	83.8	95.0
	28	20.4	25.6	47.3	55.7	56.1
	56	3.3	7.4	22.0	37.8	53.1

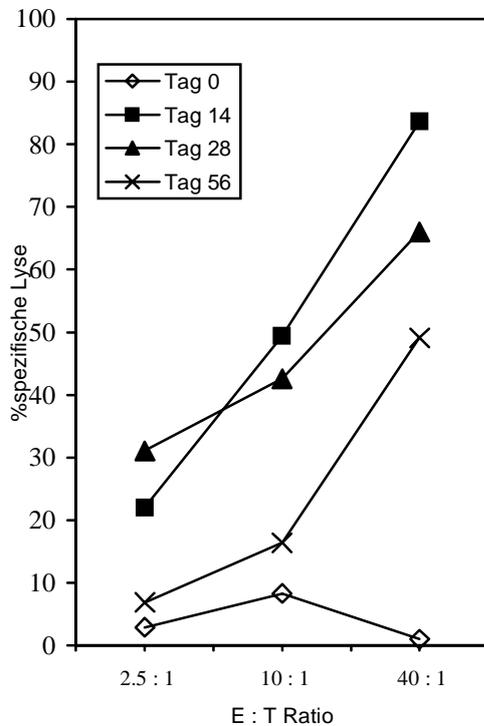


Abb. 11

Abbildung 11:

Zytotoxische Aktivität von NK-Zellen von Patient 1 vor (Tag 0), während (Tag 14 und 28) und nach (Tag 56) der Immunchemotherapie nach dem Hannover-Protokoll.

Abbildung 11 zeigt exemplarisch für Patient 1 die lytische Aktivität im Verlauf der Immunchemotherapie. Die lytische Aktivität steigt von ausgehend nahezu nicht nachweisbar am Tag 0 nach Gabe der Zytokine IL-2 und IFN- α auf eine Maximum am Tag 14 und Tag 28 an. Nach Gabe von 5-FU ab Tag 29 fällt die lytische Aktivität wieder ab. Vier weitere Patienten hatten bereits vor Zytokingabe relativ hohe lytische Aktivität. Diese war nach 14 Tagen Zytokintherapie noch gesteigert. Dieses Niveau war zu Therapieende wieder im Bereich des Ausgangsniveaus oder niedriger.

4.4 Durchflusszytometrie (FACS-Analysen) von PBL behandelter Patienten: Die Gabe von 5-FU verringert die Aktivität von Natürlichen Killerzellen im Rahmen der Immunchemotherapie

Die Analysen von peripherem Blut mit Hilfe der Differentialblutuntersuchungen von fünf untersuchten Patienten vor, während und nach der Therapie zeigten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Leukozytenzahl. Die PBMC Subpopulationen und ihr Aktivitätsstatus wurden mit Hilfe der Immunfluoreszenz unter Verwendung entsprechender Antikörper analysiert. Während die Analysen der Aktivitätsmarker CD25⁺, CD69⁺, CD122⁺, CD152⁺ in den Populationen keine signifikanten Unterschiede während der Therapie aufwiesen, zeigte die Anzahl der CD56⁺ Zellen folgende Veränderungen im Verlauf der Therapie: Bei drei Patienten nahmen die CD3⁺CD56⁺ Lymphozyten (z.B. NK-Zellen) während der Immuntherapie mit der Zytokingabe (IL-2, IFN- α) bis Tag 28 zu (repräsentatives Beispiel Patient 2 in Abb. 12) . Nach Gabe von 5-FU bis Tag 56 war die Zellzahl von CD3⁺CD56⁺ Zellen drastisch reduziert (Abb. 12). Ähnliche Ergebnisse wurden bei zwei weiteren Patienten erzielt (Tab. 2).

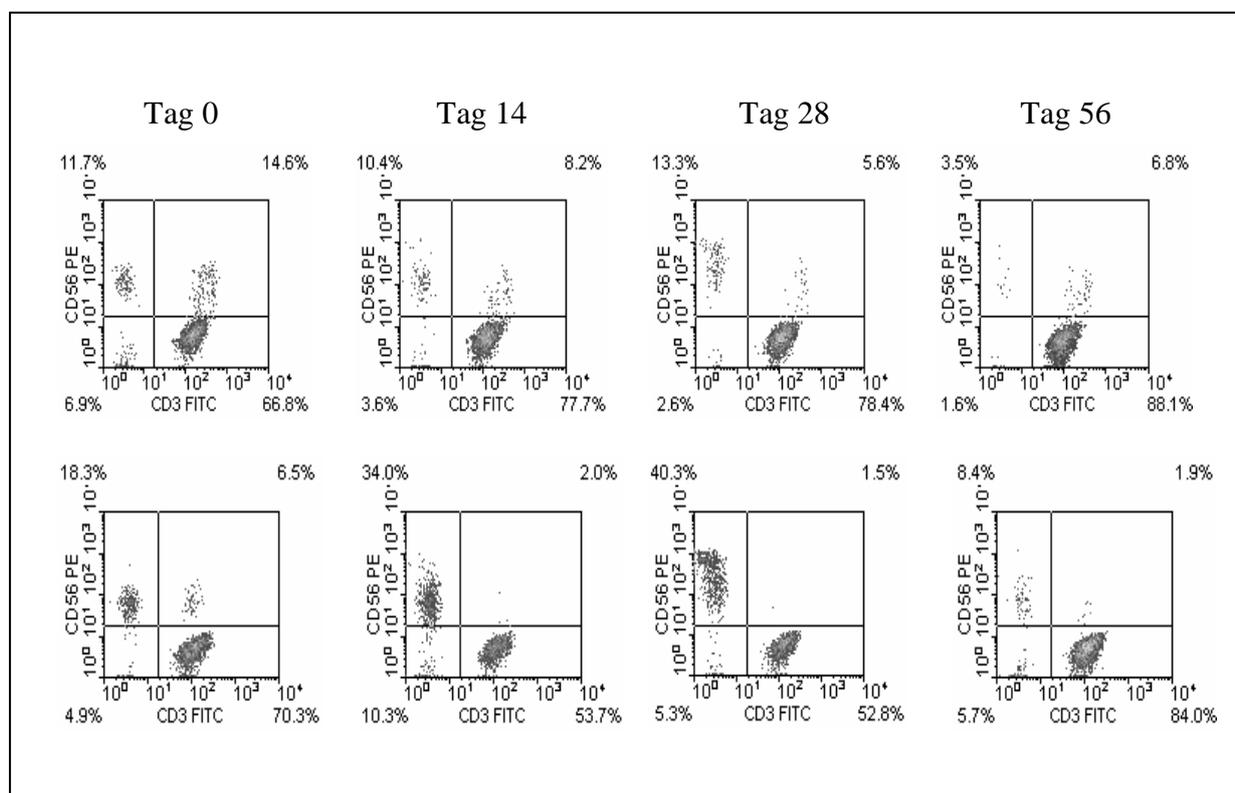


Abbildung 12: Der Anteil der NK-Zellen am Beispiel von Patient 1 (oben) und 2 (unten) vor, während und nach der Immunchemotherapie nach dem Hannover-Protokoll.

Patient No.	Tag 0 (%)	Tag 14 (%)	Tag 28 (%)	Tag 56 (%)
1	11.7	10.4	13.3	3.5
2	18.3	34.0	40.3	8.4
3	16.6	32.3	n.d.	9.0
4	10.0	34.4	n.d.	7.6
5	11.6	10.8	13.0	3.9

Tabelle 2: Anteil der CD3- CD56+ Lymphozyten der Patienten mit metastasiertem NZK, die mit der Immunchemotherapie nach dem Hannover-Protokoll behandelt wurden im FACS, n.d. = nicht durchgeführt

4.5 Umkehrung der sequentiellen Gabe der einzelnen Pharmaka: Chemoimmuntherapie („Münchener Protokoll“)

Zytotoxizitätsmessungen und FACS-Analysen wurden bei 6 weiteren Patienten mit metastasiertem NZK durchgeführt, bei denen wir die Reihenfolge der Applikation der einzelnen Pharmaka umkehrten. In den ersten vier Wochen erfolgte die Gabe von 5-FU mit IFN-alpha, in den letzten vier Wochen die von IL-2 und IFN-alpha. Die FACS-Analysen zeigten in den ersten vier Wochen insgesamt keine signifikante Veränderung der NK-Zellpopulation. In der zweiten Hälfte des Therapiezyklus mit der alleinigen Gabe der Zytokine IL-2 und IFN- α stieg der Anteil der CD56⁺-Zellen an (Abb. 13). Die Daten hieraus bestätigten zumindest auf der Basis von *ex vivo* – Untersuchungen, dass mit der Gabe der Zytokine am Ende der Chemoimmuntherapie nach dem „Münchener Protokoll“ die NK-Zellpopulation am Ende der Therapie erhöht ist.

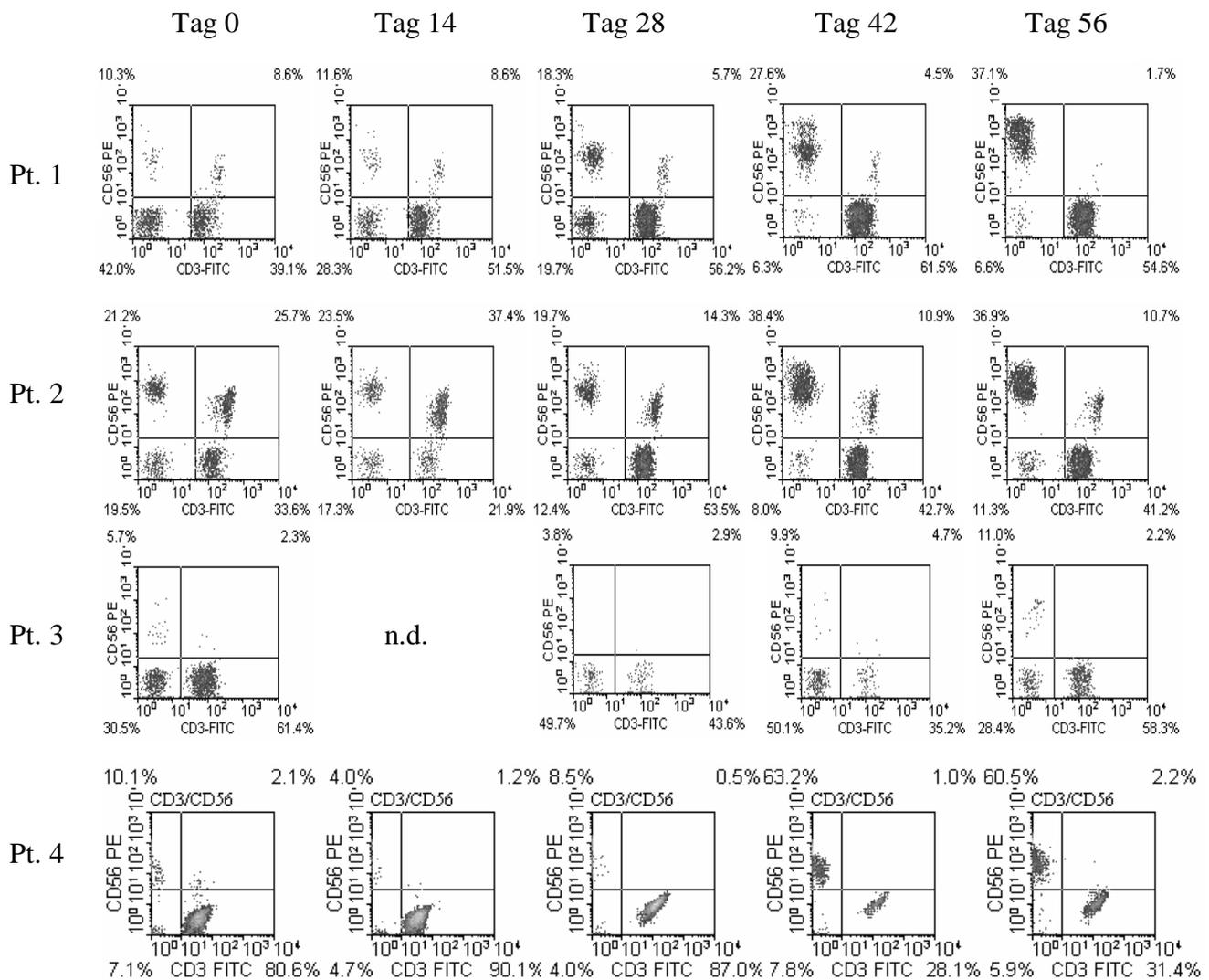


Abbildung 13: Der Anteil der NK-Zellen am Beispiel von Patient 1 bis 4 vor (Tag 0), während (Tag 14, 28 und 42) und nach (Tag 56) der Chemoimmuntherapie nach dem Münchener-Protokoll. Abkürzungen: n.d.= nicht durchgeführt.

In Abbildung 14 und 15 ist der Einfluss auf die Zytotoxizität der NK-Zellen gezeigt. Ausgehend von einer moderaten Lyse von K562-Zellen durch nicht vorbehandelte PBMC sinkt die lytische Aktivität gegen K562-Zellen in den ersten vier Wochen nach Gabe von 5-FU und IFN- α ab. Nach Tag 42 und besonders am Tag 56 nach Therapie mit den Zytokinen IL-2 und IFN- α liegt die lytische Aktivität der NK-Zellen deutlich über dem Ausgangswert (Abb. 15). Die umgedrehte Gabe von

Chemotherapie und Immuntherapie führte also nicht nur zu mehr NK-Zellen am Ende der Therapie, sondern auch zu erhöhter Lysefähigkeit der stimulierten Zellen.

Abb. 14 und 15: Die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen vor (Tag 0), während (Tag 14, 28 und 48) und nach (Tag 56) Chemoimmuntherapie nach dem Münchner Protokoll am Beispiel von 2 Patienten mit metastasiertem NZK.

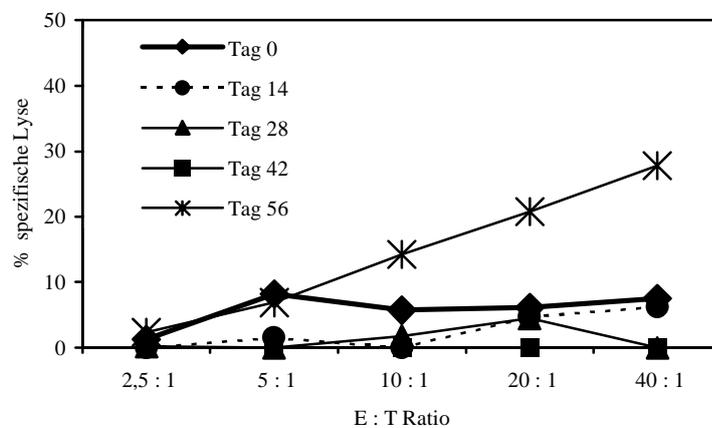


Abb. 14

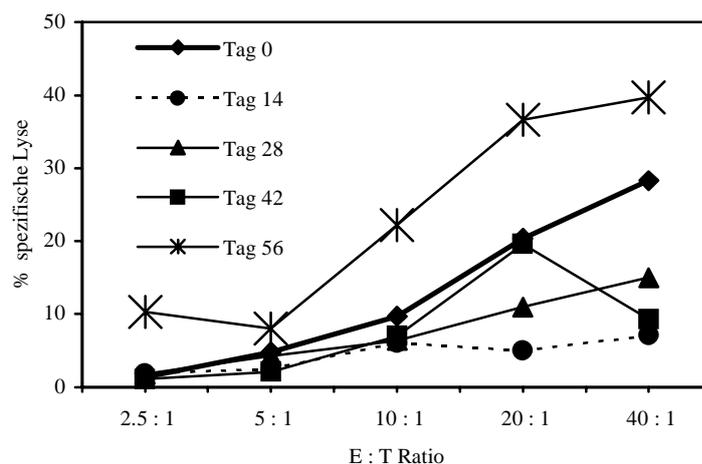


Abb. 15

Diese ex vivo gemessenen Werte korrelieren nicht mit dem klinischen Verlauf (Tumorregression bzw. Überleben) der untersuchten Patienten.

5. Diskussion

Seit Anfang der neunziger Jahre werden die Zytokine IL-2 und IFN-alpha in Kombination mit dem Zytostatikum 5-FU bei Patienten mit metastasiertem NZK klinisch eingesetzt [Atzpodien 1993]. Neben den initial publizierten Ansprechraten von bis zu 38% (bei selektionierten Patienten) zeigte sich in der 2004 veröffentlichten Arbeit von Atzpodien et al. auch ein signifikanter Vorteil im Gesamtüberleben. Hiermit ist der quasi standardmäßige Einsatz dieser Therapieform aufgrund klinischer Ergebnisse gerechtfertigt. Von Bedeutung ist die Indikationsstellung und somit die Selektion der Patienten. Die Selektionskriterien beinhalten unter anderem eine vorher durchgeführte Tumornephrektomie und einen Karnofsky-Score von $\geq 80\%$ (nach Hänninen).

Aus immunologischer Sicht erscheint jedoch die Gabe eines Zytostatikums im Rahmen einer Immuntherapie nach Zytokingabe und Stimulation der Lymphozyten der jeweiligen Patienten nicht sinnvoll, welche zu einer Verringerung stimulierter Lymphozyten im peripheren Blut erwarten lässt.

5.1 Die Kombination der Zytokine IL-2 und IFN- α erzielt keine signifikante Verbesserung der Stimulation der Lymphozytenfunktion im Vergleich zur jeweiligen einzelnen Gabe

Die Rationale der Kombination der Zytokine IL-2 und IFN- α basiert auf der Annahme, dass sich die Effekte dieser Substanzen addieren. Negrier et al. [2000] konnten zeigen, dass Patienten im Rahmen einer Immuntherapie von dieser Kombination im Vergleich zur Monotherapie im Gesamtansprechen profitierten. Allerdings zeigten sich in dieser Studie keine Vorteile bezüglich des Gesamtüberlebens. Basierend auf empirischen Daten wurde von Atzpodien eine 3-er-Kombination mit IL-2, IFN-alpha und 5-FU eingeführt. Um der Frage nachzugehen, ob eine Kombination zu besseren immunologischen Parametern führt, wurden zunächst in vitro Versuche mit PBL gesunder Spender durchgeführt. Die Ergebnisse der Proliferations-Tests mit PBL gesunder Spender zeigten, dass eine Kombination von IL-2 und IFN-alpha zu keiner verstärkten Zell-Proliferation führte im Vergleich zur Einzelgabe der Zytokine.

5.2 Das Zytostatikum 5-Fluorouracil hat dosisabhängige zytostatische und zytotoxische Effekte auf proliferierende Zellen

Nachweise dieser Wirkungen auf stimulierte Lymphozyten fehlen in der Literatur. In unserer Versuchsreihe titrierten wir die wirksame Dosis bis auf ein hundertstel der im Serum von Patienten zu erwartenden Dosis. So konnte bereits eine 5-FU-Konzentration von 0.2 µg/ml die Proliferation stimulierter Lymphozyten inhibieren. In der Langzeitkultur zeigte sich wiederholt ein drastischer Abfall der stimulierten Lymphozyten nach der Gabe von 5-FU. Da es für diesen Versuchsansatz keinen direkten Nachweis einer toxischen bzw. antiproliferativen Wirkung von 5-FU auf die Lymphozyten gibt, bleibt es offen, ob der beobachtete Abfall der Lymphozytenzahl in der Langzeitkultur tatsächlich nur auf die Gabe des 5-FU zurückzuführen ist oder auch zusätzlich mit dem Absetzen der Applikation von IL-2, welcher ein Wachstumsfaktor für die T-Zell-Proliferation ist, zu erklären ist. Wenn sich diese gemessenen Effekte der Immunchemotherapie auf die Lymphozyten (insbesondere NK-Zellen) von Patienten mit mNZK übertragen ließe, ist die Reihenfolge der Gabe der einzelnen Pharmaka nach dem Hannover-Protokoll mit einer verschlechterten immunologischen Situation, d. h. dass sie möglicherweise zu einer schlechteren Anti-Tumoraktivität führen könnte am Ende der Therapie.

5.3 Etablierung des Lanthanidfreisetzungstests zur Messung der Zytotoxizität stimulierter Lymphozyten

Zytotoxizität ist ein Parameter, der funktionelle Aktivität einer Subpopulation von Lymphozyten beschreibt. Bisher etablierte Methode verwenden Radioaktivität und sind daher für die klinische Routine wenig geeignet. Wir etablierten daher einen nicht-radioaktiven Test zur Messung einer Zell-vermittelten Lyse mittels eines Lanthanid-Liganden-Assays (Europium BATDA). Dieser Test erwies sich als reproduzierbar und valide.

Gegenüber dem radioaktiven ^{51}Cr -Freisetzungstest zeigt das nicht-radioaktive Europium-Liganden-Testsystem folgende Charakteristika:

Vorteile:

- schnelle Messung (1 sec/well)
- hohe Aufnahme des Markers (der Ligand BATDA)
- die Freisetzung des Markers findet in einem schnelleren und höheren Maße statt als die des Chroms, was eine kürzere Inkubationszeit erlaubt
- die Zielzellen können im voraus markiert und kryokonserviert gelagert werden
- kein radioaktiver Abfall

Nachteile:

- hoher Hintergrund, daher geringere Sensitivität

Bei der Fluorometrie treten einige gravierende Probleme auf. Eines davon ist der „Stokes shift“. Als „Stokes shift“ bezeichnet man die Wellenlängenunterschiede zwischen Anregung (Exzitation) und Emission. Bei den meisten Fluorochromen wie z.B. Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) ist er so gering, dass sich Exzitations- und Emissionswellenlängen überlappen. Bei den Lanthaniden liegt jedoch ein großer Stokes shift von $> 250\text{ nm}$ vor, d.h. das emittierte Licht weist eine um 200-300 nm längere Wellenlänge auf als die der Anregung, die im UV-Bereich erfolgt. Das nächste Problem besteht darin, dass fast alle Stoffe eine Autofluoreszenz besitzen, das betrifft Serumproteine ebenso wie Kunststoffe (z. B. Plastik). Deshalb kann die Hintergrundfluoreszenz so hoch sein, dass die spezifische Fluoreszenz der Probe nicht detektiert werden kann.

Ein Vorteil besteht in der vergleichsweise langanhaltenden Emission, so dass erst zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Anregung ein enger Interferenzfilter von 1 nm der Hauptabsorption geöffnet wird. Damit wird zeitverzögert die Fluoreszenz gemessen, sobald die Hintergrundstrahlung abgeklungen ist. Dies bedingt folglich eine günstige Signal-zu-Hintergrund-Ratio und somit auch eine verbesserte Sensitivität.

Lanthanidionen an sich sind nicht in der Lage, genügend Licht zu emittieren. Zur Verstärkung des Signals wird ein β -Diketon als Chelatbildner (BATDA) verwendet. BATDA bildet mit dem Lanthanidion +III einen thermodynamisch stabilen Komplex, der eine hohe Fluoreszenz mit einer hohen Absorption hat, einen effizienten Energietransfer auf das Metallion gewährleistet und den Komplex in Lösung hält. Viele Bestandteile in einer Zelle besitzen einen „quenching effect“, d.h. eine gegenseitige Auslöschung von Fluoreszenz durch Überlagerung von emittierten Wellenlängen, auf den Lanthanidkomplex. Um diesen zu vermeiden, wird zur Messung der Reaktion eine sogenannte „enhancement solution“ zugegeben. Durch die Bioaffinität von BATDA erfolgt eine Kompetition um das Metallion, so dass durch pH-Senkung ein neuer Komplex mit 2-Naphtoyltrifluoroesäure (β -NTA) in der „enhancement solution“ gebildet wird. Der neue Komplex bildet eine Mizelle um das Lanthanid- β -NTA Chelat aus. Diese Mizelle stellt den nötigen Schutz dar, um Wasseranlagerungen an die innere Sphäre der Chelatkomplexes zu verhindern. Unsere Messung ließen sich reproduzieren und in unserem Labor etablieren. Die Nachteile bestanden allerdings insbesondere in der oben genannten relativ schwachen Sensitivität.

5.4 Verminderung der Lymphozytenaktivität nach Gabe von 5-FU im Rahmen der Immunchemotherapie

Die Rationale, die Zytokine IL-2 und IFN-alpha mit dem Zytostatikum 5-FU zu kombinieren, basiert auf dem beschriebenen Synergismus zwischen IFN-alpha und 5-FU aus klinischen Beobachtungen bei Patienten mit metastasiertem Colonkarzinom [Wadler, 1989]. Dabei überwog das Ansprechen des Tumors der Wirkung auf die Funktion und Aktivität der stimulierten Lymphozyten. Während die Applikationsformen der Zytokine variierten, wurde 5-FU stets nach der Zytokingabe verabreicht. In einer Publikation von Marumo et al. zeigte die Kombinationsbehandlung an Mäusen, die mit RENCA NZK-Zelllinien beimpft wurden, dass IFN- α die Thymidinkinase-Aktivität vermindern konnte [Marumo, 1997].

Obwohl die Wirkungsmechanismen unklar sind, rechtfertigen die positiven Ansprechraten und von 2'-deoxy-5-fluorouridine, einem 5-FU-Derivat, auf metastasierte Nierenzellkarzinome die Kombination von 5-FU mit einer

Immuntherapie [Damascelli, 1990]. Diese und andere Ergebnisse führten zu einem großen Interesse an dieser Kombination und zu einem breiten Einsatz dieses Immunchemotherapieschemas in Deutschland [Huland, 2002].

Obwohl experimentelle Studien einige Hinweise auf einen Synergismus von Chemotherapien in Kombination mit Immuntherapien, insbesondere 5-FU und IFN- α 2a [Kubota, 1997], zeigen konnten, bleibt der Wirkmechanismus des 5-FU im Kontext einer Immuntherapie weiterhin ungeklärt. Elias et al. heben die Bedeutung der adäquaten Dosierung und Applikationsweise der Kombinationstherapie hervor und schlägt weitere Optimierungen vor [Elias, 2000]. Morita et al. konnten zeigen, dass IFN- α die Thymidin-Phosphorylase-Expression in drei von fünf NZK-Linien *in vitro* heraufreguliert und den 5-FU Metabolismus modulierte, was zu einer Verstärkung der 5-FU-Toxizität beim NZK führte [Morita, 1999]. Die Erhöhung der Sensitivität gegenüber 5-FU war deutlicher messbar nach 24-stündiger Vorbehandlung der Tumorzellen als bei gleichzeitiger Inkubation von 5-FU mit IFN- α . Es gab keinen nachweisbaren Einfluss dieser Kombination auf Fas-vermittelte Apoptose [Wu, 2000].

Tomita et al. zeigten, dass die Vorbehandlung einer NZK-Linie mit 5-FU mit einer Dosis, die niedriger ist (0.002 μ g/ml), als die maximale Serumkonzentration bei klinischer Anwendung, die Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber LAK-Zellen erhöhen konnte [Tomita, 1993]. Allerdings führten höhere Konzentrationen von 5-FU (> 0.2 μ g/ml) zu einer verminderten LAK-Zell Aktivität. Dosisstufen darunter ergaben keine Änderung ihrer Aktivität.

Unsere Experimente liefern weitere Erkenntnisse zum Einfluss von 5-FU auf Lymphozyten. Eine 5-FU-Dosis oberhalb von 0.2 μ g/ml, allein oder in Kombination mit IL-2 und/oder IFN- α blockiert die Lymphozyten-Proliferation vollständig. Diese 5-FU-Konzentration ist deutlich niedriger als sie im Protokoll nach Atzpodien in Patienten erreicht wird [Atzpodien, 1993].

Die Verabreichung von 5-FU nach dem Immunchemotherapie-Protokoll findet in Form einer Bolus-Infusion statt, wodurch hohe Spitzenkonzentrationen in kurzer Zeit und eine schnelle Biotransformation und Abbau dieses Wirkstoffes erreicht werden. Dies ist zu bedenken beim Vergleich unserer Daten, bei denen keine Biotransformation stattfindet, mit den klinischen Verhältnissen. Reiter und Kubota fanden heraus, dass die Kombination von 5-FU und IFN- α direkte Einflüsse auf das Wachstum der Tumorzellen *in vitro* hatten, ohne die Aktivität von NK-Zellen zu

beeinflussen [Kubota, 1997, Reiter, 1992]. Man nimmt an, dass die Population der NK-Zellen Membrancharakteristika hat, die es diesen Substanzen nicht möglich macht, in das Zellinnere einzudringen [Charmella, 1985]. Unsere Untersuchungen an PBL von Patienten, die die Immunchemotherapie erhielten, zeigten einen sehr starken, durch IL-2 and IFN- α induzierten Anstieg der NK-Zell-Population und deren Aktivität. Nach Entzug von IL-2 und Gabe von 5-FU verringerte sich die Population der NK und die NK-Zell-Aktivität. In vitro führte der Entzug von IL-2 und die Gabe von 5-FU zum Zelltod. Bei vier von sechs Patienten, die die einzelnen Pharmaka in umgekehrter Reihenfolge erhielten, kam es nach anfänglicher Supprimierung der NK-Zell-Anzahl und -Aktivität in den ersten vier Wochen zu einer deutlichen Stimulation. Es ist beschrieben, dass 5-FU einige immunsuppressive Effekte sowohl zellulär als auch humoral vermitteln kann. Dieses lässt sich durch Störungen im Purin-Metabolismus erklären [Harris, 1987]. Unsere in vitro Untersuchungen, die das Hannoveraner Immunchemotherapieschema simulierten, zeigten einen vollständigen Verlust der Lymphozytenfunktion und ein Absterben nach Gabe von 5-FU. Die Untersuchungen mit PBL von behandelten Patienten zeigten ebenfalls, dass die Zytotoxizität der NK-Zellen, welche durch Zytokingabe zunächst gesteigert werden konnte, nach Gabe von 5-FU und IL-2-Entzug wieder auf den geringen Ausgangswert reduziert wurde.

Bei umgekehrter Applikation, 5-FU gefolgt von Zytokingabe, wurden am Ende der Therapie mehr NK-Zellen und eine hohe NK-Zell-Aktivität gemessen. Eine klinische Aussage kann bei dieser geringen Patientenzahl nicht getroffen werden und war auch nicht die Zielsetzung.

6. Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass 5-FU besonders auf aktivierte Lymphozyten proliferationshemmend wirkt. Diese Hemmung kann durch IL-2 und IFN-alpha nicht aufgehoben werden. Die Simulation des Hannoveraner Schemas zeigte, dass im ersten Abschnitt bei Gabe der Zytokine die Lymphozytenproliferation und Zytotoxizität zunimmt, im zweiten Abschnitt, bei Gabe von 5-FU und Fehlen von IL-2 die Lymphozyten absterben. Bei behandelten Patienten zeigte sich eine anfängliche Zunahme der NK-Population und -Aktivität, die am Ende der Therapie wieder reduziert war.

Legha et al. verglichen beim metastasierten Melanom eine sequentielle Chemo-Immuntherapie mit der Immunchemotherapie in einer Serie von Phase II Studien und fanden heraus, dass die besten Ansprechraten bei der Chemo-Immuntherapie zu sehen waren [Legha, 1998]. Die Kombination von Immun- und Chemotherapie macht Sinn dahingehend, dass die Chemotherapie den Tumor schädigt und so für Immuneffektorzellen sensibilisiert. In diesem Sinne sollte die Chemotherapiegabe zeitlich vor der Immuntherapie erfolgen. Hierdurch könnte der zytotoxische Effekt des 5-FU auf die Tumorzellen den Antigen-präsentierenden Zellen einen verbesserten Zugriff auf Tumorantigene bieten. Die hier vorgelegten Daten sind vielversprechend dahingehend, dass bei Chemo-(5-FU)-Immungabe am Ende der Therapie mehr NK-Zellen und höhere Zytotoxizität in PBL der Patienten nachweisbar waren. Weitere Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv sind nötig, um die Effekte zu validieren. Des weiteren empfehlen wir die Durchführung einer prospektiv randomisierten Studie, in der Patienten mit metastasiertem NZK mit einem modifizierten Hannoveraner Immunchemotherapie-Protokoll behandelt werden, nach dem das 5-FU zu Beginn appliziert wird. Eine Überprüfung der NK- und T-Zell-Aktivität während dieser Therapie kann nachweisen, ob der Verlust der aktivierten Lymphozyten verhindert wird.

7. Literaturverzeichnis

Abdel-Wahab Z, Kalady MF, Emani S, Onaitis MW, Abdel-Wahab OI, Cisco R, Wheless L, Cheng TY, Tyler DS, Pruitt SK (2003) Induction of anti-melanoma CTL response using DC transfected with mutated mRNA encoding full-length Melan-A/MART-1 antigen with an A27L amino acid substitution. *Cell Immunol* 224(2):86-97

Amato RJ (2000) Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Semin Oncol* 27(2):177-86

Angervall L, Wahlqvist L (1978) Follow-up and prognosis of renal carcinoma in a series operated by perifascial nephrectomy combined with adrenalectomy and retroperitoneal lymphadenectomy. *Eur Urol* 4(1):13-7

Atzpodien J, Kirchner H, Hänninen EL, Deckert M, Fenner M, Poliwoda H (1993) Interleukin-2 in combination with interferon- α and 5-fluorouracil for metastatic renal cell carcinoma. *Eur J Cancer* 29A: 56

Atzpodien J, Kirchner H, Illiger HJ, Metzner B, Ukena D, Schott H, Funke PJ, Gramatzki M, von Jürgenson S, Wandert T, Patzelt T, Reitz M and DGCIN (2001) IL-2 in combination with IFN- α and 5-FU versus tamoxifen in metastatic renal cell carcinoma: long-term results of a controlled randomized clinical trial. *Br J Cancer* 85: 1130

Atzpodien J, Kirchner H, Jonas U, Bergmann L, Schott H, Heynemann H, Fornara P, Loening SA, Roigas J, Müller SC, Bodenstein H, Pomer S, Metzner B, Rebmann U, Oberneder R, Siebels M, Wandert T, Patzelt T, Reitz M and DGCIN (2003) Interleukin-2- and Interferon-alpha2a-based Immuno-Chemotherapy in advanced renal cell carcinoma: results of a prospective randomized trial of the German Cooperative Renal Carcinoma Chemoimmunotherapy Group (DGCIN). *J Clin Oncol* 22 (7): 1188-94

Blomberg K, Hautala R, Lövgren J, Mukkala V-M, Lindqvist C, Akerman K (1996) Time-resolved fluorometric assay for natural killer activity using target cells labelled with a fluorescence enhancing ligand. *J Immunol Methods* 193: 199

Blum JL, Jones SE, Buzdar D (1999) Multicenter phase II study of capecitabine in paclitaxel-refractory metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 17: 485

Boeing H, Schlehofer B, Wahrendorf J (1997) Diet, obesity and risk for renal cell carcinoma: results from a case control-study in Germany. *Z Ernährungswiss* 36(1):3-11

Boon T, Coulie PG, Van den Eynde B (1997) Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol Today* 18: 267

Brändle D, Brasseur F, Weynants P, Boon T, Van den Eynde BJ. (1996) A mutated HLA-A2 molecule recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma. *J Exp Med* 183: 2501

Brinkmann OA, Bruns F, Prott FJ, Hertle L (1999) Possible synergy of radiotherapy and chemo-immunotherapy in metastatic renal cell carcinoma (RCC). *Anticancer Res* 19(2C): 1583-7

Brouwenstijn N, Gaugler B, Kruse KM, Van der Spek CW, Mulder A, Osanto S, Van den Eynde BJ, Schrier PI (1996) Renal-cell-carcinoma-specific lysis by cytotoxic T-lymphocyte clones isolated from peripheral blood lymphocytes and tumor infiltrating lymphocytes. *Int J Cancer* 68: 177

Burnet FM (1959) *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*. London, Cambridge University Press

Campbell SC, Flanigan RC, Clark JI (2003) Nephrectomy in metastatic renal cell carcinoma. *Curr Treat Options Oncol* 4(5):363-72

Cassidy J, Dirix L, Bisset D (1998) A Phase I study of capecitabine in combination with oral leucovorine in patients with intractable solid tumors. Clin Cancer Res 4: 2755

Charmella LJ, Meyer C, Thompson GE, Dimitrov NV (1985) Chemotherapeutic agents and modulation of natural killer cell activity in vitro. J Immunopharm 7: 53

Cheever MA, Chen W (1997) Therapy with T cells: principles revisited. Immunol Rev 157: 177

Citterio G, Bertuzzi A, Tresoldi M, Galli L, Di Lucca G, Scaglietti U, Rugarli C (1997) Prognostic factors for survival in metastatic renal cell carcinoma: retrospective analysis from 109 consecutive patients. Eur Urol 31(3):286-91

Damascelli B, Marchiano A, Spreafico C, Lutman R, Salvetti M, Bonalumi MG, Mauri M, Garbagnati F, DelNero A, Comeri G, Conti G, Coppoli S, Benetti G, Tralongo P, Belussi D (1990) Circadian continuous chemotherapy of renal cell carcinoma with an implantable, programmable infusion pump. Cancer 66: 237

Dutcher J, Logan T, Gordon M, Sosman J, Weiss G, Margolin K, Plasse T, Mier J, Lotze M, Clark J, Atkins M (2000) Phase II trial of interleukin 2, interferon α , and 5-fluorouracil in metastatic renal cell cancer: a cytokine working group study. Clin Cancer Res 6: 3442

Elias L, Blumenstein BA, Kish J, Flanigan RC, Wade JL, Lowe BA, Goodwin JW, Crawford ED (1996) A phase II trial of interferon- α and 5-fluorouracil in patients with advanced renal cell carcinoma. A Southwest Oncology Group Study. Cancer 78: 1085

Elias L, Lew D, Figlin R, Flanigan R, Thompson M, Triozzi P, Belt R, Wood D, Rivkin S, Crawford E (2000) Infusional interleukin-2 and 5-fluorouracil with subcutaneous interferon- α for the treatment of patients with advanced renal cell carcinoma. Cancer 89: 597

Ellerhorst J, Sella A, Amato R, Tu S, Millikan R, Finn L, Banks M, Logothetics C (1997) Phase II trial of 5-Fluorouracil, Interferon- α and continuous infusion interleukin-2 for patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer* 80: 2128

Feldmann JD, Jacobs SC (1992) Late development of renal carcinoma in allograft kidney. *J Urol* 148: 395-7

Figlin RA, Beldegrun A, Moldawer N, Zeffren J, deKernion J (1992) Concomitant administration of recombinant human interleukin-2 and recombinant interferon-alpha-2A: an active outpatient regime in metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 10: 414

Figlin RA, Thompson JA, Bukowski RM, Vogelzang NJ, Novick A, Lange P, Steinberg G, Beldegrun AS (1999) Multicenter, randomized, phase III trial of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in combination with recombinant interleukin-2 in metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 17: 2521

Finke JH, Rayman P, Edinger M, Tubbs RR, Stanley J, Klein E, Bukowski R (1992) Characterization of a human renal cell carcinoma specific cytotoxic CD8+ T cell line. *J Immunother* 11: 1

Fischer CG, Oberneder R et al. (2000) Immuntherapie des Nierenzellkarzinoms. *Dt Ärztebl* 97: A 2781-2784 [Heft 42]

Fisher RI, Rosenberg SA, Sznol M, et al. (1997) High dose aldesleukin in renal cell carcinoma: long term survival update. *Cancer J Sci Am* 3: S70

Flad T, Spengler B, Kalbacher H, Brossart P, Baier D, Kaufmann R, Bold P, Metzger S, Bluggel M, Meyer HE, Kurz B, Muller CA (1998) Direct identification of major histocompatibility complex class I-bound tumor-associated peptide antigens of a renal carcinoma cell line by a novel mass spectrometric method. *Cancer Res* 58: 5803

Flanigan RC, Mickisch G, Sylvester R, Tangen C, Van Poppel H, Crawford ED (2004) Cytoreductive nephrectomy in patients with metastatic renal cancer: a combined analysis. *J Urol* 171(3):1071-6

Flanigan RC, Salmon SE, Blumenstein BA, Bearman SI, Roy V, McGrath PC, Caton J.R., Jr., Munshi N, Crawford ED (2001) Nephrectomy followed by interferon alfa-2b compared with interferon alfa-2b alone for metastatic renal-cell cancer. *N Engl J Med* 345: 1655

Gaudin C, Dietrich PY, Robache S, Guillard M, Escudier B, Lacombe MJ, Kumar A, Triebel F, Caignard, A (1995) In vivo local expansion of clonal T cell subpopulations in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 55: 685

Gaugler B, Brouwenstijn N, Vantomme V, Szikora JP, Van der Spek CW, Patard JJ, Boon T, Schrier PI, Van den Eynde BJ (1996) A new gene coding for an antigene recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma. *Immunogenetics* 44: 323

Golimbu M, Joshi P, Sperber A, Tessler A, Al-Askari S, Morales P (1986) Renal cell carcinoma: survival and prognostic factors. *Urology* 27(4):291-301

Greenberg PD (1991) Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. *Adv Immunol* 49: 281

Guillonneau B, Vallancien G (1992) Surgical treatment of renal cancer in adults. *Rev Prat.* 42(10):1230-4

Guinan P, Sobin LH, Algaba F, Badellino F, Kameyama S, MacLennan G, Novick A (2000) TNM staging of renal cell carcinoma: Workgroup No. 3. Union International Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 80(5):992-3

Hafez KS, Fergany AF, Novick AC (1999) Nephron sparing surgery for localized renal cell carcinoma: impact of tumor size on patient survival, tumor recurrence and TNM staging. *J Urol* 162(6):1930-3

Hamano K, Esumi M, Igarashi H, Chino K, Mochida J, ISHIDA And H, Okada K (2002) Biallelic inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in sporadic renal cell carcinoma. J Urol. 167(2 Pt 1): 713-7

Hänninen EL, Kirchner H, Atzpodien J (1996) Interleukin-2 based home therapy of metastatic renal cell carcinoma, risks and benefits in 215 consecutive single institution patients. J Urol 155: 19

Harris JE, Braun DP (1987) Modulation of immune function in cancer patients. Clin Physiol Biochem 5: 222

Heath CW Jr, Lally CA, Calle EE, McLaughlin JK, Thun MJ (1997) Hypertension, diuretics, and antihypertensive medications as possible risk factors for renal cell cancer. Am J Epidemiol. 145(7):607-13

Heaton KM, Grimm EA (1993) Cytokine combinations in immunotherapy for solid tumors: a review. Cancer Immunol Immunother 37: 213

Heinzer H, Huland E, Huland H (2002) Regional immunotherapy for metastatic renal cell carcinoma. Urologe A 41: 239

Hofmockel G, Langer W, Theiss M, Gruss A, Frohmueller HG (1996) chemoimmunotherapy for metastatic renal cell carcinoma using a regime of interleukin-2, interferon-alpha and 5-fluorouracil. J Urol 156: 18

Hölzel D et al (in Vorbereitung, 2003) Tumorregister München Jahresbericht 2001

Hrushesky WJ, Murphy GP (1977) Current status of the therapy of advanced renal carcinoma. Surg Oncol 9(3):277-88

Huland E, Heinzer H, Timm S, Alamian M, Huland H (2002) Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma in Germany. An assessment of the current status. Urologe A 41: 282

Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Lewitsky H (1998) The central role of CD4+ T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med* 188: 2357

Jantzer P, Schendel DJ (1998) Human renal cell carcinoma antigen-specific CTLs: antigen-driven selection and long-term persistence in vivo. *Cancer Res* 58: 3078

Kim TY, von Eschenbach AC, Filaccio MD, Hayakawa K, Parkinson DR, Balch CM, Itoh K (1990) Clonal analysis of lymphocytes from tumor, peripheral blood, and nontumorous kidney in primary renal cell carcinoma. *Cancer Res* 50: 5263

Koo AS, Tso CL, Shimabukuro T, Peyret C, deKernion J, Belldegrun A (1991) Autologous tumor-specific cytotoxicity of tumor-infiltrating lymphocytes derived from human renal cell carcinoma. *J Immunother* 10: 347

Kradin R, Kurnick J, Lazarus D, Preffer F, Dubinett S, Pinto C, Gifford J, Davidson E, Grove B, Callahan R, Strauss HW (1989) Tumour-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in treatment of advanced cancer. *Lancet* : 577

Kriegmair M, Oberneder R, Hofstetter A (1995) Interferon alfa and vinblastine versus medroxyprogesterone acetate in the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Urology* 45: 758

Kubota T, Kase S, Otani Y, Watanabe M, Teramoto T, Kitajima M (1997) Interferons alpha-2a and beta increase the antitumor activity, detected by MTT assay, of 5-Fluorouracil against experimental and clinical human gastrointestinal carcinomas. *Anticancer Res* 17: 725

Legha SS, Ring S, Eton O, Bedikian A, Buzaid AC, Plager C, Papadopoulos N (1998) Development of a biochemotherapy regimen with concurrent

administration of cisplatin, vinblastine, dacarbazine, interferon alfa, and interleukin 2 for patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 16: 1752

Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H (2004) Nephron sparing surgery for appropriately selected renal cell carcinoma between 4 and 7 cm results in outcome similar to radical nephrectomy. *J Urol* 2004 Mar;171(3):1066-70

Machtens S, Kuczyk M, Becker AJ, Bokemeyer C, Serth J, Jonas U (1999) New aspects on the identification of genetic alterations and prognostically important biological parameters in renal cell cancer. *Urologe A* 38(5):442-51

Maldazys JD, deKernion JB (1986) Prognostic factors in metastatic renal carcinoma. *J Urol* 136(2):376-9

Marumo K, Oya M, Murai M (1997) Biochemical modulation of 5-fluorouracil with murine interferon- α/β against murine renal cell carcinoma. *Int J Urol* 4: 163

Medeiros LJ, Jones EC, Aizawa S, Aldape HC, Cheville JC, Goldstein NS, Lubensky IA, Ro J, Shanks J, Pacelli A, Jung SH (1997) Grading of renal cell carcinoma: Workgroup No. 2. Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 80(5):990-1

Mickisch GH, Garin A, van Poppel H, de Prijck L, Sylvester R (2001) Radical nephrectomy plus interferon-alfa-based immunotherapy compared with interferon alfa alone in metastatic renal-cell carcinoma: a randomised trial. *Lancet* 358(9286):966-70

Minasian LM, Motzer RJ, Gluck L, Mazumdar M, Vlamis V, Krown SE (1993) Interferon alfa-2a in advanced renal cell carcinoma: treatment results and survival in 159 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 11: 1368

Morita T, Tokue A (1999) Biomodulation of 5-fluorouracil by interferon- α in human renal carcinoma cells: relationship to the expression of thymidine phosphorylase. *Cancer Chemother Pharmacol* 44: 91

Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J (1999) Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 17(8):2530-40

Neefe JR, Glass J (1991) Abrogation of interferon-induced resistance to interferon-activated major histocompatibility complex-unrestricted killers by treatment of melanoma cell line with 5-fluorouracil. *Cancer Res* 51: 3159

Negrier S, Caty A, Lesimple T, Douillard J-Y, Escudier B, Rossi J-F, Viens P, Gomez F (2000) Treatment of patients with metastatic renal carcinoma with a combination of subcutaneous interleukin-2 and interferon alfa with or without fluorouracil. *J Clin Oncol* 18: 4009

Negrier S, Escudier B, Lasset C, Douillard J-Y, Savary J, Chevreau C, Ravaud A, Mercatello A, Peny J, Mousseau M, Philip T, Tursz T (1998) Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 338: 1272

Neumann E, Engelsberg A, Decker J, Störkel S, Jaeger E, Huber C, Seeliger B (1998) Heterogeneous expression of the tumor-associated antigens RAGE-1, PRAME, and Glykoprotein 75 in human renal cell carcinoma: Candidates for T-cell based immunotherapies? *Cancer Research* 58: 4090

Ognibene FP, Rosenberg SA, Lotze M, et al. (1988) Interleukin-2 administration causes reversible hemodynamic changes and left ventricular dysfunction similar to those seen in septic shock. *Chest* 94: 750-754

Ossendorp F, Mengede E, Camps M, Filius R, Melief CJM (1998) Specific T-helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T-lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors. *J Exp Med* 187: 693

Ostrand-Rosenberg S, Thakur A, Clements V (1990) Rejection of mouse sarcoma cells after transfection of MHC class II genes. *J Immunol* 144: 4068

Pardoll DM (1998) Cancer vaccines. *Nature Med* 4: 525-531

Pizzocaro G, Piva L, Di Fronzo G, Giongo A, Cozzoli A, Dormia E, Minervini S, Zanollo A, Fontanella U, Longo G (1987) Adjuvant medroxyprogesterone acetate to radical nephrectomy in renal cancer: 5-year results of a prospective randomized study. *J Urol* 138(6):1379-81

Qin Z, Noffz G, Mohaupt M, Blankenstein T (1997) Interleukin 10 prevents dendritic cell infiltration and vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene modified tumor cells. *J Immunol* 159: 770

Reiter Z, Ozes ON, Blatt LM, Taylor MW (1992) A dual anti-tumor effect of a combination of interferon-alpha or interleukin-2 and 5-fluorouracil on natural killer (NK) cell mediated cytotoxicity. *Clin Immunol Immunopathol* 62: 103

Ritchie AWS, Chisholm GD (1983) The natural history of renal cell carcinoma. *Semin Oncol*;10:390-400

Robson CJ (1982) Results of radical thoraco-abdominal nephrectomy in the treatment of renal cell carcinoma. *Prog Clin Biol Res.*100:481-8

Robson CJ (1982) Staging of renal cell carcinoma. *Prog Clin Biol Res.*;100:439-45

Rosenberg S, Lotze M, Muul L, Chang A, Avis F, Leitman S, Linehan M, Robertson C, Lee R, Rubin J, Seipp C, Simpson C, White D (1987) A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *New Engl J Med* 316: 890

Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, Linehan WM, Robertson CN, Lee RE, Rubin JT, Seipp CA, Simpson CG, White DE (1987) A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 316: 889

Ryan CW, Vogelzang NJ, Dumas M, Kuzel T, Stadler WM (2000) Granulocyte-Macrophage-Colony stimulating factor in combination immunotherapy for patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer* 88: 1317

Sagalowsky AI, Kadesky KT, Ewalt DM, Kennedy TJ (1994) Factors influencing adrenal metastasis in renal cell carcinoma. *J Urol.* 151(5):1181-4

Sagalowsky AI, Molberg K (1999) Solitary metastasis of renal cell carcinoma to the contralateral adrenal gland 22 years after nephrectomy. *Urology.* 54(1):162

Saitoh H, Hayakawa K, Nishimura K, Kubo S, Hida S (1997) Long-term results of ethanol embolization of renal cell carcinoma. *Radiat Med* 15(2):99-102

Schendel DJ, Gansbacher B, Oberneder R, Kriegmair M, Hofstetter A (1993) Tumor-specific lysis of human renal cell carcinomas by tumor-infiltrating lymphocytes. I. HLA-A2 restricted recognition of autologous and allogenic tumor lines. *J Immunol* 151: 4209-4220

Seeliger B, Maeurer MJ, Ferrone S (1997) TAP off-Tumors on. *Immunol Today* 18: 292

Sella A, Logothetis CJ, Fitz K (1992) Phase II study of interferon-alpha and chemotherapy (5-fluorouracil and mitomycin C) in metastatic renal cell cancer. *J Urol* 147: 573

Selli C, Hinshaw WM, Woodard BH, Paulson DF (1983) Stratification of risk factors in renal cell carcinoma. *Cancer* 52:899-903

Siebels M, Meyer G, Rudy W, Lindauer M, Meuer SC, Moebius U (2001) Simultaneous ligation of CD5 and CD28 restore impaired immunostimulatory function in human Renal Cell Carcinoma. *Urol Res* 29: 330

Siebels M, Theodorakis J, Liedl B, Schneede P, Hofstetter A (2000) Large de novo renal cell carcinoma in a 10-year-old transplanted kidney: successful organ-preserving therapy. *Transpl* 69: 677-9

Skinner DG, Vermillion CD, Colvin RB (1972) The surgical management of renal cell carcinoma. *J Urol.* 107(5):705-10

Stadler WM, Kuzel T, Dumas M, Vogelzang NJ (1998) Multicenter phase II trial of interleukin-2, interferon-alpha, and 13-cis-retinoic acid in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 16: 1820

Stahler G, Ernst G (1985) Organ-sparing operative therapy of kidney tumors. *Urologe A.* 24(6):330-3

Tavani A, La Vecchia C (2000) Smoking and health, with a note on kidney cancer. *Contrib Nephrol* 130:11-20

Thompson J, Shulman K, Benyunes M, Lindgren C, Collins C, Lange P, Bush W, Benz L, Fefer A (1992) Prolonged continuous intravenous infusion interleukin-2 and lymphokine-activated killer-cell therapy for metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 10: 960

Tomita Y, Imai T, Katagiri A, Kimura M, Saitoh K, Sato S (1993) 5-Fluorouracil increases susceptibility of renal cell cancer cell lines to lymphokine-activated killer cells: evidence for alteration not at the level of recognition but at a post-binding stage of the lytic cycle. *Cancer Lett* 30;75(1):27-34

Tomita Y, Imai T, Katagiri A, Kimura M, Saitoh K, Sato S (1993) 5-Fluorouracil increases susceptibility of renal cell cancer cell lines to lymphokine-activated killer cells: evidence for alteration not at the level of recognition but at a post-binding stage of the lytic cycle. *Cancer Letters* 75: 27

Van Herpen CM, Jansen RL, Kruit WH, Hoekman K, Groenewegen G, Osanto S, de Mulder PH (2000) Chemoimmunotherapy with interleukin-2, interferon-alpha and 5-fluorouracil for progressive metastatic renal cell carcinoma: a multicenter phase II study. *Br J Cancer* 82: 772

van Kessel AG, Wijnhoven H, Bodmer D, Eleveld M, Kiemeney L, Mulders P, Weterman M, Ligtenberg M, Smeets D, Smits A (1999) Renal cell cancer: chromosome 3 translocations as risk factors. *J Natl Cancer Inst* 91(13):1159-60

Volm M, Kastel M, Mattern J, Efferth T (1993) Expression of resistance factors (P-glycoprotein, glutathione S-transferase-pi, and topoisomerase II) and their interrelationship to proto-oncogene products in renal cell carcinomas. *Cancer* 15;71(12):3981-7

Wadler S, Schwartz EL (1990) Antineoplastic activity of the combination of interferon and cytotoxic agents against experimental and human malignancies: a review. *Cancer Res* 50: 3473

Wadler S, Schwartz EL, Goldman M (1989) Fluorouracil and recombinant alpha-2a-interferon: an active regimen against advanced colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 7: 1769

Wadler S, Wersto R, Weiberg V Thompson D, Schwartz EL (1990) Interaction of fluorouracil and interferon in human colon cancer cell lines: cytotoxic and cytokinetic effects. *Cancer Res* 50 (18): 5735

West WH, Tauer KW, Yannelli JR, Marshall GD, Orr DW, Thurman GB, Oldham RK (1987) Constant infusion recombinant interleukin-2 in adoptive immunotherapy of advanced cancer. *N Engl J Med* 316: 898

Westermann J, Reich G, Kopp J, Haus U, Dörken B, Pezzutto A (2001) Granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor plus interleukin-2 plus interferon-alpha in the treatment of metastatic renal cell carcinoma: a pilot study. *Cancer Immunol Immunother* 49: 613

Wick M, Dubey P, Koeppen H (1997) Antigenic cancer cells grow progressively in immune hosts without evidence for T cell exhaustion of systemic energy. *J Exp Med* 186: 229

Williams JC, Merguerian PA, Schned AR, Morrison PM (1995) Acquired renal cystic disease and renal cell carcinoma in an allograft kidney. *J Urol* 152: 395-6

Wittekind Ch, Meyer HJ, Bootz F (2002) TNM Klassifikation maligner Tumoren. 6. Auflage. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York

Wowra B, Siebels M, Muacevic A, Kreth FW, Mack A, Hofstetter A (2002) Repeated gamma knife surgery for multiple brain metastases from renal cell carcinoma. *J Neurosurg* 97(4):785-93

Wu X, Mizutani Y, Kakehi Y, Yoshida O, Ogawa O (2000) Enhancement of Fas-mediated apoptosis in renal cell carcinoma cells by Adriamycin. *Cancer Res* 60: 2912

Wyczolkowski M, Klima W, Bieda W, Walas K (2001) Spontaneous regression of hepatic metastases after nephrectomy and metastasectomy of renal cell carcinoma. *Urol Int* 66(2):119-20

Young RC (1998) Metastatic renal-cell carcinoma: what causes occasional dramatic regressions? *N Engl J Med* 30;338(18):1305-6

Curriculum vitae

Name: Karl Rohrmann
Geburtsdatum: 23.08.1971
Geburtsort: Bad Harzburg

Schulbildung:

1978 – 1982 Grundschule Bad Harzburg-Harlingerode
1982 – 1984 Orientierungsstufe Bad Harzburg
1984 – 1991 Werner-von-Siemens-Gymnasium Bad Harzburg
07/1991 Reifeprüfung

Wehrersatzdienst:

1991 – 1993 Zivildienst im Krankenhaus Fritz-König-Stift Bad Harzburg

Studium:

1993 – 1995 Studium der Humanmedizin in der Freien Universität Berlin
1995 – 1997 Studium der Humanmedizin in der Humboldt-Universität Berlin
1997 – 2000 Studium der Humanmedizin in der Ludwig-Maximilians-Universität München
04/2000 Ärztliche Prüfung

Ärztliche Tätigkeiten:

07/2000 – 06/2001 Arzt im Praktikum in der Abteilung für Chirurgie des Klinikums der Universität Tübingen (Prof. Becker)
07/2001 – 12/2001 Arzt im Praktikum in der Urologischen Klinik und Poliklinik des Klinikums der Universität München-Großhadern (Prof. Hofstetter)
01/2002 – 06/2005 Assistenzarzt in der Urologischen Klinik und Poliklinik des Klinikums der Universität München-Großhadern (Prof. Hofstetter, seit 01.04.2004 Prof. Stief)
seit 07/2005 Assistenzarzt in der Urologischen Klinik München-Planegg (Prof. Kriegmeier und Dr. Oberneder)

Wissenschaftliche Tätigkeiten:

- 02/2001 – 06/2001 Mitarbeit im Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen (Prof. Rammensee), Untersuchungen der T-Zell-Funktion bei Patienten mit Kolorektalen Tumoren und Mitarbeit in der Arbeitsgruppe Katastrophenmedizin (AGKM) der Universität Tübingen (Prof. Domres)
- 12/2001 – 12/2002 Betreuung der Phase I/II-Studie mit dem monoklonalen Antikörper MT201 der Firma Micromet bei Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom
- 02/2002 – 10/2002 Betreuung der Phase I/II-Studie mit dem monoklonalen Antikörper cG250 der Firma Wilex bei Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom

Lehrtätigkeiten:

- 1996 – 1998 Anstellung als Tutor mit Lehrtätigkeit im Institut für Physiologie der Freien Universität Berlin
- 07/2003 – 06/2005 Lehrkraft im Fach Urologie in der Krankenpflegeschule des Klinikums der Universität München-Großhadern

Vorträge: Inhalte dieser Dissertation wurden auf zahlreichen nationalen und internationalen universitären Veranstaltungen präsentiert, u.a.:

- 2004 Symposium für experimentelle Urologie in Lübeck
- 2004 Europäischer Urologenkongress in Wien
- 2003 Europäischer Urologenkongress in Madrid
- 2003 Bayerisch-Österreichischer Urologenkongress in Wien
- 2002 Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie in Wiesbaden
- 2002 Symposium für experimentelle Urologie in Mannheim
- 2002 Bayerisch-Österreichischer Urologenkongress in Regensburg

Publikationen:

Int J Urol 2006 Jun;13(6):832-3: Symphsitis following transrectal biopsy of the prostate. Adam C, Graser A, Koch W, Trottmann M, **Rohrmann K**, Zaak D, Stief C

Clin Cancer Res. 2006 Feb 1;12(3 Pt 1):718-25: Cytotoxic markers and frequency predict functional capacity of natural killer cells infiltrating renal cell carcinoma. Schleypen JS, Baur N, Kammerer R, Nelson PJ, **Rohrmann K**, Grone EF, Hohenfellner F, Haferkamp A, Pohla H, Schendel DJ, Falk CS, Noessner E

Curr Drug Targets. 2005 Nov;6(7):835-46: Targeted agents for the treatment of advanced renal cell carcinoma. Staehler M, Haseke N, **Rohrmann K**, Stief CG, Siebels M

BJU Int. 2005 Jun;95(8):1153-61: Therapeutic approaches in metastatic renal cell carcinoma. Staehler M, **Rohrmann K**, Bachmann A, Zaak D, Stief CG, Siebels M

World J Urol. 2005 Jul;23(3):196-201: Immunotherapy in metastatic renal cell carcinoma. **Rohrmann K**, Staehler M, Haseke N, Bachmann A, Stief CG, Siebels M

Urologe A. 2004 Oct;43(10):1271-4: Complete remission of pulmonary metastasis from renal cell carcinoma through inhalation therapy with Interleukin-2 after unsuccessful systemic immunochemotherapy. **Rohrmann K**, Schleypen J, Adam C, Hofstetter A, Siebels M

Int J Cancer. 2003 Oct 10;106(6):905-12: Renal cell carcinoma-infiltrating natural killer cells express differential repertoires of activating and inhibitory receptors and are inhibited by specific HLA class I allotypes. Schleyen JS, Von Geldern M, Weiss EH, Kotzias N, **Rohrmann K**, Schendel DJ, Falk CS, Pohla H

Med Arh. 2000;54(4):201-3: The German approach to emergency/disaster management. Domres B, Schauwecker HH, **Rohrmann K**, Roller G, Maier GW, Manger A

Karl Rohrmann

Januar 2007

9. Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn PD Dr. Michael Siebels herzlich für die Überlassung des Themas dieser Dissertation und die fachliche Unterstützung bedanken. Mein Dank gilt ebenfalls dem gesamten Team des Labors für Tumorummunologie der Urologischen Klinik und Poliklinik des Klinikums der Universität München-Großhadern, insbesondere Frau Dr. Heike Pohla und Birgit Stadlbauer für die Mithilfe, Geduld und tatkräftigen Unterstützungen. Des weiteren danke ich Frau Prof. Dolores J. Schendel für die vielen fachlichen Ratschläge. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Elfriede Nössner für die kritische Durchsicht der Arbeit. Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei Prof. Alfons Hofstetter bedanken für die Möglichkeit der Nutzung der Räume und der Schaffung entsprechender zeitlicher Freiräume.