

**Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie
Campus Benjamin Franklin
der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin**

DISSERTATION

**T-Zell Immunität beim Hepatozellulären Karzinom am Beispiel des
Tumorantigens Wilms-Tumor-Protein-1 als potentielles Targetantigen
immuntherapeutischer Ansätze**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Susanne Renate Helene Döring

aus Berlin

Datum der Promotion: 30.05.2015

Für REH

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
ABSTRACT ENGLISH	7
ABSTRAKT DEUTSCH	9
ZUSAMMENFASSUNG	11
1 EINLEITUNG	13
1.1 HCC	13
1.1.1 <i>Epidemiologie und Risikofaktoren des HCCs</i>	13
1.1.2 <i>Pathogenese und klinische Manifestation des HCCs</i>	14
1.1.3 <i>Diagnose und Therapieoptionen des HCCs</i>	15
1.2 IMMUNSYSTEM UND TUMOREN	17
1.3 TUMORANTIGENE	21
1.3.1 <i>Tumorantigene und Tumor-Escape-Phänomene beim HCC</i>	24
1.4 EINTEILUNG DER T-ZELLEN	24
1.4.1 <i>Zytotoxische T-Zellen</i>	25
1.4.2 <i>Regulatorische T-Zellen (T_{reg})</i>	26
1.4.3 <i>Myeloid derived suppressor cells (MDSCs)</i>	28
1.5 SPONTANE T-ZELL-ANTWORTEN GEGEN TUMORANTIGENE	29
1.6 IMMUNTHERAPIE MIT TAAS	30
1.7 WT1 ALS ZIELSTRUKTUR FÜR IMMUNOLOGISCHE THERAPIESTRATEGIEN	31
1.7.1 <i>WT1 und spontane T-Zell-Immunität beim HCC</i>	32
1.8 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	33
2 MATERIAL UND METHODEN	35
2.1 MATERIAL	35
2.1.1 <i>Patienten und Kontrollgruppen</i>	35
2.1.2 <i>Tumorzelllinien</i>	37
2.1.3 <i>Kulturmedien</i>	37
2.1.4 <i>Auftaumedium</i>	38
2.1.5 <i>Dichtegradient</i>	38
2.1.6 <i>Accutase</i>	38
2.2 FACS-ANTIKÖRPER	38
2.2.1 <i>HLA-Typisierung</i>	38
2.2.2 <i>Tumorzell-Einzelfärbung</i>	39
2.2.3 <i>Isotypen-Kontrolle</i>	39
2.2.4 <i>T-Lymphozyten nach Tumorzellenkontakt</i>	39
2.2.5 <i>Spezifische T-Lymphozyten nach Tumorzellkontakt</i>	40
2.2.6 <i>CD8⁺T-Zell-Panel</i>	40
2.2.7 <i>T_{reg}-Panel</i>	40
2.2.8 <i>MDSC-Panel</i>	41
2.2.9 <i>WT1-Peptidmix (JPT, Berlin)</i>	41
2.3 METHODEN	41
2.3.1 <i>Gewinnung von MNCs aus Heparin-Vollblut</i>	41
2.3.2 <i>Bestimmung der Zellzahl</i>	42
2.3.3 <i>Passagierung von Tumorzelllinien</i>	42
2.3.4 <i>Einzelfärbung der Tumorzelllinien</i>	42
2.3.5 <i>WT1-Färbung der Tumorzelllinien</i>	43
2.3.6 <i>Peptidbeladung der Tumorzelllinien</i>	43
2.3.7 <i>Analyse der T-Zell-Antwort gegen allogene Tumorzelllinien</i>	43
2.3.8 <i>T-Lymphozyten-Expansions-Ansatz</i>	44
2.3.9 <i>Analyse der T-Zell-Antwort von mit Influenza-Peptid expandierten T-Zellen gegenüber Influenza-Peptid beladenen Tumorzellen</i>	44
2.3.10 <i>Stimulation von CD8⁺ T-Zellen und T_{regs} mit dem WT1-Peptidmix</i>	44
2.3.11 <i>Durchflusszytometrische Analyse von MDSCs</i>	45
2.3.12 <i>Messung und Daten Analyse</i>	45

2.3.13	<i>Statistische Methoden</i>	45
3	ERGEBNISSE	46
3.1	ANALYSE VON OBERFLÄCHENREZEPTOREN UND VON WT1 AUF TUMORZELLEN	46
3.2	T-ZELLERKENNUNG UND ANTIGENPRÄSENTATION VON HCC-TUMORZELLINIEN	49
3.2.1	<i>Analyse der T-Zell-Erkennung direkt ex vivo von HCC-Tumorzelllinien anhand eines Influenza-Modell-Antigens</i>	49
3.2.2	<i>Analyse der T-Zell-Erkennung nach in-vitro-Stimulation von HCC-Tumorzelllinien anhand eines Influenza-Modell-Antigens</i>	50
3.3	SPONTANE T-ZELL-ANTWORTEN NACH STIMULATION MIT DEM WT1-PEPTIDMIX	52
3.3.1	<i>Spontane WT1-spezifische CD4⁺ T-Zellen</i>	54
3.3.2	<i>Spontane CD8⁺ T-Zellen</i>	58
3.3.3	<i>Analyse des Aktivierungsmarkers CD137 auf CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺-T-Helfer-Zellen</i>	62
3.4	T _{REG} -FREQUENZEN IM PERIPHEREN BLUT VON PATIENTEN MIT HCC, LZ UND CH SOWIE DER GESUNDEN KONTROLLGRUPPE NACH STIMULATION MIT DEM WT1-PEPTIDMIX	64
3.4.1	<i>Analyse der T_{reg}-Frequenzen</i>	65
3.4.2	<i>Funktionelle Analyse der TGFβ-Sekretion von T_{regs}</i>	67
3.4.3	<i>Analyse der Expression des Aktivierungsmarkers CD137 auf T_{regs}</i>	69
3.5	KORRELATION ZWISCHEN DER ZYTOKIN-FREISETZUNG VON T _{REGS} UND CD8 ⁺ BZW. CD4 ⁺ T-ZELLEN	70
3.6	MDSCs BEI PATIENTEN MIT HCC, CHRONISCHER HEPATITIS UND LEBERZIRRHOSE	70
3.7	KORRELATION ZWISCHEN T _{REG} -FREQUENZEN UND MDSC-FREQUENZEN	73
3.8	ASSOZIATION ZWISCHEN IMMUNOLOGISCHEN HINTERGRUND UND KLINISCHEN DATEN	75
4	DISKUSSION	80
4.1	IMMUNSTIMULATORISCHE EIGENSCHAFTEN VON HCC-TUMORZELLINIEN	80
4.2	WT-1 SPEZIFISCHE T-ZELL-ANTWORTEN BEI PATIENTEN MIT HCC, CHRONISCHER HEPATITIS UND LEBERZIRRHOSE	81
4.3	POTENTIELL IMMUNSUPPRESSIVE MECHANISMEN BEI PATIENTEN MIT HCC, CHRONISCHER HEPATITIS UND LEBERZIRRHOSE	84
4.4	SCHLUSSFOLGERUNG	90
5	REFERENZEN	91
6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	102
7	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	104
8	LEBENS LAUF	105
9	DANKSAGUNG	107

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Erworbenes Immundefektsyndrom (engl: acquired immunodeficiency syndrome)
AFP	Alpha-Fetoprotein
AML	Akute myeloische Leukämie
APZ	Antigenpräsentierende Zelle (engl: antigen presenting cell)
Bcr-abl	Philadelphia-Chromosom, Fusionsgen bei der CML
BSA	Rinder-Serum Albumin (engl: bovine serum albumin)
CCR	Chemokin-Rezeptor
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CD	Differenzierungscluster (engl: Cluster of differentiation)
cDNA	komplementäre DNA (engl: complementary DNA)
CDK4	Cyclin-abhängige Kinase-4 (engl: cyclin-dependent kinase 4)
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt (engl: cytotoxic T-cell)
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated-molecule-4
DMEM	Dulbeccos modified Eagles medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl: desoxyribonucleic acid)
DZ	Dendritische Zelle
EBV	Eppstein-Barr-Virus
EDTA	ethylen-diamid-tetra-acid
ELISPOT	Enzyme-linked-Immunospot
et al.	<i>et alii</i> (Latein: « und Mitarbeiter »)
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluorescein-Isothiocyanate
FSC	Forward-Scatter
FOXP3	Forkhead-box-Protein P3
GAM	Goat-anti-Mouse
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GPC3	Tumorantigen Glypican 3
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
Her2/neu	Human epidermal growth factor Receptor 2
hTERT	humane Telomerase reverse Transkriptase
HERV	Humanes-endogenes-Retrovirus-Antigen
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HPV	Humanes Papillom Virus
HUH-7	human hepatoma cell line
ICC	Intrazelluläre Zytokinfärbung (engl: intracellular cytokine staining)
IE	Internationale Einheit
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin

IL	Interleukin
IMZ	unreife myeloische Zelle(engl: immature myelocytic cell)
IU	International Units
MAGE	Melanoma Antigen
MART-1	Melanoma Antigen recognized by T-cells
MDSC	Myeloid-Derived Suppressor Cell
Melan-A	Melanocyte antigen A
MEM	Minimales Essentielles Medium
ml	Milliliter
MHC	Major-histocompatibility-complex
MNC	Mononukleäre Zellen
mRNA	Messenger RNA
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen (engl: natural killer cell)
NY-ESO-1	Cancer-Testis Tumorantigen
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl: polymerase chain reaction)
PD-1	Programmed death-1
PE	R-phycoerythrin
PEI	perkutane Ethanol-Injektionstherapie
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein Complex
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RCC	Nierenzellkarzinom (engl: renal cell carcinoma)
RDA	repräsentativen Differenz-Analyse
RECIST	Response-Evaluation-Criteria-In-Solid-Tumors
RFTA	Radiofrequenzablation
RNA	Ribonukleinsäure (engl: ribonucleic acid)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SSC	side scatter
SEREX	Serological screening of cDNA expression libraries
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TACE	transarterielle Chemoembolisation
TAP	spezialisierte Transportmoleküle
TCR	T-Zell-Rezeptor (engl: T-cell receptor)
TGF	transforming growth factor
T _H 1	CD4 ⁺ T helper cell, producing type-1 cytokines
T _H 2	CD4 ⁺ T helper cell, producing type-2 cytokines
T _H 17	CD4 ⁺ T helper cell, producing IL-17
TIL	Tumor infiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumor necrosis factor
TRAIL	TNF related apoptosis-inducing ligand
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WT1	Wilms-Tumor-Protein-1

Abstract English

Introduction: Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the world's most common tumor malignancies with a worldwide occurrence of 3% in women and 6% in men. HCC is often diagnosed at an advanced stage and curative treatment options are limited. Therefore, immunotherapy approaches are currently proposed as a promising option for treatment and prevention of HCC. One attractive target antigen for HCC immunotherapy is the transcription factor Wilms' tumor gene product 1 (WT1). It is overexpressed in HCC and may play an important role in carcinogenesis and prognosis of HCC. We analyzed the spontaneous occurrence of WT1 specific T cells in patients with HCC, patients with chronic hepatitis B or C (CH), and patients with liver cirrhosis (LC).

Methods: Using flow cytometry we analyzed WT1 specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells, regulatory T cells (T_{regs}), and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in peripheral blood (PB) in 20 HCC patients, 20 CH patients, 23 LC patients, and in 9 healthy controls after stimulation with WT1-peptide mix.

Results: WT1 specific IFN γ ⁺CD8⁺ T cells were significantly elevated in patients with HCC (mean 0,74%), CH (mean 0,37%), and LC (mean 0,22%) in comparison to healthy controls (mean 0,15%), whereas no significant difference was observed between the disease groups. The frequency of WT1 specific IFN γ ⁺CD4⁺ T cells in HCC patients (mean 0,74%) was significantly higher than in CH patients (mean 0,21%) and healthy controls (mean 0,11%). For both WT1 specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells we could demonstrate a higher expression of the activation marker CD137 in HCC and LC compared to CH patients. Regarding the frequencies of CD25⁺CD127⁻ T_{regs} a significant difference was seen in patients with HCC, CH, and LC with elevated frequencies of CD25⁺CD127⁻ T_{regs} compared to healthy controls. In addition the frequencies of CD25⁺CD127⁻TGFbeta⁺ T_{regs} were also significantly elevated in patients with HCC and LC in comparison to healthy controls. Furthermore, we were able to demonstrate significantly elevated frequencies of MDSCs in HCC patients compared to those in patients with CH and LC, and healthy controls.

Conclusion: These results provide initial evidence for spontaneous T cell reactivity against WT1 in HCC patients and in patients with chronic liver disease. This data supports the immunogenicity of WT1 in HCC and its potential usefulness for HCC immunotherapy. However, the detection of enriched frequencies of T_{regs} and MDSCs

suggests the need for better understanding of immunosuppressive mechanisms and their specific consideration when developing immunotherapeutic approaches in HCC.

Abstrakt deutsch

Einleitung: Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist mit 6% bei Männern und 3% bei Frauen eine der weltweit häufigsten malignen Tumorerkrankungen. Die Diagnosestellung erfolgt häufig erst im fortgeschrittenen Stadium, so dass kurative Therapieoptionen sehr eingeschränkt sind. Immuntherapeutische Ansätze könnten deshalb viel versprechend sein und eine zusätzliche Behandlungsstrategie darstellen. Wilms-Tumor-Protein-1 (WT1) wird beim HCC überexprimiert und spielt bei der Karzinogenese des HCCs eine wichtige Rolle. Um zu evaluieren, ob sich WT1 als potentiell Antigen für immuntherapeutische Ansätze bei HCC-Patienten eignet, erfolgte in dieser Arbeit die vergleichende Analyse der T-Zell-spezifischen Immunität von HCC-Patienten sowie von Patienten mit chronischer Hepatitis B oder C (CH) und Patienten mit Leberzirrhose (LZ).

Methodik: Bei 21 Patienten mit HCC, bei 20 Patienten mit CH, bei 23 Patienten mit LZ und bei 9 gesunden Kontrollpersonen erfolgte nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix mittels Durchflußzytometrie die Analyse WT1-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus dem peripheren Blut. Weiterhin untersuchten wir durchflusszytometrisch bei den unterschiedlichen Patientengruppen T-regulatorische-Zellen (T_{regs}) und *myeloid derived suppressor cells* (MDSCs).

Ergebnisse: WT1-spezifische IFN γ ⁺CD8⁺ T-Zellen waren bei HCC-Patienten (Mittelwert 0,74%), CH-Patienten (Mittelwert 0,37%) und LZ-Patienten (Mittelwert 0,22%) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Mittelwert 0,15%) signifikant erhöht. Jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Krankheitsgruppen festgestellt werden. Die Frequenzen der WT1-spezifischen IFN γ ⁺CD4⁺ T-Zellen waren bei den HCC-Patienten (Mittelwert 0,74%) signifikant höher als bei den CH-Patienten (Mittelwert 0,21%) und der gesunden Kontrollgruppe (Mittelwert 0,11%). Bei Patienten mit HCC und LZ konnte eine erhöhte Expression des Aktivierungsmarker CD137 für WT1-spezifische IFN γ ⁺CD8⁺ und IFN γ ⁺CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zur CH-Patienten gezeigt werden.

In Hinblick auf regulatorische Immunzellen lagen nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix signifikant erhöhte Frequenzen der CD25⁺CD127⁻ T_{regs} im peripheren Blut der Patienten mit CH, LZ und HCC im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe vor. Weiterhin konnten erhöhte Frequenzen CD25⁺CD127⁻TGF β ⁺ T_{regs} bei HCC-Patienten

und LZ-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe detektiert werden. Zudem fanden sich signifikant erhöhte MDSC-Frequenzen bei HCC-Patienten im Vergleich zu den CH- und LZ-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe.

Schlussfolgerung: Zusammenfassend liefert diese Arbeit den Nachweis spontaner T-Zellen gegen das WT1-Antigen bei HCC-Patienten und bei Patienten mit chronischer Lebererkrankung. Im Hinblick auf mögliche immuntherapeutische Ansätze mit dem WT1-Antigen bei HCC-Patienten und bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen unterstreichen diese Ergebnisse die Rolle von WT1 als potentielle Targetstruktur. Von zentraler Bedeutung für die Entwicklung immuntherapeutischer Ansätze ist das bessere Verständnis der immunregulatorischen Mechanismen bei HCC-Patienten, um diese therapeutisch zu beeinflussen und immuntherapeutische Ansätze zu optimieren.

Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist mit 6% bei Männern und 3% bei Frauen eine der weltweit häufigsten malignen Tumorerkrankungen. Was die Inzidenz und das Erkrankungsalter angeht, bestehen starke epidemiologische Unterschiede, die sich v. a. aus den Risikofaktoren (z.B. chronische Hepatitis und Leberzirrhose) erklären. Normalerweise dauert es mehrere Dekaden bis sich ein HCC entwickelt und fast immer ist diese Entwicklung mit einer Leberzirrhose oder chronischen Hepatitis assoziiert. Die Diagnosestellung erfolgt häufig erst im fortgeschrittenen Stadium, so dass die Tumoren nicht mehr resektabel oder lokal zu therapieren sind und kurative Therapieoptionen sehr eingeschränkt sind. Die systemischen Therapieoptionen sind trotz der Fortschritte in den letzten Jahren weiterhin sehr limitiert.

Immuntherapeutische Ansätze könnten beim HCC viel versprechend sein und eine zusätzliche Behandlungsstrategie darstellen. Des Weiteren könnte die Immuntherapie unter Umständen bereits präventiv bei HCC-gefährdeten Risikogruppen, z.B. bei Patienten mit fortgeschrittener Leberzirrhose eingesetzt werden. Entartete Tumorzellen könnten dadurch frühzeitig vom Immunsystem erkannt und bekämpft werden. Um festzustellen, ob sich das Wilms-Tumor-Protein-1 (WT1) als potentiell geeignetes Antigen für immuntherapeutische Ansätze bei HCC-Patienten eignet, erfolgte in dieser Arbeit die vergleichende Analyse der T-Zell-spezifischen Immunität von HCC-Patienten sowie von Patienten mit chronischer Hepatitis B und/oder C (CH) oder Leberzirrhose (LZ).

Bei 21 Patienten mit HCC, bei 20 Patienten mit chronischer Hepatitis B oder C, bei 23 Patienten mit Leberzirrhose und bei gesunden Kontrollpersonen erfolgte nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix unter Verwendung von fluochrommarkierten-Antikörpern mittels Durchflußzytometrie die Analyse WT1-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus dem peripheren Blut.

Um zusätzlich eine Aussage über potentielle immunsuppressive Mechanismen bei den oben genannten Patienten treffen zu können, wurden ebenfalls T-regulatorische-Zellen (T_{regs}) und *myeloid derived suppressor cells* (MDSCs) aus dem peripheren Blut durchflußzytometrisch analysiert.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass im peripheren Blut von HCC-Patienten signifikant erhöhte Frequenzen von WT1-spezifischen Zytokin-freisetzenden CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe vorliegen. Des Weiteren zeigten sich

auch signifikant erhöhte WT1-spezifische CD8⁺ T-Zell-Frequenzen im peripheren Blut des LZ-Patientenkollektivs im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe.

Zusätzlich zeigte die Analyse der WT1-spezifischen Zytokin-freisetzenden CD4⁺ T-Zellen signifikant erhöhte Frequenzen im peripheren Blut zwischen HCC-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe sowie den CH-Patienten. Interessanterweise zeigten sich keine signifikant erhöhten Frequenzen der WT1-spezifischen Zytokin-freisetzenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zwischen den HCC- und den LZ-Patienten. Ebenso ergaben sich keine signifikant erhöhten Frequenzen der WT1-spezifischen Zytokin-freisetzenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zwischen den CH-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe. In Hinblick auf regulatorische Immunzellen lagen nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix signifikant erhöhte Frequenzen der CD25⁺CD127⁻ T_{regs} im peripheren Blut der Patienten mit CH, LZ und HCC im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe vor. Zudem konnten erhöhte Frequenzen der Zytokin-freisetzenden („Transforming growth factor“⁺ (TGFβ) CD25⁺CD127⁻ T_{regs} bei HCC-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe und zu den CH-Patienten gezeigt werden. Zusätzlich ergaben sich signifikant erhöhte Frequenzen der Zytokin-freisetzenden (TGFβ) CD25⁺CD127⁻ T_{regs} zwischen dem LZ-Patientenkollektiv und der gesunden Kontrollgruppe und den CH-Patienten.

Des Weiteren fanden sich signifikant erhöhte MDSC-Frequenzen bei HCC- Patienten im Vergleich zu den CH- und LZ-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe.

Zusammenfassend liefert diese Arbeit den Nachweis sowohl von erhöhten WT1-spezifischen CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen als auch von erhöhten T_{reg}- und MDSC-Frequenzen bei HCC-Patienten nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix. Einige dieser Veränderungen finden sich im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe auch bei LZ-Patienten, was für eine ähnliche immunologische Ausgangssituation bei Patienten mit HCC und LZ sprechen könnte. In Hinblick auf mögliche immuntherapeutische Ansätze mit dem WT1-Antigen bei HCC-Patienten unterstreichen diese Ergebnisse die Rolle von WT1 als potentielle Targetstruktur bei HCC-Patienten. Von zentraler Bedeutung für die Entwicklung immuntherapeutischer Ansätze ist das bessere Verständnis der immunregulatorischen Mechanismen bei HCC-Patienten, um diese therapeutisch zu beeinflussen und immuntherapeutische Ansätze zu optimieren.

1 Einleitung

1.1 HCC

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren des HCCs

Das HCC steht weltweit an fünfter Stelle der häufigsten malignen Tumorerkrankungen und hat nach Diagnosestellung eine sehr schlechte Prognose mit einer 5-Jahresüberlebensrate von weniger als 5%. Bezüglich der Inzidenz und des Erkrankungsalters, bestehen starke epidemiologische Unterschiede, die sich aus den Risikofaktoren erklären. In Westeuropa liegt das durchschnittliche Erkrankungsalter bei 70-75 Jahren und das männliche Geschlecht ist 2- bis 4-mal häufiger betroffen [1].

Man teilt die Risikofaktoren in eine Haupt- und Nebenfaktorengruppe ein (siehe Abbildung 1) [2]. Jedoch ist anzunehmen, dass das HCC sich in 60-90% der Fälle auf dem Boden einer chronischen Hepatopathie mit Ausbildung einer Leberzirrhose entwickelt [1].

Als Risikofaktoren sind zum einen die chronische Hepatitis B, C und D zu nennen, die sich aus einer akuten Infektion mit Hepatitis-Viren entwickeln können und die im Mittelpunkt von präventiven Impfprogrammen stehen [3]. In dem 1984 in Taiwan gestarteten Impfprogramm bei Kindern gegen das HBV konnte gezeigt werden, dass durch die Prävention einer Impfung die Rate der chronischen Infektionen gesenkt werden konnte und dadurch auch das Auftreten vom HCC [4].

Ein weiterer Risikofaktor ist die Leberzirrhose, welche in Westeuropa meistens durch Alkoholabusus bedingt ist [5, 6]. Des Weiteren steigt auch die Tendenz ein HCC aufgrund einer NASH (nichtalkoholische Steatohepatitis) zu entwickeln [7, 8]. Bei Vorhandensein einer Leberzirrhose beträgt das jährliche Risiko ein HCC zu entwickeln 1-2% [9]. Bei gleichzeitiger Erkrankung einer Leberzirrhose und einer chronischen Hepatitis B und/oder C steigt das HCC-Risiko zusätzlich an [10, 11].

Risikofaktor	Details
Hauptfaktoren	
Hepatitis-B-Virus	DNA-Virus führt zu chronischer Hepatitis und Zirrhose
Hepatitis-C-Virus	RNA-Virus führt zu chronischer Hepatitis und Zirrhose
Aflatoxine	DNA-reaktive Karzinogenese und Zytotoxine
Alkohol	Führt zu alkoholtoxischer Zirrhose
Hämochromatose	Eisenspeicherkrankheit führt zu Zirrhose
Nebenfaktoren	
Rauchen	Verursacht DNA Schäden und Zellproliferation
Verschmutztes Wasser	Algentoxine begünstigen Zellproliferation
Orale Kontrazeptiva	begünstigen Zellproliferation
Androgene	begünstigen Zellproliferation

Abbildung 1: Risikofaktoren für das HCC adaptiert aus Kensler et al.[2]

1.1.2 Pathogenese und klinische Manifestation des HCCs

Normalerweise dauert es mehrere Dekaden bis sich ein HCC entwickelt und fast immer ist es mit chronischer Leberzirrhose oder chronischer Hepatitis assoziiert, wobei Patienten mit Leberzirrhose das höchste Risiko haben an einem HCC zu erkranken [5]. Meist ist das HCC genetisch heterogen und weist ausgeprägte chromosomale Aberrationen auf. Dies lässt sich durch die chronische Entzündung bzw. durch die Ausbildung der Zirrhose und die dadurch auftretenden DNS-Schäden erklären [11, 12] (siehe auch Abbildung 2).

Ein möglicher Grund der Ausbildung eines HCCs könnte die Methylierung von Tumorsuppressor-Genen, wie z. B. FHIT, zu einem frühen Zeitpunkt in der hepatokarzinogenese des HCCs sein [13].

Die klinischen Symptome des HCCs sind sehr unspezifisch. Meistens stehen die Symptome der Leberzirrhose im Vordergrund, dazu können Zeichen im Sinne einer so genannten B-Symptomatik kommen, wie z. B. Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Gewichtsverlust, subfebrile Temperaturen. Eine Diagnosestellung erfolgt deshalb häufig erst im fortgeschrittenen Stadium, so dass die Tumoren nicht mehr resektabel oder lokal zu therapieren sind [1]. Die Metastasierung des HCCs ist selten und falls das HCC Metastasen ausbildet meistens in der Reihenfolge Lunge und Knochen [1].

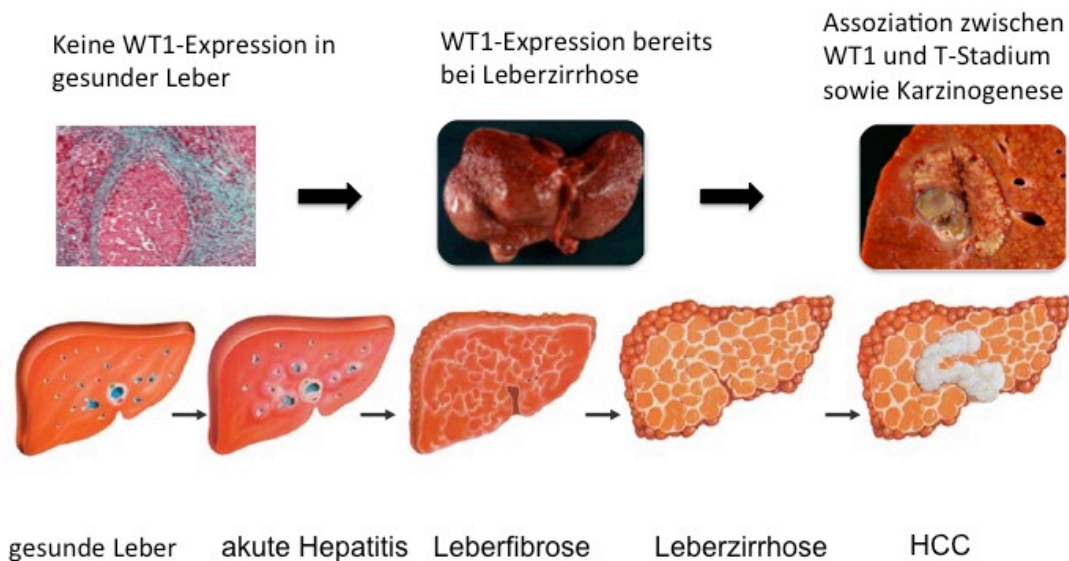


Abbildung 2: Entwicklung eines HCCs aus einer chronischen Hepatopathie: Meistens entwickelt sich ein HCC auf dem Boden einer Leberzirrhose, welche durch eine chronische Lebererkrankung, wie beispielweise eine chronische Hepatitis B oder C oder eine alkoholtoxische Leberschädigung, verursacht ist. Bereits bei den Vorstadien des HCCs wird WT1 überexprimiert [14] und weiterhin scheint eine Assoziation zwischen WT1 und dem Tumorstadium des HCCs und der Karzinogenese zu bestehen [15]. Adaptiert aus Firouzeh et al. Immune responses in Hepatocellular Carcinoma [16].

1.1.3 Diagnose und Therapieoptionen des HCCs

Die Diagnose des HCCs erfolgt über bildgebene Verfahren, wie beispielsweise MRT, CT oder Kontrastmittel-Sonografie. Außerdem wird der Tumormarker Alpha-Fetoprotein (AFP) im Blutserum bestimmt, da AFP beim HCC erhöht ist [12]. Jedoch kann man AFP nicht zu Screening-Untersuchungen verwenden, denn zum einen steigt der AFP-Wert im Serum auch bei chronischer Hepatitis B oder C an, zum anderen ist der AFP-Wert bei 80% der kleinen HCCs nicht erhöht. Die Sensitivität liegt zwischen 39-64%, die Spezifität bei 76-91%. Man kann davon ausgehen, dass stark erhöhte AFP-Werte (> 400ng/mL) für ein HCC sprechen [17].

Zu den Therapiestrategien unter potentiell kurativer Zielsetzung gehören unter anderem Tumorresektion, Lebertransplantation und perkutane Ablation des Tumors [18]. Es stehen unterschiedliche perkutane Verfahren zur Verfügung. Zum einen gibt es die Transarterielle Chemoembolisation (TACE). Sie stellt ein minimal-invasives Verfahren zur Behandlung des inoperablen HCCs dar. Diese Behandlung kombiniert die Gabe von einem Chemotherapeutikum mit gleichzeitiger gezielter Embolisation von Arterien mittels kleiner Teilchen [19]. Weitere perkutane Verfahren sind z. B.: chemische Verfahren wie die perkutane Ethanol-Injektionstherapie (PEI) [19]. Hierbei wird 95%iger

Alkohol in den Leberherd unter Ultraschall-Kontrolle injiziert, wodurch es zur lokalen Nekrose des Gewebes kommt [20]. Es gibt auch thermische Verfahren wie beispielsweise die Radiofrequenzablation (RFTA). Hierbei wird ein Applikator in den Leberherd eingebracht. Durch die Wärmeentwicklung des Hochfrequenzstroms wird eine Thermonekrose des Gewebes erzeugt [21]. Welche Therapie wann zum Einsatz kommt hängt von der Tumorgroße, vom Zustand des Patienten bzw. der Restfunktion der Leber und dem Vorliegen von intrahepatischen Metastasen ab [1, 19].

Als palliatives Therapiekonzept steht der Tyrosinkinase-Inhibitor Sorafenib zur Verfügung, welcher zum einen über die RAF-Kinase die Proliferation der Tumorzellen und zum anderen über den Vascular Endothelial Growth Factor(VEGF)-Rezeptor die Angiogenese des Tumors hemmt [22]. In der SHARP-Studie zeigte sich, dass der Einsatz von Sorafenib sicher und effektiv beim fortgeschrittenen HCC ist [23, 24]. Weitere systemische Therapiemöglichkeiten sind trotz Fortschritten in den letzten Jahren bei der Mehrzahl der Patienten weiterhin sehr limitiert [18].

Eine Erklärung des Versagens der systemischen Therapieansätze könnten zum einen die zahlreichen Ko-Morbiditäten der Patienten mit Leberzirrhose sein. Zum anderen spielt die Chemotherapie-Resistenz aufgrund der bestehenden Nekrose beim HCC und die meistens weit fortgeschrittene Erkrankung des Patienten eine Rolle [25]. In einer Studie mit 69 Leber-transplantierten Patienten, die über einen Zeitraum von 1985 bis 2001 beobachtet worden sind, konnten Unit et al. zeigen, dass eine reduzierte Lymphozyteninfiltration des resezierten Tumors der Leber das Wiederauftreten des Tumors begünstigt [26]. Einen möglichen, viel versprechenden Ansatz für das HCC, sowohl in der therapeutischen, als auch potentiell in der prophylaktischen Situation, könnte daher die Immuntherapie darstellen [27]. Die meisten immuntherapeutischen Ansätze basieren heute auf Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, welche entweder durch adoptiven Transfer von *ex vivo* aktivierten zytotoxischen Killerzellen [28] oder durch *in vivo* Aktivierung von T-Zellen entstehen. Hierbei werden zu einem als unspezifischer Ansatz Immunstimulantien benutzt, wie die Zytokine Interferon (IFN) α , IFN β , IFN γ , IL-2 oder Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF). Als spezifische Variante zur Generierung einer spezifischen Immunantwort steht der Einsatz von Zelllysaten oder Tumorzellen zur Verfügung, die zunächst von dendritischen Zellen (DZ) prozessiert werden müssen, um eine T-Zell-Antwort auszulösen. Eine weitere Möglichkeit stellt die Nutzung von Tumor-assoziierten

Antigenen (TAAs) bzw. spezifische Peptide dar, welche als Vakzine eingesetzt werden. Die Peptide binden an MHC-Klasse-I-Moleküle von Antigen-präsentierenden-Zellen (APZ) und führen so zu einer Stimulation einer spezifischen T-Zell-Antwort. Eine weitere Strategie ist der Einsatz von DZ [29] aus dem peripheren Blut, welche *ex vivo* mit Tumorlysaten beladen werden und nach Prozessierung Tumorantigene an der Oberfläche präsentieren und dem Patienten zurückgegeben werden können (siehe Abbildung 3) [30, 31].

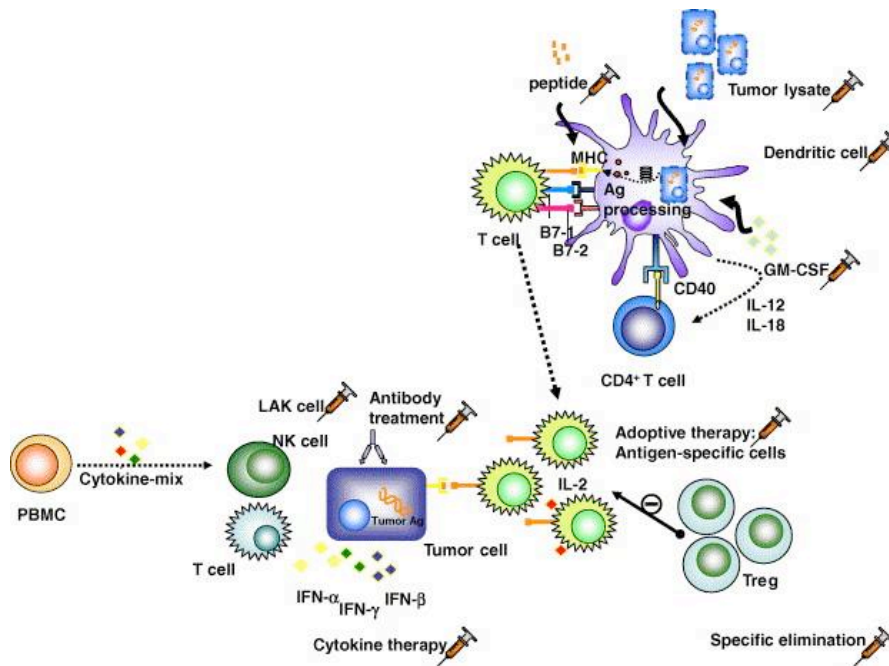


Abbildung 3: Immuntherapeutische Ansätze gegen Tumorzellen. Tumorzellen können durch verschiedene Effektormechanismen angegriffen werden. Lymphokin-aktivierte Killerzellen können aus dem peripheren Blut generiert werden und direkt dazu verwendet werden, um Tumoren zu behandeln. Alternativ kann eine systemische Zytokin-Behandlung durchgeführt werden. Tumor-spezifische Effektoren bestehen entweder aus humoralen Reaktionen (Antikörper) oder zellulären Antworten, wie beispielsweise zytotoxischen CD8⁺T-Zellen. Tumor-spezifische T-Zellen können *in vitro* erzeugt und den Patienten verabreicht werden (adoptive T-Zell-Therapie). Reife DZ exprimieren kostimulatorische Moleküle, wie B7-1 und B7-2, die die T-Zell-Aktivierung verbessern. DZ sezernieren IL-12 und IL-18 zur Förderung der T-Helferzellen CD4⁺T-Zell-Antworten und CD8⁺T-Zellen. Aktivierte CD4⁺T-Zellen exprimieren CD40-Liganden, die die DZ-Reifung durch CD40-Signalisierung stimulieren. DZ werden direkt intratumoral, intravenös oder subkutan beladen und mit dem entsprechenden Tumorantigen injiziert. Dies kann *in vitro* oder *in vivo* durch Injektion von Peptiden oder Tumorlysaten erreicht werden. Schließlich kann auch die Beseitigung von T_{regs} zu einer erhöhten Immunantwort *in vivo* führen. Adaptiert aus Greten T.F. et al. [30]

1.2 Immunsystem und Tumoren

Die Grundlage für die Entwicklung der Tumor-Immunologie war 1863 Rudolf Virchows These, welche eine enge Verbindung zwischen entzündlichen Reaktionen und der Entwicklung von Tumoren beschrieb [32]. Anschließend postulierte Paul Ehrlich bereits Anfang des 20. Jahrhunderts, dass das Immunsystem eine entscheidende Rolle bei der

Bekämpfung von Tumorzellen im Körper spielt [33]. Burnet und Thomas sprachen sich später für ein Modell aus, welches erläuterte, dass das Immunsystem Tumorzellen, die beispielsweise durch genetische Aberrationen verändert sind, erkennt und bekämpft. Ein trotzdem auftretender Tumor wäre demnach auf eine Störung des Immunsystems zurückzuführen [34-36]. Sie nannten dieses Modell *Immunosurveillance*. Heutzutage wird diese These sowohl in einigen Tumor-Mausmodellen [37-39] als auch durch den Aspekt unterstützt, dass bei Patienten mit geringer Immunabwehr, beispielsweise bei *Human Immunodeficiency Virus* (HIV)-infizierten Patienten oder bei Patienten unter Immunsuppression, die Erkrankungsrate an Kaposi-Sarkom, Zervixkarzinom oder Lymphom-Erkrankungen erhöht sind [40, 41]. Außerdem konnten auch schon bei zahlreichen Tumorkranken tumorspezifische T-Zell-Antworten nachgewiesen werden [42].

Des Weiteren gibt es das Konzept der Immunstimulation, welches auch schon von Rudolf Virchow vor 150 Jahren beschrieben worden ist. Dieses Konzept basiert darauf, dass tumorinduzierte Entzündungsprozesse bzw. Immunreaktionen Tumorzellwachstum unterhalten bzw. stimulieren können [32, 43].

Unter Berücksichtigung beider Konzepte der *Immunosurveillance* und der Immunstimulation prägte sich der Begriff des *Tumorediting*. Es handelt sich hierbei um einen Prozess, der die Interaktion der Tumorzellen und des Immunsystems beschreibt. Dunn et al. bezeichnen das *Tumorediting* als einen Prozess der drei „E“s. Hierbei handelt es sich um *Elimination* (Ausschaltung), *Equilibrium* (Gleichgewicht) und *Escape* (Entkommen) (siehe Abbildung 4) [37].

Nach Transformation einer Zelle setzt diese neue Tumorzelle tumorspezifische Signale frei, welche eine erste proinflammatorische Reaktion hervorrufen. Idealerweise wird diese Reaktion sowohl durch das angeborene als auch durch das adaptive Immunsystem erkannt und die transformierte(n) Zelle(n) zerstört. Somit wird einer Tumorbildung entgegen gewirkt (Stadium der Ausschaltung) [37]. Falls das Immunsystem dieses jedoch nicht schafft, gehen die Tumorzellen in die Gleichgewichtsphase über. Diese ist wie eine Auslesephase, in der neue veränderte Tumorzellen, die der chronischen Immunreaktion entgehen, sich weiter vermehren können. Diese veränderten Tumorzellen vermehren sich weiter und bilden somit einen klinisch erkennbaren Tumor, der durch Immunresistenzmechanismen für das Immunsystem nicht angreifbar ist (Stadium des Entkommens) [37]. Es gibt zahlreiche

Mechanismen wie ein Tumor der Immunantwort entkommen kann. Allerdings lassen sich die allermeisten *Tumor-Escape*-Mechanismen in der Regel einer von fünf Gruppen zuordnen:

Als erstes wäre eine Verschlechterung der Antigenpräsentation zu nennen. Dieser Effekt kann durch geringere Dichten oder Mutationen von *Major-histocompatibility-complex*(MHC)-Klasse-I-Molekülen bzw. Antigenen auf Tumorzellen hervorgerufen werden, was in der Folge zu einer verschlechterten Erkennung durch das Immunsystem führt [44-46].

Einen zweiten Mechanismus stellen immunsuppressive Faktoren, wie Zytokine oder Prostaglandine, dar, die von Tumorzellen oder regulatorischen Zellen des Immunsystems freigesetzt werden und direkt eine initiierte Immunreaktion hemmen [47].

Als drittes Phänomen kann die Toleranzentwicklung durch Verminderung einer Immunreaktion durch T_{regs} oder durch Zerstörung von T-Zellen entstehen. Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass Tumorpatienten verschiedener Entitäten mit einer hohen Infiltration des Tumors von T_{regs} ein schlechteres Überleben als Patienten ohne Nachweis von T_{regs} haben [48].

Viertens ist zu nennen, dass durch Regulierung von anti-apoptotischen und pro-apoptotischen Molekülen die Tumorzellen vermehrt resistent gegenüber Apoptose werden [49].

Des Weiteren wird eine Gegenangriffs-Strategie des Tumors postuliert, bei der Tumorzellen den Fas-Liganden exprimieren, der bei angreifenden Zellen den Zelltod verursachen kann [39].

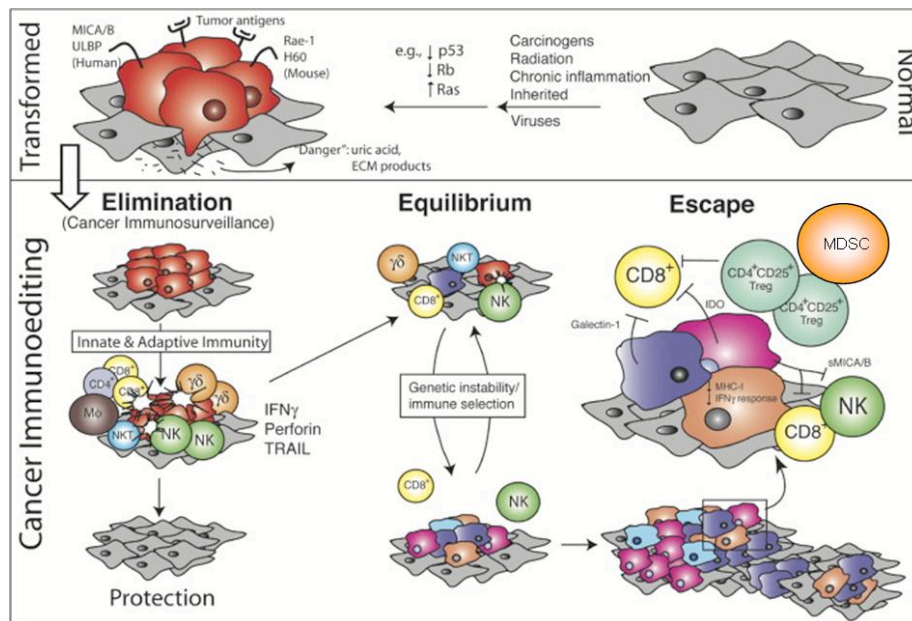


Abbildung 4: Drei Phasen eines Tumor *Immunoediting*: Graue Zellen sind normale Zellen und rote Zellen sind Tumorzellen. In der unteren Reihe werden die drei Phasen und die Signalwege des *Immunoediting* dargestellt. Adaptiert aus Dunn GP et al. [37]

Nach diesem Konzept ist das Immunsystem initial in der Lage Tumorzellen erfolgreich zu erkennen und dementsprechend zu zerstören. Eine Tumorbildung kann aufgrund des oben genannten *Tumor-escape*- Mechanismen entstehen.

Dennoch geben Blankenstein et al. zu bedenken, dass spontan gebildete Tumoren ohne viralen Hintergrund zwar vom Immunsystem erkannt werden, die Immunzellen jedoch nicht in der Lage sind die Tumorzellen vollständig zu eliminieren. Ihrer Ansicht nach ist dies nicht durch *Immunosurveillance* zu erklären, sondern dadurch, dass der Tumor aufgrund seines langsamen Wachstums keine ausreichende Immunität des Immunsystems aufbaut [50, 51].

In der Arbeit *hallmarks of cancer* versuchen Hanahan et al. und Weinberg et al. Mechanismen zu erläutern, welche eine Erklärung dafür geben könnten, wie es in mehreren Schritten zur Bildung von Neoplasien im Menschen kommt [52]. In der Fassung aus dem Jahre 2000 werden noch 6 Fähigkeiten von Zellen beschrieben, die eine Erklärung für die Tumorbildung abgeben könnten. Dazu gehören vereinfacht dargestellt folgende Mechanismen von Zellen: Signale zur Proliferation und Wachstum, Resistenzmechanismen gegen den Zelltod, Umgehung von wachstumshemmenden Vorgängen in der Zelle, Aktivierung und Metastasierung von Zellen, vermehrte Angiogenese, Mechanismen zur Verhinderung von Apoptose [52].

Im Jahre 2011 beschreiben Hanahan et al. und Weinberg et al. noch zwei weitere Begriffe in den *hallmarks of cancer - the next generation*: Zum einen sind das Mechanismen von Tumorzellen unterschiedlicher Entitäten einer Immunantwort zu entkommen und zum anderen ist es die Änderung des Zellmetabolismus zur Verbesserung der Proliferation von Zellen. Hanahan et al. und Weinberg et al. charakterisieren diese beiden Erklärungen als neu entstehende Begriffe, welche noch nicht völlig validiert sind. Weiterhin beschreiben sie einen weiteren Unterpunkt, das *tumor microenvironment*, welches immer mehr in den Fokus von neuen Forschungsansätzen genommen wird und werden sollte, um die Tumorentstehung besser zu verstehen [52].

Aus diesen unterschiedlichen Gesichtspunkten, die schon mit Rudolf Virchows These von 1863 begannen, ist zu ersehen, dass die unterschiedlichen Tumor-Entitäten und deren komplexe und variablen Interaktionen mit dem Immunsystem weiterhin genauerer Analysen bedürfen. Außerdem bieten diese Gesichtspunkte viel versprechende Ansatzpunkte für immuntherapeutische Ansätze sowohl für die Erforschung und als auch bei der Bekämpfung von Tumorerkrankungen.

1.3 Tumorantigene

Die Identifizierung von Tumorantigenen stellt eine weitere Grundlage immuntherapeutischer Strategien dar. Als Tumorantigene bezeichnet man Antigene, die von Krebszellen exprimiert werden. Durch diese Eigenschaft stellen sie potentielle Zielstrukturen für immuntherapeutische Ansätze in der Behandlung von Krebserkrankungen dar, außerdem werden einige als Tumormarker in der Diagnostik von Krebserkrankungen benutzt [53]. Sie werden durch MHC-Klasse-I- oder MHC-Klasse-II-Moleküle an der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert und können somit ein Angriffsziel für zytotoxische T-Zellen [54], T-Helfer-Zellen [55] und Antikörper darstellen. Tumorantigene können sich sowohl als Tumor-spezifische Antigene als auch als TAAs präsentieren. Der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen ist, dass die Tumor-spezifischen Antigene ausschließlich auf Tumorzellen exprimiert werden und die TAAs auf Tumorzellen stark überexprimiert werden, sich jedoch auch auf normalen Gewebezellen finden lassen [56].

Boon et al. charakterisierte 1992 die ersten Tumorantigene mittels ZTL-Klonen und *cDNA*-transfizierten COS-Zellen [57, 58]. Inzwischen gelang durch die Etablierung neuer Technologien die Identifizierung von zahlreichen neuen TAAs. Hierzu zählen die Weiterentwicklung von *cDNA*-Expressionssystemen durch den Einsatz von Retroviren und autologen Fibroblasten [55], die SEREX-Technik (= *serological screening of cDNA expression library*) [59] sowie biochemische Ansätze mittels Peptid-Elution und anschließender Massenspektrometrie [60]. Außerdem ist die *reverse Immunology* zu nennen, die zahlreiche TAAs identifizierte. Mit Hilfe von neuen Software Programmen wie BIMAS und SYFPEITHI werden von bereits bekannten Tumorantigenen, für die keine spontanen T-Zell-Antworten nachgewiesen werden konnten, Epitop Vorhersagen gemacht. Die Kandidaten-Peptid-Sequenzen für einen bestimmten Humanes-Leukozyten-Antigen(HLA)-Typ werden dann synthetisiert und Peptide, die sich erfolgreich an HLA-Moleküle binden, werden von APZs präsentiert und auf die Induktion einer zytolytischen Reaktion bei zytotoxischen T-Zellen getestet [56]. Diese Strategie wird auch bei der Herstellung einer *cDNA library* mittels einer repräsentativen Differenz-Analyse (RDA) angewandt [61]. Zusätzlich führten vergleichende Proteasom-Analysen und Gen-Expressions-Analysen zur Identifizierung neuer Tumorantigene [56].

Trotz individueller Unterschiede von Patienten und der Heterogenität von Tumoren, die aus den genetischen Veränderungen während der Tumorentstehung hervorgehen, ist es möglich eine generelle Aussage bzw. Einteilung von Tumorantigenen zu treffen.

Unter den Tumorantigenen unterscheidet man fünf große Gruppen.

Zur ersten Gruppe gehören die Cancer/Testis-Antigene MAGE, BAGE, GAGE, RAGE, NY-ESO-1[62-64]. Diese sind auf unterschiedlichen Tumorgewebe wie dem Melanom, Brust-, Lungen- oder Leberzellkrebs [65] zu finden. Eine Ausnahme bildet das Gewebe des Testis. [56, 62]. Einige Autoren zählen außerdem die Muzine zu dieser Gruppe, die man vor allem als Oberflächenproteine auf Mamma-, Ovarial- und Pankreaskarzinomen findet [62].

Die zweite Gruppe wird von den gewebespezifischen Differenzierungs-Antigenen gebildet. Diese werden von Genen wie *Tyrosinase*, *Melan-A/Mart-1*, *gp100* codiert, die beim Melanom als auch auf normalen Melanozyten exprimiert sind [66]. Zu dieser Gruppe gehört auch das Karzinomembryonale Antigen (CEA) bei kolorektalen

Tumoren, das Prostata-spezifische Antigen (PSA) beim Prostata-Karzinom oder das AFP beim Leberzellkarzinom [67].

Zur dritten Gruppe gehören die Antigene, welche zwar auf gesunden Geweben exprimiert, jedoch ausschließlich auf Tumorzellen überexprimiert werden, wie zum Beispiel Her-2/neu [68], p53 oder PRAME sowie der Transkriptionsfaktor WT-1 [69]. Transkriptionsfaktoren sind interessante Zielstrukturen für immuntherapeutische Ansätze aufgrund ihrer funktionellen Relevanz für die Tumorzellen. Ein Großteil von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen kodiert für Transkriptionsfaktoren. Deregulierte Expression oder Aktivierung sowie Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren spielen eine kritische Rolle für die Tumorgenese.

Die vierte Gruppe beinhaltet die viralen Antigene, wie beispielsweise das Humane-Papilloma-Virus (HPV)-16 bei Zervix-Karzinomen [70] oder das Epstein-Barr-Virus (EBV) beim endemischen Burkitt-Lymphom [71]. Bei Leukämiepatienten wurde das humane-endogene-Retrovirus-Antigen (HERV-K10) identifiziert [72]. Zudem sind das Hepatitis B (HBV) und Hepatitis C Virus (HCV) von großer Relevanz für die Entstehung von Leberzellkarzinomen [73].

Zur letzten und fünften Gruppe gehören Tumor-spezifische Antigene, welche durch Punktmutationen, Deletionen oder Translokationen von Genen entstehen. Somit können aus einem zuvor immuntoleranten Protein durch die veränderte Aminosäuresequenz neue antigene Epitope generiert werden [74]. Dadurch ist diese Gruppe der Tumorantigene im Gegensatz zu den vorher genannten Gruppen individuenspezifisch und kann z. T. somit nur schwer für immuntherapeutische Ansätze einer größeren Patientengruppe eingesetzt werden. Man konnte bereits bei unterschiedlichen Individuen Antigene dieser Gruppe finden. Hierunter sind zu nennen: CDK4, MUM-1, bcr-abl als Beispiel für ein durch Translokation hoch immungenes Fusionsprotein [75-77], p53 [78], ras-Onkogen [79], β -Catenin, CASP-8 [66, 80]. Außerdem konnte man nachweisen das sowohl Splice-Varianten, neue offene Leserahmen, Pseudogene als auch Antisense-Strangprodukte der DNA-Zielstrukturen für das Immunsystem darstellen können [81, 82].

1.3.1 Tumorantigene und Tumor-Escape-Phänomene beim HCC

In den vergangenen Jahren konnte die Expression verschiedener TAAs beim HCC nachgewiesen werden. Dazu zählen neben den Cancer-Testis-Antigenen MAGE-1, SSX-1, SSX-2, SSX-4, SSX-5, SCP-1 CTp11, HCA587, TSPY, NY-ESO1, Transgelin 2, p53 [83], das onkofetale Antigen AFP als Selbstantigen [84], Multidrug-resistance-associated-Protein-3 (MRP3) [85] und der Transkriptionsfaktor WT1 [15]. Ein Teil dieser Antigene eignet sich möglicherweise auch als Biomarker für die Diagnostik des HCCs [86].

Beim HCC gibt es vereinzelte zum Teil sehr widersprüchliche Berichte über *Tumor-Escape*-Phänomene. Eine Arbeitsgruppe berichtet über eine reduzierte Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen, sowie der ko-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf 28 HCC-Gewebeproben im Vergleich zu normalem Lebergewebe [87]. Eine andere Arbeitsgruppe konnte wiederum eine starke Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen auf der Mehrheit von 30 HCC-Geweben nachweisen, ebenso wie eine intakte spezialisierte Transportmolekül-(TAP)-Expression [88]. Daneben gibt es Berichte, dass AFP-Dysfunktion und Apoptose von APZ induziert und somit einen *Immun-Escape* beim HCC ermöglichen [89].

1.4 Einteilung der T-Zellen

In vereinfachter Weise kann angenommen werden, dass im Knochenmark die lymphatischen Vorläuferzellen in unterschiedlichen Entwicklungsschritten aus lymphopoetischen Stammzellen entstehen. Aus diesen lymphatischen Vorläuferzellen entstehen im Thymus durch Ausbildung von MHC-Molekülen an der Zelloberfläche naive $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen. Diese naiven $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen wandern über das Blutssystem aus dem Thymus aus und zu den sekundären Lymphorganen (Milz, Lymphknoten). Hier entstehen dann nach Antigenkontakt und unter dem Einfluss von Zytokinen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, welche dann in weiteren Reifungsprozessen ihre unterschiedliche Funktion und Produktion von Zytokinen im Immunsystem einnehmen (siehe Abbildung 5).

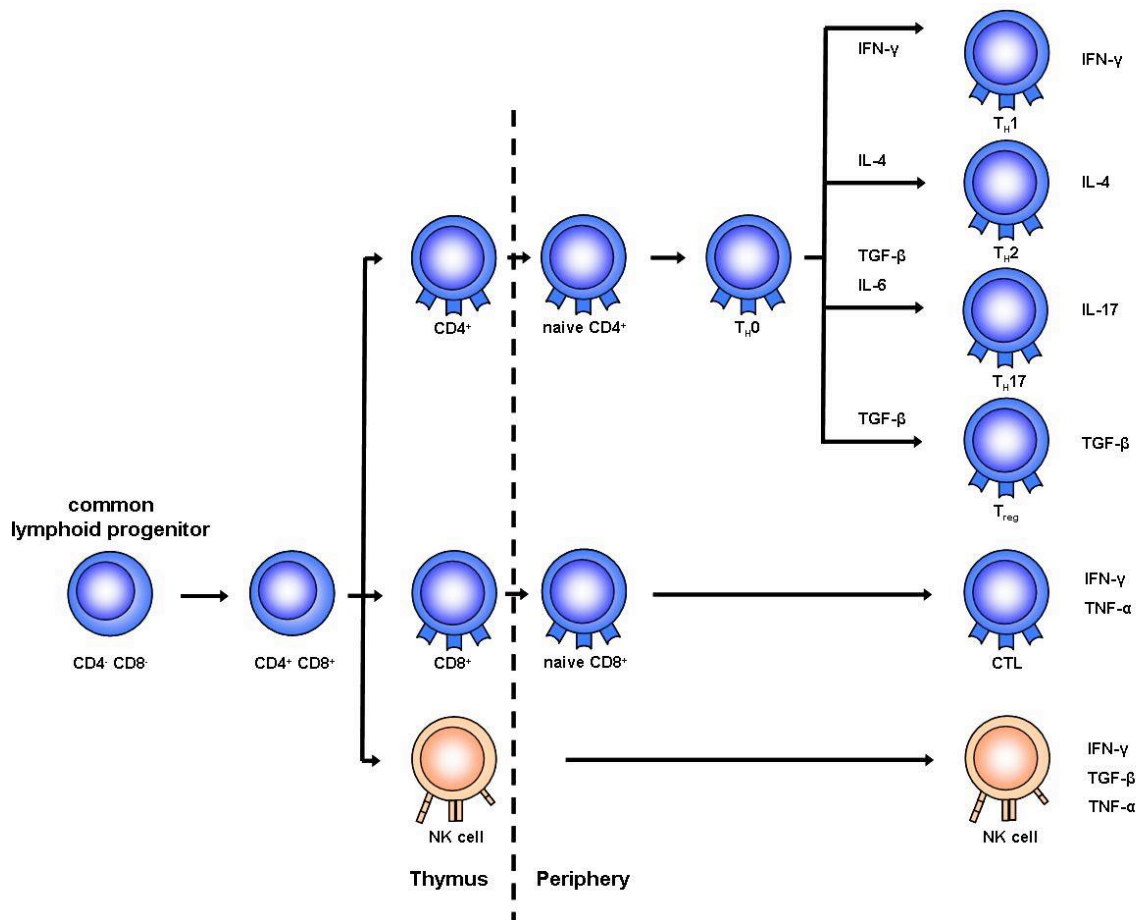


Abbildung 5: Entstehung und Funktion der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Die lymphatische Vorläuferzelle wandert aus dem Knochenmark in den Thymus. Dort werden die MHC-Moleküle ausgebildet und somit differenzieren sich die lymphatischen Vorläuferzellen jeweils in naive CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK). Nach Auswanderung in das periphere Blut zu den sekundären Lymphorganen (Milz, Lymphknoten) und nach Antigenkontakt werden aus den naiven CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen unter dem Einfluss unterschiedlicher Zytokine und Reifungsprozesse ausgereifte CD4⁺ T-Zellen (T_{H1}, T_{H2}, T_{H17}, und T_{regs}) bzw. CD8⁺ T-Zellen, welche dann ihre Funktion im Immunsystem einnehmen. Dies ist eine vereinfachte Darstellung des Ausreifungsprozesses von T-Zellen.

1.4.1 Zytotoxische T-Zellen

Damit es zu einer Immunantwort kommen kann, muss das Immunsystem aktiviert werden. CD8⁺ T-Zellen, welche die dominanten Zellen bei der Tumorbekämpfung darstellen, erkennen 8-11 Aminosäuren lange Peptide, die von MHC-Klasse-I-Komplexen auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Hierbei spielt der T-Zell-Rezeptor (TCR) eine zentrale Rolle, der spezifisch antigene Epitope auf MHC-Klasse-I-Komplexen bindet. Antigene Strukturen können entweder aus Proteinen im Zytoplasma der Zellen resultieren, die in den TAP in Peptidfragmente zerschnitten und in das Endoplasmatische Retikulum transportiert und dort verbinden sie sich mit für sie spezifischen MHC-Molekülen. Anschließend wird dieser Komplex an die Zelloberfläche transportiert. Alternativ können kurze Peptidfragmente direkt an MHC-Klasse-I-Moleküle

auf der Oberfläche von Zellen binden und von CD8⁺ T-Zellen erkannt werden. Zusätzlich sind für die optimale Aktivierung von T-Zellen ko-stimulatorische Signale wie CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2), die an CD28 und zytotoxische-T-Lymphozyten-assoziierte-Antigen (CTLA-4) auf T-Zellen binden, sowie bestimmte Zytokine wie z.B. IL-2, IL-7, IL12 notwendig [30, 31]. Die Verbindung zwischen TCR und dem MHC-Klasse-I-Epitop-Komplex führt bei den anzugreifenden Zielzellen meistens über zwei Mechanismen zum Zelltod:

- 1) durch zytotoxische Granula, veränderte Lysosomen, deren Inhalt aus zytotoxischen Effektor-Proteinen besteht, wie Perforin, Granzyme-B und Granulysin, die proapoptotische Signalwege in die Zielzelle freisetzen.
- 2) durch die Aktivierung von Apoptose-Rezeptoren, wie FasR und TRAIL (Tumor necrosis factor (TNF) related apoptosis-inducing ligand), die proapoptotische Signalkaskaden induzieren [90].

Zudem spielt die IFN γ -Freisetzung von CD8⁺ T-Zellen eine essentielle Rolle bei der immunologischen Zerstörung von Tumorzellen [91].

CD4⁺ T-Zellen erkennen 10-15 lange Aminosäuren Peptide, die auf MHC-Klasse-II-Molekülen von beispielsweise DZ präsentiert werden und nehmen ihrerseits auf die Anti-Tumor-Antwort des Immunsystems Einfluss, indem sie beispielsweise CD8⁺ T-Zellen aktivieren [92].

1.4.2 Regulatorische T-Zellen (T_{reg})

T_{regs} spielen in vielen Bereichen der Immunologie, wie zum Beispiel bei der Immuntherapie, aber auch bei der immunologischen Selbst-Toleranz und bei der Transplantation von Organen eine entscheidende Rolle [93, 94]. T_{regs} leiten sich aus einer CD4⁺ Subpopulation ab, jedoch gibt es auch Nachweise von CD8⁺ T-Zellen, welche regulatorische Funktionen haben [95, 96]. T_{regs} werden mit den Oberflächenmarkern CD25⁺CD127^{dim} oder CD25⁺Forkhead-box-ProteinP3 (FoxP3⁺) charakterisiert und durch diese von den anderen T-Zell-Populationen unterschieden [97, 98]. T_{regs} vermehren sich nicht nach Antigen-Kontakt. Aber sie verhindern die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen, z.B. zeigen sie regulative Funktionen, um das Ausmaß der Aktivierung des Immunsystems zu beschränken (siehe Abbildung 6) [98-100]. Außerdem ist bekannt, dass sie negative Auswirkungen auf TAA-spezifische Lymphozyten und dadurch die Immunantwort gegen Tumoren haben [98].

T_{regs} können $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen verdrängen bzw. deren Proliferation unterdrücken und die Produktion von Effektor-Zytokinen, wie beispielsweise $IFN-\gamma$, hemmen. Dieses wird teilweise durch eine Hemmung der IL-2-Transkription innerhalb der T-Zelle ausgelöst [96, 100]. T_{regs} exprimieren das CTLA-4, welches entscheidend ist für Selbst-Toleranz von Antigenen [101] und sezernieren $TGF\beta$ and IL-10, die inhibierend auf die Immunantwort einwirken [102, 103]. Die Aktivität der T_{regs} ist abhängig vom direkten Zellkontakt mit der zu inhibierenden T-Zelle und es wird vermutet, dass es weniger die Zytokine sind, welche die Immunantwort hemmen, sondern eher ein direkter Zellkontakt, jedoch ist der molekulare Mechanismus noch nicht komplett verstanden [104].

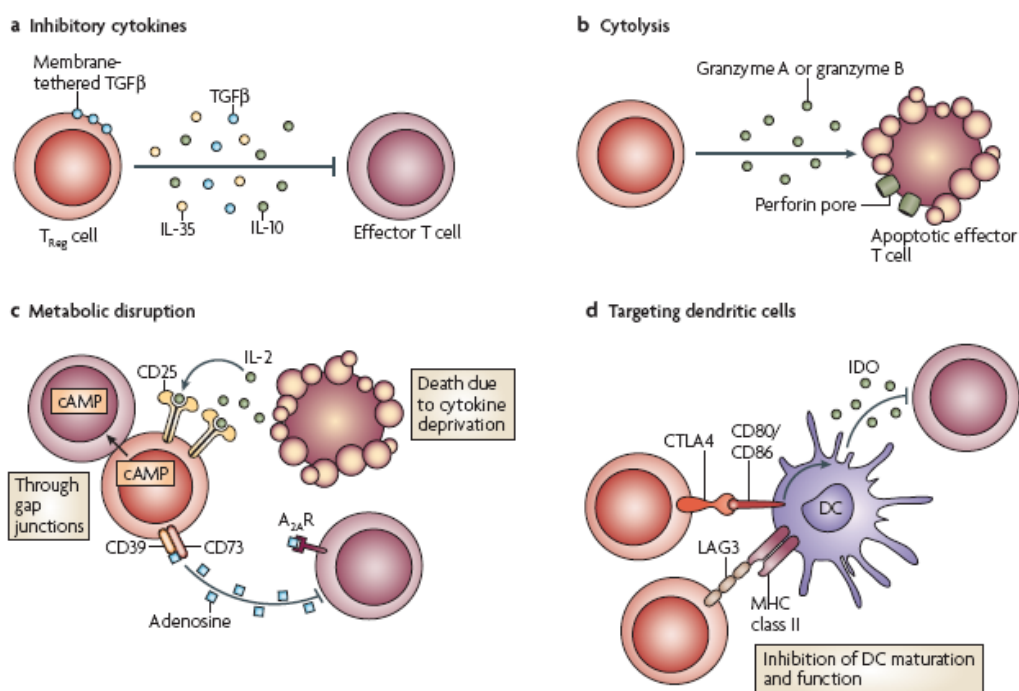


Abbildung 6: Mechanismen von T_{regs} zur Unterdrückung einer Immunreaktion

a) Inhibitorische Zytokine: IL-10, IL-35 und $TGF\beta$ b) Zytolyse: Granzyme-A und -B-abhängige und Perforin-abhängige Zerstörung von T-Zellen c) Metabolische Störungen durch hoch-affine CD25-abhängige Zytokin-vermittelte Apoptose, zyklisches AMP (cAMP)-vermittelte Hemmung und CD39- und CD73-generierte, Adenosin-Rezeptor-2A ($A_{2A}R$)-vermittelte Immunsuppression d) Angriff auf dendritische Zellen durch Mechanismen, die DZ-Reifung und Funktion modulieren, wie über CTLA4-CD80/CD86 Induktion der IDO Bearbeitet aus D. A. A. Vignali et al. [99]

Bei Patienten mit HCC konnte die Arbeitsgruppe von Korangy et al. im peripheren Blut und in den Lymphknoten der Leber eine erhöhte Frequenz von $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen nachweisen [104]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass $CD4^+CD25^+$ T_{regs} die Proliferation und Zytokin-Sekretion von aktivierten $CD4^+CD25^-$ T-Zellen hemmen [104]. Dieses könnte darauf zurückgeführt werden, dass $CD4^+CD25^+$ T_{regs} ihre Funktion über Zellkontakt vermitteln [104]. Diese Daten konnten von einer anderen

Arbeitsgruppe bestätigt werden, die darüber hinaus eine Assoziation einer Vermehrung von CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T_{regs} im peripheren Blut von HCC-Patienten mit der Progression der Erkrankung nachweisen konnte [105]. Zusätzlich wird angenommen, dass die Anzahl der im Tumorgewebe vorkommenden CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T_{regs} ein prognostischer Faktor für HCC-Patienten sein könnte, wobei eine erhöhte Anzahl von CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T_{regs} für eine schlechte Prognose spricht [106].

1.4.3 Myeloid derived suppressor cells (MDSCs)

Die Gruppe der MDSCs stellt eine sehr heterogene Zellgruppe dar. Zum derzeitigen Zeitpunkt gibt es noch keinen Konsens über eine exakte Charakterisierung an Hand von Oberflächenmarkern. Die Zellen leiten sich von unreifen myeloischen Zellen (IMZ) ab, aus denen vor allem Makrophagen, dendritische Zellen und Granulozyten hervorgehen. Infektionen, Traumata und Tumoren im Körper können die Entwicklung von MDSCs aus IMZs begünstigen. Die MDSCs lassen sich dann in diesen Geweben, in denen die Infektionen, die Traumata oder das Tumorwachstum stattfindet bzw. im peripheren Lymphorganen nachweisen (siehe Abbildung 7) [107].

Bei Mäusen werden MDSCs durch die Koexpression der Antigene GR1 und CD11b charakterisiert [108]. Beim Menschen fällt es schwerer genaue Antigene als charakteristische Marker zu finden. MDSCs zeigen Marker von myeloischen Zellen wie CD11b und CD33, jedoch fehlen die Marker von reifen myeloischen Zellen wie beispielsweise CD40, CD80, CD83 und HLA-DR. Monozytische MDSCs scheinen CD14 zu exprimieren und granulozytische MDSCs CD15. Beiden Gruppen kann man außerdem die Merkmale HLA-DR^{low/neg} und CD33⁺ zuweisen [109].

Greten et al. und Gabilovich et al. geben eine Übersicht über die unterschiedlichen Tumorentitäten, bei denen bereits MDSCs nachgewiesen wurden. Insgesamt konnten bislang bei Mäusen bei nicht-Tumorerkrankungen schon MDSCs nachgewiesen werden, beim Menschen liegen jedoch noch wenig Daten vor. [107, 109]. Haile et al. konnten bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen MDSCs nachweisen [110]. Die Arginase-I-Produktion von MDSCs führt zum Abbau von L-Arginin im L-Arginin-Zyklus, was zur Reduzierung der antigenspezifischen T-Zell-Aktivität und Proliferation und zu einer Hemmung der T-Zell-Rezeptor-Produktion der Zelle führt [111, 112]. Zudem gelang der Nachweis von MDSCs im peripheren Blut und der Leber von HCC-Patienten. Hierbei konnte eine gesteigerte Arginase-Aktivität von CD14⁺/HLA-DR^{low/neg}

Zellen festgestellt werden, die auf eine immunsupprimierende Funktion dieser Zellen schließen lässt. Außerdem scheinen MDSCs die Induktion von regulatorischen T-Zellen zu vermitteln. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass MDSCs die Immunantwort AFP-spezifischer CD4⁺ T-Zellen unterdrücken [113], weshalb MDSCs immer mehr in den Mittelpunkt neuer Ansätze der Immuntherapie bei Tumorerkrankungen rücken [114].

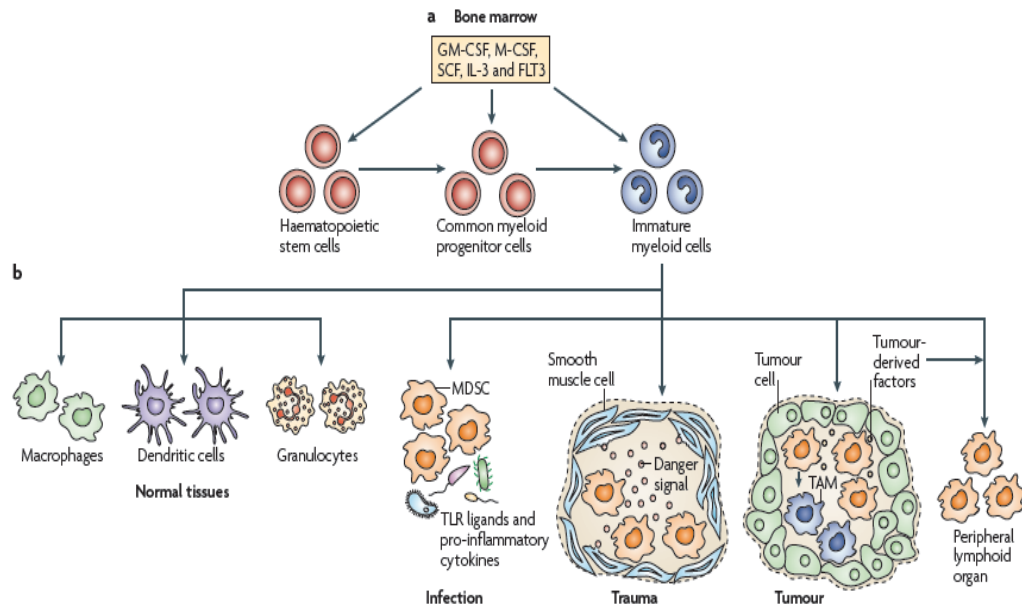


Abbildung 7: Der Ursprung von MDSCs.

IMZ sind Teil der normalen Myeloese, welche durch ein komplexes Netzwerk von Zytokinen und Zell-Expressions-Molekülen kontrolliert wird b) Normalerweise migrieren IMZ zu unterschiedlichen peripheren Organen, wo sie sich dann zu Makrophagen, dendritischen Zellen oder Granulozyten differenzieren. Bei akuten oder chronischen Infektionen, Trauma oder Sepsis und bei Tumoren im Körper wird die Anreicherung von IMZ begünstigt. Dieses führt zur Aktivierung dieser Zellen und zur Entwicklung von MDSCs aus diesen Zellen.

Die Abbildung ist modifiziert aus D. I. Gabrilovich et al. [107].

1.5 Spontane T-Zell-Antworten gegen Tumorantigene

Die Frage der spontanen Immunität von T-Zellen gegen Tumorzellen gibt Anlass für kontroverse Diskussionen. Durch die Entwicklung sensitiver T-Zell-Assays konnten im peripheren Blut von Tumorpatienten spontane T-Zell-Antworten gegen isolierte Tumorantigene nachgewiesen werden [42]. Die Mechanismen, welche eine spontane T-Zell-Immunität induzieren, sind jedoch noch nicht vollständig verstanden. Durch die Etablierung von sensitiveren T-Zell-Assays konnten spontane tumorspezifische T-Zellen *ex vivo* im peripheren Blut und im Knochenmark von Tumorpatienten verschiedener Entitäten, u. a. bei Melanomen [115, 116], Kolorektal- [117], Bronchial- [118] und Mammakarzinomen [119] sowie bei Neuroblastomen [120] nachgewiesen werden. Es gibt Studien, die suggerieren, dass Patienten mit tumorantigen-spezifischer T-Zell-

Antwort einen besseren klinischen Verlauf aufweisen [118, 121], aber auch andere die keinen Unterschied beim klinischen Verlauf zwischen Patienten mit und ohne spontane tumorantigenspezifische T-Zell-Antwort zeigen [122]. Eine mögliche Erklärung dieser unterschiedlichen Ergebnisse ist, dass tumorspezifische T-Zell-Antworten, meistens bei Patienten im fortgeschrittenen Tumorstadium nachgewiesen werden [42, 123] und eine tumorspezifische T-Zell-Antwort erst durch das Auswandern der Tumorzellen, insbesondere in die Lymphknoten entstehen kann. Auf der anderen Seite ist anzunehmen, dass bei Patienten mit lokal begrenzten Tumoren nur lokal tumorspezifische T-Zellen den Tumor kontrollieren und somit eine tumorspezifische T-Zell-Antwort in der Peripherie nicht nachweisbar ist. Unterschiedliche Daten entstehen möglicherweise auch durch die individuelle Heterogenität der tumorantigenspezifischen T-Zellen mit sehr variablen Frequenzen, Phänotypen und funktionellen Charakteristika.

1.6 Immuntherapie mit TAAs

Die Vakzinierung mit definierten Tumorantigenen mit dem Ziel der Generierung tumorspezifischer T-Zellen wird seit mehr als 10 Jahren in klinischen Studien erprobt und weiterentwickelt. Bei Patienten mit aktiver Tumorerkrankung konnte im Rahmen von klinischen Phase-I/II-Studien mit unterschiedlichen Vakzineprotokollen bei der Mehrzahl der Patienten eine T-Zell-Antwort gegen TAAs im Blut induziert werden [124-129]. Bei nur wenigen Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung gelang es jedoch durch diese Vakzine-induzierte T-Zell-Antwort eine Rückbildung des Tumors nach RECIST-Kriterien zu erreichen [126, 127, 130, 131]. Mögliche Ursachen dieser limitierten klinischen Effizienz könnten in einer qualitativ und funktionell nicht ausreichenden Vakzine-T-Zell-Antwort begründet sein, die möglicherweise Folge von immunregulatorischen und immunsuppressiven Mechanismen ist, die bei Tumorpatienten häufig auftreten. Klinisch vielversprechender sind Tumorvakzinierungen für Hochrisikopatienten in der adjuvanten Situation oder einer Situation mit geringer Tumormasse. Ergebnisse von Phase-II-Studien in solchen klinischen Situationen sprechen dafür, dass eine Vakzinierung mit TAAs das Wiederauftreten von Rezidiven verhindern kann [132]. Die Ergebnisse einer kürzlich erschienen Phase-I/II-Studie beim Nierenzellkarzinom (RCC), bei der eine Vakzinierung mit Tumorvakzine IMA901 durchgeführt wurde, welches aus multiplen tumorassoziierten Peptiden besteht, zeigte

zum einen, dass die Induktion von T-Zell-Antworten gegen tumorassoziierte Peptide mit einer besseren Kontrolle der Erkrankung assoziiert war. Zum anderen hatten Patienten mit erniedrigten T_{reg}-Frequenzen vor der Gabe der Vakzinierung einen besseren klinischen Verlauf [133]. In einer folgenden Phase-II-Studie verringerten sich bei den Patienten unter Hinzunahme einer einmaligen Gabe von Cyclophosphamid die Anzahl der T_{regs} im peripheren Blut und diese Patienten hatten ein besseres Langzeitüberleben [133].

1.7 WT1 als Zielstruktur für immunologische Therapiestrategien

WT1 ist ein embryonaler Transkriptionsfaktor der bei verschiedenen Karzinomen und Leukämien eine proliferationsfördernde und onkogene Rolle zu spielen scheint. Zunächst wurde WT1 allerdings als Tumorsuppressorgen beim kindlichen Nephroblastom, auch als Wilms' Tumor bezeichnet, beschrieben [134].

Transkriptionsfaktoren stellen wegen ihrer funktionellen Relevanz interessante Zielstrukturen für immuntherapeutische Ansätze dar. Ein Großteil von Onkogenen und Tumorsuppressorgen kodiert für Transkriptionsfaktoren [69]. Deregulierte Expression oder Aktivierung sowie Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren spielen eine kritische Rolle für die Tumorgenese [69, 134]. Aufgrund der funktionellen Relevanz von WT1 für die Progression von malignen Zellen scheint WT1 weit weniger anfällig für durch immunologischen Selektionsdruck vermittelte Tumor-Escape-Varianten, die bei anderen Tumorantigenen spontan oder im Rahmen von Vakzinestudien beobachtet wurden. Dementsprechend findet sich bei Leukämierезидивen in der Regel eine gleich hohe Expression von WT1 wie bei der Primärdiagnose der akuten myeloischen Leukämie (AML) [135]. In einem vom *National Cancer Institut* (NCI) initiierten Priorisierungsprozess von Tumorantigenen erhielt WT1 unter Berücksichtigung potentiell wichtiger Eigenschaften eines „idealen“ Tumorantigens den höchsten Punktwert unter allen einbezogenen Tumorantigenen [136]. Für WT1 wurden inzwischen verschiedene MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-bindende T-Zell-Epitope charakterisiert [137].

Das WT1-Genprodukt kodiert einen Transkriptionsfaktor der Zink-Finger-Familie (siehe Abbildung 8), der eine Schlüsselrolle bei der Proliferation, Apoptose und Organentwicklung spielt [138]. Bei gesunden Erwachsenen ist die WT1-Expression in

der Regel auf das Urogenitalsystem, das zentrale Nervensystem und auf hämatopoetische Zellen beschränkt, jedoch tritt eine pathologische Überexpression des WT1-Gens bei Leukämien und bei verschiedenen Arten von soliden Tumoren auf [69, 139-141].

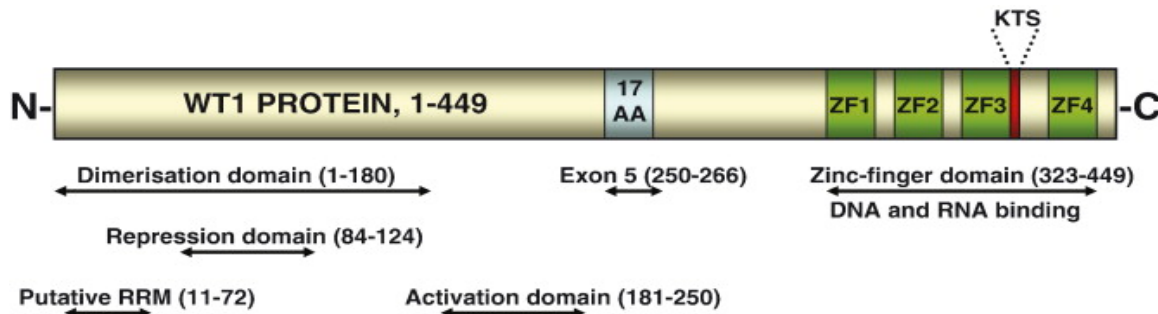


Abbildung 8: Schematische Darstellung des WT1-Proteins. Die N-terminale Domäne besteht aus einer Dimerisierungsdomäne, einer transkriptionellen Aktivierungs- und Repressionsdomäne und einem vermeintlichen RNA Erkennungsmotiv (KRM). Alternatives Spleißen von Exon 5 und die Aminosäuren KTS erzeugen vier WT1-Isoformen [142].

1.7.1 WT1 und spontane T-Zell-Immunität beim HCC

WT1 ist im fötalen Lebergewebe exprimiert [14], allerdings nicht im Lebergewebe von Erwachsenen [143]. Bei chronischen Lebererkrankungen ist WT1 re-exprimiert und mit der Progression dieser Erkrankungen assoziiert [15]. Gleichzeitig konnte bei 60 Patienten mit chronischer Leberzirrhose gezeigt werden, dass mit steigender WT1-Expression die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer Hepato-Karzinogenese erhöht ist. Diese Daten lassen auf eine mögliche onkogene Rolle von WT1 bei chronischen Lebererkrankungen schließen. Beim HCC ist WT1 im Vergleich zu Gewebe von Patienten mit Leberzirrhose überexprimiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die WT1-Expression signifikant mit der Verdopplungszeit des HCCs und mit dem T-Stadium assoziiert ist und einen unabhängigen prognostischen Faktor für das HCC darstellt [15]. Mehrere Arbeitsgruppen konnten bereits spontane T-Zell-Antworten gegen TAAs im peripheren Blut von HCC-Patienten nachweisen. Die Gruppe um Butterfield et al. konnte spontane AFP-spezifische T-Zellen im peripheren Blut von HCC-Patienten zeigen [144]. Neben den bekannten immundominanten Epitopen gelang bei einigen Patienten auch der Nachweis von T-Zellen gegen subdominante Epitope, die ebenfalls Tumorzellen erkennen und möglicherweise von größerer therapeutischer Relevanz sein könnten [145]. MAGE-3-spezifische CD8⁺ T-Zellen wurden bei 30% der HLA-A2 positiven HCC-Patienten detektiert [146]. Auch spontane T-Zell-Antworten gegen p53

konnten nachgewiesen werden [147]. NY-ESO-1-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Antworten konnten bei ca. 15% der analysierten HCC-Patienten nachgewiesen werden und sie waren assoziiert mit dem Nachweis NY-ESO-1-spezifischer Antikörper-Antworten [65]. Ein Fallbericht konnte zeigen, dass die Antikörper-Antwort gegen NY-ESO-1 mit der Tumorlast in Zusammenhang stand [65]. Der Patient hatte einen Rückgang seiner Antikörperproduktion, nachdem der Tumor durch mehrmalige TACE [65] und operative Resektion entfernt worden war. Zu diesem Zeitpunkt war der Tumor histopathologisch als nekrotisch klassifiziert worden [65]. Zugleich ging bei diesem Patienten die CD8⁺ T-Zellen-Antwort 9 Monate nach chirurgischer Resektion des Tumors zurück [65]. Insgesamt können diese Daten als Hinweise auf eine prinzipielle Immunogenität des HCCs interpretiert werden.

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Es ist bereits beschrieben worden, dass das WT1 bei chronischen Lebererkrankungen re-exprimiert wird und mit der Progression dieser Erkrankungen assoziiert ist [15]. Außerdem konnte bei Patienten mit chronischer Leberzirrhose gezeigt werden, dass mit steigender WT1-Expression die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung eines HCCs erhöht ist. Diese Daten lassen auf eine potentielle Rolle von WT1 in der Karzinogenese des HCCs auf dem Boden von chronischen Lebererkrankungen, wie beispielsweise der chronischen Leberzirrhose oder der Hepatitis, schließen. Beim HCC ist WT1 im Vergleich zum Gewebe von Patienten mit Leberzirrhose überexprimiert [14]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die WT1-Expression signifikant mit der Verdopplungszeit des HCCs, und mit dem T-Stadium assoziiert ist und einen unabhängigen prognostischen Faktor für das HCC darstellt [15].

Immuntherapeutische Ansätze werden derzeit beim HCC getestet und erscheinen vielversprechend für die Behandlung und zur Prävention des HCCs.

So konnten bereits mehrere Arbeitsgruppen spontane T-Zell-Antworten gegen TAAs im peripheren Blut von HCC-Patienten nachweisen [16, 30, 31]. Beispielsweise konnte die Gruppe um Butterfield et al. spontane AFP-spezifische T-Zellen im peripheren Blut von HCC-Patienten zeigen [144]. WT1 als potentielles Targetantigen für immuntherapeutische Ansätze beim HCC wurde bisher nicht analysiert.

Zum einen sollte deshalb in dieser Arbeit die T-Zell-Immunität von HCC-Patienten und von Patienten mit chronischer Lebererkrankung im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen gegenüber dem Transkriptionsfaktor WT1 untersucht werden. Zum anderen sollte analysiert werden, ob potentielle Immun-Escape-Phänomene, wie beispielsweise Defekte der Antigenprozessierung und –präsentation, fehlende kostimulatorische Moleküle und/oder potentielle immun-inhibitorische Mechanismen existieren.

Dieses erfolgte vor dem Hintergrund der eingeschränkten Therapiemöglichkeiten des HCCs und in Hinblick auf die Eignung von HCC-Patienten für die Anwendung von immuntherapeutischen Ansätzen mit dem Transkriptionsfaktor WT1. Außerdem sollte bei den Patienten mit chronischer Lebererkrankung die Immunität gegenüber WT1 in Bezug auf präventive Therapiemöglichkeiten mit WT1 als potentielle Zielstruktur immuntherapeutischer Ansätze bei den Vorstufen des HCCs untersucht werden.

Hierzu wurden bei 21 HCC-Patienten, 23 Patienten mit Leberzirrhose, 20 Patienten mit chronischer Hepatitis und 9 gesunden Kontrollpersonen nach Stimulation mit dem WT1-Petpidmix CD4⁺- und CD8⁺ T-Zell-Antworten gegenüber dem Transkriptionsfaktor WT1 durchflusszytometrisch untersucht und miteinander verglichen.

Hinsichtlich potentieller immunsupprimierender Faktoren, die eine Immunantwort gegenüber einem TAA, wie beispielsweise WT1, einschränken bzw. unterdrücken könnten, wurden gleichzeitig bei diesen Patientengruppen immunsuppressive Faktoren in Form von T_{regs} und MDSCs untersucht und in den verschiedenen Patientengruppen verglichen.

Eine Voraussetzung für den Einsatz von Antigen-spezifischer Immuntherapie ist die Expression der Antigene auf der Oberfläche von Tumorzellen sowie die Erkennung durch APZ, daher wurde die Existenz solcher Oberflächenstrukturen sowie das Vorkommen von WT1 als potentielles Targetantigen auf den HCC-Tumorzelllinien untersucht. Weiterhin analysierten wir die prinzipielle Antigenpräsentations-Kapazität von HCC-Tumorzelllinien in Bezug auf eine potentielle T-Zell-Stimulation.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patienten und Kontrollgruppen

Nach Aufklärung und schriftlichem Einverständnis wurde von gesunden Personen, von 21 Patienten mit HCC, 23 Patienten mit Leberzirrhose und von 20 Patienten mit Hepatitis B oder C heparinisiertes peripheres Blut aus einer peripheren Vene abgenommen. Die Patientendaten sind in der Tabelle 1, Tabelle 2, Tabelle 3 zusammengestellt. Für die Untersuchungen dieser Arbeit lag ein positives Votum der Ethikkommission der Universitätsmedizin Charité Berlin vor.

Tabelle 1

	Patient	Geschlecht	Geb.-Jahr	relevante Nebendiagnosen
HCC	1	Männlich	1946	Hepatitis C
	2	Männlich	1933	Alkoholtoxische Leberzirrhose
	3	Männlich	1940	Alkoholtoxische Leberzirrhose
	4	Männlich	1951	Alkoholtoxische Leberzirrhose
	5	Männlich	1958	Alkoholtoxische Leberzirrhose
	6	Weiblich	1937	keine
	7	Weiblich	1965	Alkoholtoxische Leberzirrhose
	8	Männlich	1952	Alkoholtoxische Leberzirrhose, Hepatitis C
	9	Männlich	1949	Leberzirrhose, Hepatitis C
	10	männlich	1946	keine
	11	Männlich	1958	keine
	12	Männlich		?
	13	Männlich	1934	keine
	14	Weiblich	1978	Alkoholtoxische Leberzirrhose, Hepatitis C
	15	Männlich	1926	Hepatitis C
	16	Männlich	1932	Alkoholtoxische Leberzirrhose, Hepatitis C
	17	Männlich	1939	keine
	18	Männlich	1954	Alkoholtoxische Leberzirrhose
	19	Weiblich	1949	Alkoholtoxische Leberzirrhose, Hepatitis C
	20	Männlich	1928	keine
	21	Männlich	1940	Alkoholtoxische Leberzirrhose

Tabelle 2

	Patient	Geschlecht	Geb.-Jahr	Diagnose
Hepatitis	1	weiblich	1934	Hepatitis C
	2	weiblich	1973	Hepatitis B
	3	männlich	1950	Hepatitis C
	4	weiblich	1948	Hepatitis C
	5	weiblich	1989	Hepatitis B
	6	weiblich	1982	Hepatitis B
	7	männlich	1958	Hepatitis B
	8	männlich	1952	Hepatitis B
	9	weiblich	1943	Hepatitis C
	10	weiblich	1949	Hepatitis C
	11	männlich	1966	Hepatitis B
	12	weiblich	1956	Hepatitis C
	13	männlich	1956	Hepatitis C
	14	weiblich	1936	Hepatitis C
	15	weiblich	1940	Hepatitis C
	16	weiblich	1933	Hepatitis C
	17	weiblich	1964	Hepatitis C
	18	männlich	1963	Hepatitis C
	19	männlich	1919	Hepatitis C
	20	weiblich	1979	Hepatitis B

Tabelle 3

	Patient	Geschlecht	Geb.-Jahr	Diagnose
Zirrhose	1	männlich	1965	C2-Abusus
	2	männlich	1956	C2-Abusus/Hepatitis C
	3	männlich	1956	C2-Abusus/Hepatitis B
	4	männlich	1961	C2-Abusus/Hepatitis C
	5	männlich	1940	C2-Abusus
	6	männlich	1942	C2-Abusus
	7	weiblich	1932	Hepatitis C
	8	männlich	1982	C2-Abusus
	9	männlich	1966	C2-Abusus
	10	weiblich	1937	C2-Abusus
	11	männlich	1932	C2-Abusus
	12	männlich	1950	C2-Abusus
	13	weiblich	1952	PBC
	14	weiblich	1946	PBC
	15	männlich	1950	Hepatitis C
	16	männlich	1953	Hepatitis C
	17	männlich	1977	PBC
	18	männlich	1953	C2-Abusus
	19	weiblich	1964	C2-Abusus
	20	weiblich	1925	Hepatitis C
	21	männlich	1942	C2-Abusus
	22	männlich	1936	C2-Abusus
	23	weiblich	1933	C2-Abusus

2.1.2 Tumorzelllinien

Zur Untersuchung von Oberflächenmolekülen verwendeten wir in dieser Arbeit zum einen die HLA-A2 positiven HCC-Tumorzelllinien SK-Hep1 [148], HEP-G2 [149] und die HLA-A2 negative HCC-Tumorzelllinie HUH-7 [150]. Außerdem wurden zwei Leukämiezelllinien als Referenz-Zelllinien eingesetzt: UT-7 (HLA-A2 positiv) [151] und MOLT4 (HLA-A2 negativ) [152] (siehe auch Tabelle 4).

Zelllinie	Beschreibung	ATCC Nr	Zellen	Referenz
HUH-7	HCC	n.a.	Adenokarzinom	[150]
SK-HEP1	HCC	HTB-52	Adenokarzinom	[148]
HEP-G2	Hepatoblastom	HTB-8065	Hepatoblastom	[149]
Molt-4	ALL	CRL-1582	T-Lymphoblast	[152]
UT-7	Akute megakaryoblastische Leukämie	n.a.	Megakaryoblasten	[151]

Tabelle 4: Tumorzelllinien. Die angegebenen Tumorzelllinien wurden in den Versuchen, welche im Methodenteil beschrieben worden sind, verwendet.

2.1.3 Kulturmedien

Für die Kultivierung der Tumorzellen Molt-4 und UT-7 wurde Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 (PAA, The Cell culture company, Pasching, Österreich) versetzt mit 10% fötalem Kälber Serum (FCS) (PAA), 1 mM L-Glutamin, 100 U/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin (PAA) verwendet. Für die Tumorzelllinie SK-HEP-1 wurde minimales essentielles Medium (MEM) (PAA) mit 100 U/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin, 5ml Natriumpyruvat (PAA) von einer 100mM Lösung in einem Mischungsverhältnis 1:100 und 10% FCS (PAA) genommen. Für die Tumorzelllinie HEP-G2 wurde Dulbeccos Modifiziertes Eagles Medium (DMEM), Ham's F12 (PAA) mit 2mM Glutamin, 10% FCS (PAA), 100 U/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin verwendet.

Iscove's modified DMEM (IMDM) (PAA) versetzt mit 10% AB-Serum (PAA), 1 mM L-Glutamin, 100 U/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin (PAA) diente als Kulturmedium für die Lymphozyten.

2.1.4 Auftaumedium

Zum Auftauen der Tumorzellen als auch der Lymphozyten wurde RPMI 1640 mit 4% AB-Serum (PAA) angewandt.

In den folgenden Beschreibungen werden die Medien als Tumorzell-, Kultur- und Auftaumedium bezeichnet.

2.1.5 Dichtegradient

Zur Lymphozyten-Isolierung wurde Ficoll-Hypaque-Lösung (PAA) mit der Dichte 1,0077 verwandt.

2.1.6 Accutase

Accutase (Millipore GmbH, Schwalbach am Taunus) war ein Ablösungsreagenz für adherente Tumorzellen. Die Ablösung der adherenten Zellen erfolgte über Proteasen ohne Oberflächenmoleküle der Zellen zu zerstören. Accutase (Millipore GmbH) wurde in Dulbecco's Phosphat-gepufferte Saline (PBS) Medium mit 0,5mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) angereichert und war sofort verwendbar. Wir applizierten 8-10ml dieser Lösung für eine 75 cm² Oberfläche einer Zellkulturflasche und ließen es bei 37°C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ für maximal 45 Minuten inkubieren.

2.2 FACS-Antikörper

2.2.1 HLA-Typisierung

Zur HLA-Typisierung der verschiedenen Kontrollpersonen, Patienten und Tumorzelllinien diente ein Maus-anti-Human-IgG-mAk gegen HLA-A2 (BB.7.2; ATCC). Fluorescein-Isothycyanat (FITC)-markierte Ziege-anti-Maus IgG-mAks oder IgM-mAks wurden als sekundäre Antikörper verwandt. Isotypenspezifische IgG-FITC bei der direkten Färbung sowie Isotypenspezifische IgG kombiniert mit FITC18 markiertem Ziege-anti-Maus-mAk (GAM) (alle Immunotech, Marseille, Frankreich) dienten zur Anfärbung der Negativkontrolle.

2.2.2 Tumorzell-Einzelfärbung

Für die in den folgenden Tabellen aufgeführten Antikörper gelten folgende Firmen Nachweise:

Becton Dickinson, BD, Heidelberg, Deutschland

Dako, Eching, Deutschland

eBioscience, San Diego, USA.

Anitkörper	Konjugat	Hersteller	Menge in µl
CD80	FITC	BD	20
CD86	FITC	BD	20
HLA ABC	PE	BD	20
HLA A2	FITC	BD	20
HLA-DR	FITC	BD	20
WT1	FITC	Dako	3

2.2.3 Isotypen-Kontrolle

Anitkörper	Konjugat	Hersteller	Menge in µl
GAM	FITC	BD	2,5
IGG1	FITC	BD	5
IGG2 beta	FITC	BD	5
IGG2 alpha	FITC	BD	5
IGG1	PE	BD	5

2.2.4 T-Lymphozyten nach Tumorzellenkontakt

Anitkörper	Konjugat	Hersteller	Menge in µl
CD3	PerCP	BD	10
CD8	PE	BD	5
IFN gamma	APC	BD	1:300
TNF alpha	FITC	eBioscience	0,5

2.2.5 Spezifische T-Lymphozyten nach Tumorzellkontakt

Anitkörper	Konjugat	Hersteller	Menge in μ l
CD3	PerCP	BD	10
CD8	PE	BD	5
IFN gamma	FITC	BD	20
TNF alpha	PE-Cy 7	eBioscience	0,5

2.2.6 CD8⁺T-Zell-Panel

Anitkörper	Konjugat	Hersteller	Menge in μ l
Vivid	Pacific Blue	BD	0,5
CD3	PerCP	BD	10
CD8	PE	BD	5
CD4	APC-H7	BD	2,5
CD137	APC	BD	15
TNF alpha	Pe-Cy7	eBioscience	0,5
IFN gamma	FITC	BD	20

2.2.7 T_{reg}-Panel

Anitkörper	Konjugat	Hersteller	Menge in μ l
Vivid	Pacific Blue	BD	0,5
CD3	Amcyan	BD	3
CD25	PE	BD	5
CD4	APC-H7	BD	2,5
CD137	APC	BD	15
CD 127	FITC	BD	20
TNF alpha	Pe-Cy7	eBioscience	0,5
TGF beta	PerCp	BD	10

2.2.8 MDSC-Panel

Anitkörper	Konjugat	Hersteller	Menge in μ l
Vivid	Pacific Blue	BD	0,5
CD11 beta	Pe-Cy7	BD	1
HLA-DR	PE	BD	20
CD14	APC	BD	3
CD19	FITC	BD	10
CD3	FITC	BD	10
CD56	FITC	BD	10

2.2.9 WT1-Peptidmix (JPT,Berlin)

Der WT1-Peptidmix (JPT, Berlin) war lyophilisiert und enthielt 25 μ g Peptid. Er bestand aus 110 überlappenden Peptiden (Länge 449 Aminosäuren) und er war aus dem Menschen generiert.

Dieser wurde in 100 μ l Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck, Darmstadt) gelöst und dann in 10 μ l Einheiten in Aliquots abgefüllt und bei -20°C eingefroren. Von diesem in DMSO gelösten WT1-Peptidmix (JPT) wurden jeweils 2 μ l auf 500 μ l Zellsuspension verwendet. Die 500 μ l Zellsuspension enthielt ca. $1-2 \times 10^6$ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Die Konzentration betrug 1 μ g/ml und enthielt eine Zellzahl von $1-2 \times 10^6$ PBMCs.

2.3 Methoden

2.3.1 Gewinnung von MNCs aus Heparin-Vollblut

Nach Verdünnung von heparinisiertem Vollblut 1:2 mit steriler Phosphat-gepufferte Saline (PBS) (PAA) wurden jeweils 35 ml vorsichtig über 15 ml Ficoll (PAA) in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) geschichtet und anschließend 30min bei Raumtemperatur mit 2000 U/min ohne Bremse zentrifugiert. Erythrozyten und Granulozyten sedimentierten aufgrund ihrer höheren Dichte auf den Boden der Röhrchen während mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten) als Interphase auf der Ficoll-Hypaque-Phase unter der PBS-Plasma-Phase verblieben. Die Interphasen wurden vorsichtig abpipettiert und die Zellen anschließend zweimal mit PBS (PAA) gewaschen. Die Zellen wurden in Portionen von $1-2 \times 10^7$ in 1 ml AB (PAA)+

10% DMSO (Merck, Darmstadt, Deutschland) in speziellen Einfrierboxen (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) eingefroren und anschließend bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauer-Kammer (Sigma), indem kleine Mengen der jeweiligen Zellsuspension mit den entsprechenden Mengen von 1:2-verdünntem Trypan-Blau (Sigma, Deisenhofen) /PBS (PAA) angefärbt und unter dem Mikroskop vier Großquadrate ausgezählt wurden. Folgende Formel diente zur Berechnung der Gesamtzellzahl in der Ausgangslösung bei einem Volumen von $0,1\mu\text{l}$ pro Großquadrat:

Gesamtzellzahl der Ausgangslösung = $0,25 \times \text{gezählte Zellzahl} \times 10^4 \times \text{Verd} \times \text{Vol}$ (Verd = Verdünnungsfaktor, Vol = Volumen der Ausgangslösung in ml)

2.3.3 Passagierung von Tumorzelllinien

Nach erfolgreicher Kultivierung der Tumorzelllinie wurde das Tumorzellmedium aus der Kulturflasche entfernt und die adherenten Tumorzellen wurden in der Kulturflasche mit PBS (PAA) gewaschen. Danach wurden 5ml Accutase (Millipore GmbH) auf die Tumorzellen gegeben. Diese inkubierten dann für 45min bei 37°C , gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 . Danach konnten die Zellen nach Zugabe von Kulturmedium gezählt und passagiert werden. Aufgrund der Autodigestion der Accutase war kein weiterer Waschgang notwendig.

2.3.4 Einzelfärbung der Tumorzelllinien

Nach Kultivierung der Tumorzellen in ihrem zugehörigem Tumorzellmedium wurden nach ausreichendem Bestand der Tumorzellen diese mit 5ml Accutase (Millipore GmbH) behandelt und danach gezählt. Es wurden 2×10^5 Zellen mit PBS (PAA) mit 2% Flebogamma (PAA) gewaschen und bei 4°C bei 1300U/min zentrifugiert. Daraufhin inkubierten die Zellen mit 1ml PBS (PAA) mit 1mM EDTA (PAA) bei Raumtemperatur. Es folgte nach weiterem Waschen die Färbung mit Fluorochromen-markierten-Antikörpern der Oberflächenmoleküle (siehe auch Materialteil), die bei 4°C für 15min inkubierten.

2.3.5 WT1-Färbung der Tumorzelllinien

Die Tumorzellen wurden mit PBS mit 2% Flebogamma (PAA) gewaschen und anschließend bei 4°C bei 1300U/min zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde 200µl PBS (PAA) mit 1% Formalin pro Probe pipettiert danach inkubierten die Proben für 10min auf Eis. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit PBS mit 1% Formalin (PAA). Danach inkubierten die Proben zur Permeabilisierung mit 0,5ml pro Probe PBS (PAA) mit 2% Triton X für 5min auf Eis. Nach einem weiteren Waschschrift wurden 3µl pro Probe WT1-Antikörper pipettiert und für 20min auf Eis gestellt. Es folgte ein weiterer Waschschrift und dann inkubierten die Proben mit 2,5µl GAM-FITC pro Probe auf Eis für 15min im Dunkeln.

2.3.6 Peptidbeladung der Tumorzelllinien

In Kultur befindliche Tumorzellen wurden mit Accutase (Millipore GmbH) gelöst. Pro Kulturröhrchen wurden 1×10^6 /ml Tumorzellen mit 10µg/ml HIV- oder Influenzapeptid (IMP7190) inkubiert. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37°C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ wurden die Zellen zweimal mit PBS (PAA) gewaschen. Danach wurden 1×10^5 Tumorzellen pro 1×10^6 PBMC verteilt und in 2ml Kulturmedium aufgenommen und für 16 Stunden bei 37°C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ inkubiert, wobei nach 1 Stunde 10µg Brefeldin A (Sigma) dazu gegeben worden ist.

2.3.7 Analyse der T-Zell-Antwort gegen allogene Tumorzelllinien

Nach der Inkubation von Tumorzellen und PBMCs wurden am darauf folgenden Tag die Zellen mit PBS mit 2% Flebogamma (PAA) gewaschen und bei 4°C bei 1300 U/min zentrifugiert. Daraufhin inkubierten die Zellen mit 1ml PBS (PAA) mit 1mM EDTA (PAA) bei Raumtemperatur. Es folgte nach weiteren Waschschriften die Färbung mit Fluorochrom-markierten-Antikörpern der Oberflächen-Moleküle (siehe Material Teil), die bei 4°C für 15min inkubierten. Nach der Inkubation wurden *Fluorescence activated cell sorting* (FACS) *Lysing Solution* (Becton Dickinson) und FACS *Permeabilization Solution* (Becton Dickinson) in aufeinander folgenden Schritten dazugegeben. Die Antikörper gegen intrazelluläre Zytokine wurden in gleicher Weise gefärbt.

2.3.8 T-Lymphozyten-Expansions-Ansatz

Die PBMCs eines gesunden HLA-A2 positiven Spenders mit bekannter T-Zell-Antwort gegen HLA-A2 negatives bindendes Influenzapeptid wurden aufgetaut und in Kulturmedium aufgenommen. Danach wurden die Zellen auf eine Zellzahl von 1×10^6 /ml Kulturmedium eingestellt und mit jeweils 200µl pro well in einer 96er Multi-well Platte verteilt. Die Zytokine IL-2 (50 IU/ml) und IL-7 (10ng/ml) sowie 10µg/ml Influenzapeptid wurden hinzugefügt. Die Zellen expandierten nun bei 37°C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂. Alle 2 Tage wurden 100µl des Kulturmediums ausgetauscht unter Zugabe von IL-2 (100IU/ml). Alle 7 Tage erfolgte die zusätzliche Zugabe von IL-7 (10ng/ml). Nach 14 Tagen erfolgte die Analyse der expandierten Zellen.

2.3.9 Analyse der T-Zell-Antwort von mit Influenza-Peptid expandierten T-Zellen gegenüber Influenza-Peptid beladenen Tumorzellen

Nach 14 Tagen des Expansionsansatzes (siehe Punkt 2.3.8) wurden die PBMCs des gesunden HLA-A2 positiven Spenders der 96er Multitwell-Platte entnommen und mit den Tumorzelllinien entsprechend dem unter Punkt 2.3.6 beschriebenen Ansatz inkubiert. Danach wurden die T-Zellen wie unter Punkt 2.3.7 mit Fluochrommarkierten-Antikörpern gefärbt.

2.3.10 Stimulation von CD8⁺ T-Zellen und T_{regs} mit dem WT1-Peptidmix

Die Zellen wurden mit 30ml Auftaumedium aufgetaut und anschließend bei Raumtemperatur bei 1300 U/min herunterzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 3-4ml Kulturmedium aufgenommen und in Zellkulturröhrchen überführt und man hat sie über Nacht bei 37°C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ ruhen lassen. Am nächsten Tag wurden die Zellen in 500µl Einheiten aufgeteilt mit je $1-2 \times 10^6$ PBMCs / 500µl. Nach Zugabe von 2µl WT1-Peptidmix (JPT) inkubierten die Zellen für 16 Stunden bei 37°C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂. Nach 2 Stunden Inkubation wurden 500µl Kulturmedium (PAA) und 10µg Brefeldin A (Sigma) dazugeben. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Zellen mit PBS (PAA) mit 2% Flebogamma (PAA) gewaschen und bei 4°C bei 1300 U/min zentrifugiert. Daraufhin inkubierten die Zellen mit 1ml PBS (PAA) mit 1mM EDTA (PAA) bei Raumtemperatur. Nach weiteren Waschschritten folgte bei 4°C für 15min die Färbung mit Fluorochromen-markierten-Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle (siehe auch Materialteil). Nach dieser

Inkubation wurden zur Permeabilisierung der Zellen FACS *Lysing-Solution* (BD) und FACS *Permeabilization-Solution* (BD) in aufeinander folgenden Schritten dazugegeben und die Fluorochromen-markierten-Antikörpern gegen intrazelluläre Zytokine in gleicher Weise gefärbt.

2.3.11 Durchflusszytometrische Analyse von MDSCs

Die Zellen wurden mit 30ml Auftaumedium aufgetaut und in 3-4ml Kulturmedium aufgenommen. Über Nacht hat man sie bei 37°C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ ruhen lassen. Am darauf folgenden Tag erfolgte nach einem Waschschrift mit PBS (PAA) plus 2 % Immunglobulinen (Flebogamma, PAA) die Antikörper-Färbung gegen die Oberflächenmoleküle. Für einen Färbeansatz wurden jeweils 1-2x10⁶ Zellen eingesetzt.

2.3.12 Messung und Daten Analyse

Bei allen Versuchen erfolgte die Messung am gleichen Tag mit dem FACS Canto-II-Cytometer (BD) und die Daten wurden mit der Flowjo-Software (Ashland, OR, USA) analysiert.

2.3.13 Statistische Methoden

Für die statistischen Analysen wurde zum einen der Mann-Whitney Test für unabhängige Variablen angewendet und für die Varianzanalyse der Kruskal-Wallis Test.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse von Oberflächenrezeptoren und von WT1 auf Tumorzellen

Für eine effektive Antigenpräsentation spielen die Expressionsdichte der MHC-Moleküle und ko-stimulatorische Signale wie B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) eine entscheidende Rolle. Daher wurde die Existenz solcher Oberflächenstrukturen sowie das Vorkommen von WT1 als potentiell Targetantigen auf den HCC-Tumorzelllinien untersucht.

Mittels durchflusszytometrischer Analysen konnte auf allen drei Leberzellkarzinom-Tumorzelllinien die Oberflächenexpression von WT1 nachgewiesen werden.

Hierbei zeigte SK-Hep1 eine mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von 18,85% (Negativ-Kontrolle 5,79%), HEP-G2 eine MFI von 19,03% (Negativ-Kontrolle 7,87 %) und HUH-7 von 15,39% (Negativ-Kontrolle 4,75%). Die Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen konnte für SK-Hep1 (HLA-ABC MFI 3,98%, Negativ-Kontrolle 2,56%) und für Hep-G2 (HLA-ABC MFI 16,94%, Negativ-Kontrolle 3,46%) gezeigt werden. Auf der HCC-Tumorzelllinie HUH-7 ließen sich hierbei niedrige Frequenzen an HLA-Klasse-I-Molekülen (HLA-ABC MFI 1,55%, Negativ-Kontrolle 1,95%) nachweisen. Die weitere Analyse zeigte eine Positivität für HLA-A2 bei beiden HCC-Tumorzelllinien Sk-Hep1 (HLA-A2 MFI 41,10%, Negativ-Kontrolle 3,11%) und HEP-G2 (HLA-A2 MFI 7,00%, Negativ-Kontrolle 3,24). Die HCC-Tumorzelllinie HUH-7 zeigte keine Positivität für (HLA-A2 MFI 4,17, Negativ-Kontrolle 5,19). HLA-DR positiv waren folgende Zelllinien: Sk-Hep1 (HLA-DR MFI 6,69%, Negativ-Kontrolle 3,98%), HEP-G2 (HLA-DR MFI 4,28%, Negativ-Kontrolle 3,72%).

Als ko-stimulatorisches Oberflächenmolekül konnte CD86 auf allen drei HCC-Tumorzelllinien nachgewiesen werden: Sk-Hep1 MFI 8,74% (Negativkontrolle 3,69%), HEP-G2 MFI 9,63% (Negativ-Kontrolle 3,74%), HUH-7 MFI 10,66% (Negativ-Kontrolle 1,99%). Jedoch fand sich auf keiner der drei Zelllinien eine Expression von CD80: Sk-Hep1 MFI 3,69% (Negativ-Kontrolle 2,89%), HEP-G2 MFI 2,94% (Negativ-Kontrolle 3,74%) und HUH-7 MFI 1,99% (Negativ-Kontrolle 1,54%) (siehe Tabelle 5, Tabelle 6, Tabelle 7).

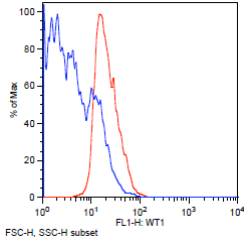
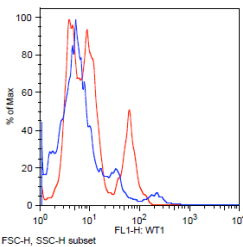
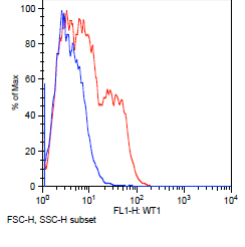
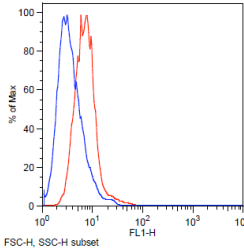
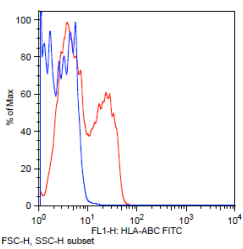
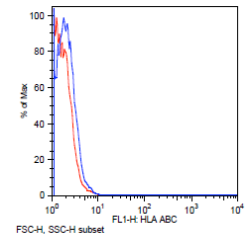
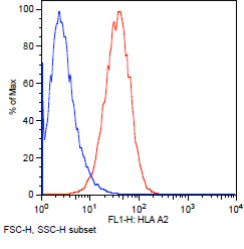
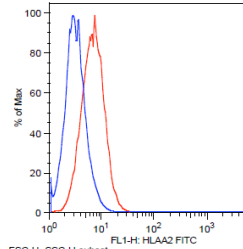
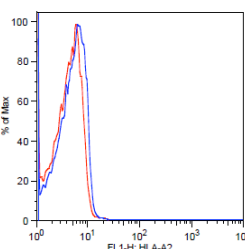
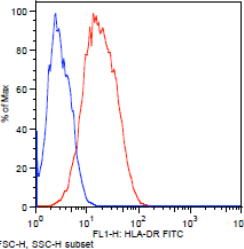
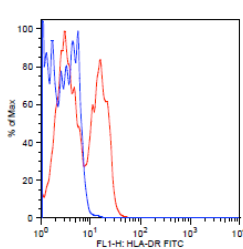
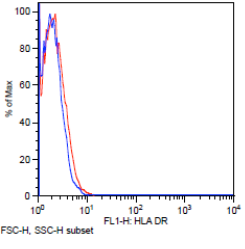
	Sk-Hep1	HEP-G2	HUH-7
GAM-FITC	5,79	7,87	4,75
WT1	18,85	19,03	15,39
			
IGG1	2,56	3,46	1,95
HLA-ABC	3,98	16,94	1,55
			
IGG2b	3,11	3,24	5,19
HLA-A2	41,10	7,00	4,17
			
IGG1	3,98	3,72	1,95
HLA-DR	6,69	4,28	2,04
			

Tabelle 5: Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensitäten der primär bzw. sekundär fluoreszenzmarkierten Oberflächenrezeptoren.

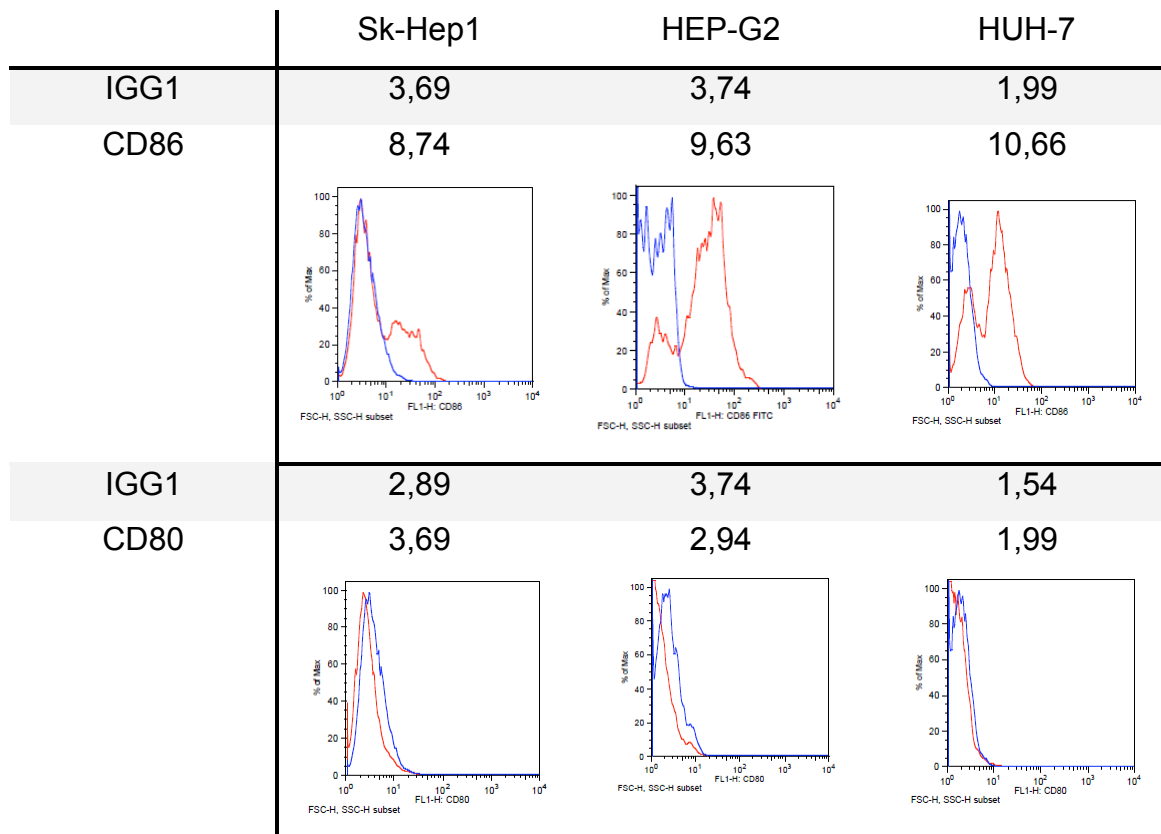


Tabelle 6: Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensitäten der primär bzw. sekundär fluoreszenzmarkierten Oberflächenrezeptoren.

	Sk-Hep1	Hep-G2	HUH-7
WT1	++	++	++
HLA-ABC	+/-	+	-
HLA-A2	+	+	-
HLA-DR	+	+/-	-
CD86	+	+	+
CD 80	-	-	-

Tabelle 7: Übersicht der Expression der Oberflächenrezeptoren.

+ : Expression des Oberflächenrezeptors auf der Tumorzelllinie
(definiert als mindestens doppelte MFI im Vergleich zur Isotypenkontrolle)
- : kein Nachweis des Oberflächenrezeptors auf der Tumorzelllinie
(definiert als weniger als die doppelte MFI im Vergleich zur Isotypenkontrolle)

3.2 T-Zellerkennung und Antigenpräsentation von HCC-Tumorzelllinien

Eine Voraussetzung für den Einsatz von Antigen-spezifischer Immuntherapie ist die Expression der Antigene auf der Oberfläche von Tumorzellen sowie die Erkennung durch APZ. Um die prinzipielle Antigenpräsentations-Kapazität von T-Zellen zu analysieren, wurde ein bereits für andere Tumorentitäten in unserem Labor etabliertes System genutzt [153, 154]. Wir setzten in diesen Versuchen, wie im Methodenteil beschrieben, die HLA-A2 positiven HCC-Tumorzelllinien Sk-Hep1 und HEP-G2 als auch die HLA-A2 negative HCC-Tumorzelllinie HUH-7 ein. Als Referenz-Zelllinien nahmen wir für diese Versuche die in unserem Labor etablierten HLA-A2 positive Leukämiezelllinie UT7 und die HLA-A2 negative MOLT-4.

3.2.1 Analyse der T-Zell-Erkennung direkt *ex vivo* von HCC-Tumorzelllinien anhand eines Influenza-Modell-Antigens

Zunächst wurden die Frequenz IFN γ - und TNF α -freisetzender T-Zellen eines gesunden HLA-A2 positiven Spenders mit bekannter Influenza-Reaktivität gegen die mit dem Influenza-Peptid beladenen HLA-A2 positiven HCC-Tumorzelllinien Sk-Hep1 und HEP-G2 analysiert. Zudem analysierten wir die T-Zell-Antworten gegen die mit dem Influenza-Peptid beladene HLA-A2 negative HCC-Tumorzelllinie HUH-7. Wir erwarteten gegen diese Tumorzelllinie aufgrund der HLA-A2 Negativität keine T-Zell-Reaktivität.

Wir analysierten die Zytokin-Antworten der CD3⁺CD8⁺-Population (siehe Abbildung 9) des HLA-A2 positiven gesunden Spenders mit bekannter Influenza-Reaktivität.

Im Vergleich zur HIV-Kontrollgruppe zeigte sich eine Influenza-spezifische IFN γ -Sekretion der CD8⁺ T-Zell-Population gegen die HLA-A2 positiven HCC-Tumorzelllinien Sk-Hep1 und HEP-G2. Die Frequenzen der CD3⁺CD8⁺ IFN γ -freisetzender-T-Zellen lagen gegen HEP-G2 bei 0,17% und gegen Sk-Hep1 bei 0,23%. Gegen die HLA-A2 negative HCC-Tumorzelllinie HUH-7 zeigten sich keine CD3⁺CD8⁺ IFN γ -freisetzende-T-Zellen.

Es ließen sich CD3⁺CD8⁺ TNF α -freisetzende-T-Zellen gegen die HLA-A2 positiven HCC-Tumorzelllinien HEP-G2 und SK-Hep1 nachweisen. Diese waren jedoch angesichts einer hohen Hintergrund-Reaktion gegen das HIV-Kontrollpeptid nicht als positiv zu werten. Die Frequenzen lagen bei den CD3⁺CD8⁺ T-Zell-Population bei

0,39% (HIV 0,40%) gegen Hep-G2 und bei 0,46% (HIV 0,37%) gegen Sk-Hep1. Das gleiche Phänomen der hohen unspezifischen TNF α -Sekretion gegen das irrelevante HIV-Peptid zeigte sich auch bei den CD3⁺CD8⁺ TNF α -freisetzende-T-Zellen gegen die Referenz-Leukämie-Zelllinie UT7. Gegen die HLA-A2 negative HCC-Tumorzelllinie HUH-7 konnten keine spezifischen CD3⁺CD8⁺ TNF α -freisetzende-T-Zellen nachgewiesen werden.

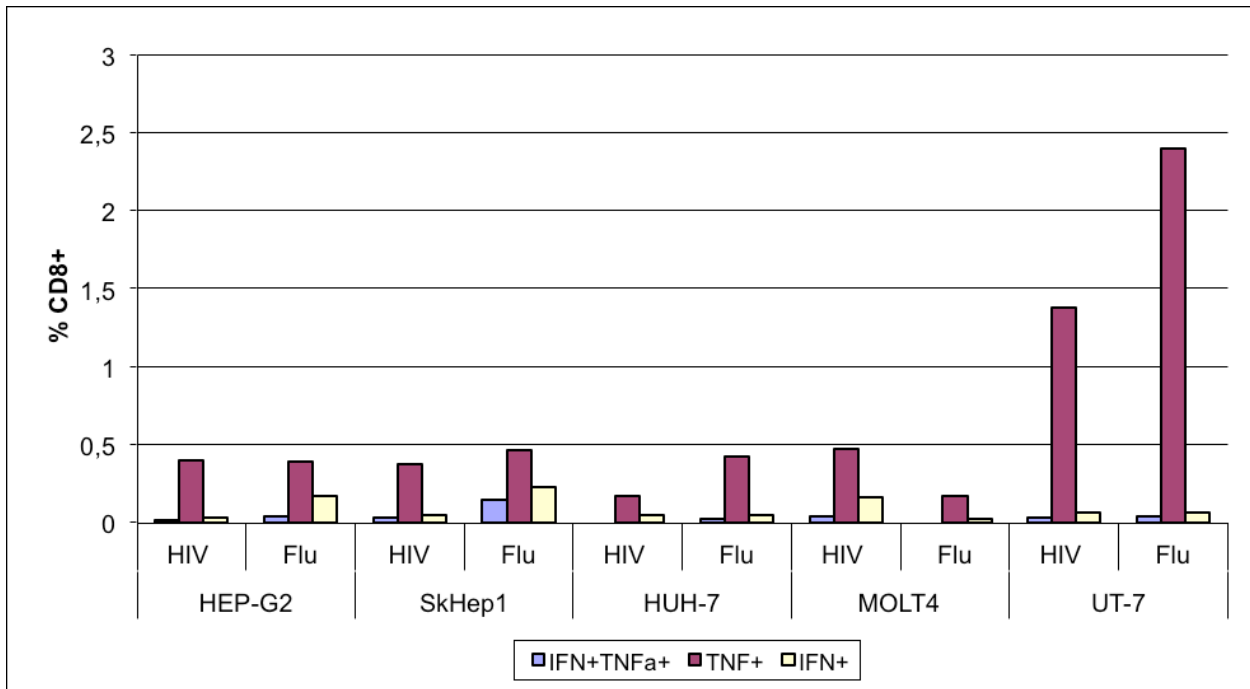


Abbildung 9 Spontane Immunantwort von CD3⁺CD8⁺ T-Zellen gegen Tumorzelllinien. Gezeigt werden die drei HCC-Tumorzelllinien von denen zwei HLA-A2 positiv (HEP-G2, SkHep1) und eine HLA-A2 negativ (HUH-7) sind. Außerdem wurden zwei Leukämiezelllinien als Referenz-Zelllinien eingesetzt. Die Leukämiezelllinie UT-7 ist HLA-A2 positiv und die Leukämiezelllinie MOLT4 ist HLA-A2 negativ. Dargestellt werden in Prozent die Frequenzen von TNF α - (rot) und IFN γ - (gelb) freisetzende und CD8⁺ T-Zellen bzw. die Frequenzen in Prozent der doppelt positiven TNF α /IFN γ - (blau) freisetzende und CD8⁺ T-Zellen von einem auf das Influenza-Peptid positiv reagierenden HLA-A2 positiven Spender nach 16 Stunden Inkubation mit Influenza-(FLU) oder HIV-Peptid (HIV) beladenen Tumorzellen direkt *ex vivo*. Ein zweifacher Anstieg der Immunantwort in der Influenza-Gruppe im Gegensatz zur HIV-Gruppe innerhalb einer Tumorzelllinie wurde als positive Antwort gewertet.

3.2.2 Analyse der T-Zell-Erkennung nach in-vitro-Stimulation von HCC-Tumorzelllinien anhand eines Influenza-Modell-Antigens

Neben der direkten *ex-vivo*-Analyse mit Influenza-reaktiven T-Zellen erfolgte die Ko-Inkubation von Tumorzellen mit zuvor expandierten Influenza-spezifischen T-Zellen. Als weitere Kontrolle wurden die expandierten T-Zellen des HLA-A2 positiven Spenders nur mit Influenzapeptid stimuliert (in der Abbildung als Peptid gekennzeichnet). Gegen alle

HLA-A2 positiven Influenza-Peptid-beladenen Tumorzelllinien (Sk-Hep1 und HEP-G2) zeigten sich positive Zytokin-Antworten der CD8⁺ T-Zellen (siehe Abbildung 10).

Die Frequenzen der Zytokin-freisetzenden-T-Zellen des gesunden Spenders gegen die mit dem Influenza-Peptid beladenen Tumorzelllinien lagen bei der HCC-Tumorzelllinie HEP-G2 bei 10,3% IFN γ - und bei 6,41% TNF α -freisetzenden CD3⁺CD8⁺ T-Zellen.

Bei der hepatozellulären Tumorzelllinie Sk-Hep1 ergaben sich folgende Frequenzen von 6,92% IFN γ - und von 3,16% TNF α -freisetzenden CD3⁺CD8⁺ T-Zellen. Gegen die HLA-A2 negative HCC-Tumorzelllinie HUH-7 konnten keine positiven Zytokin-Antworten von IFN γ - und TNF α -freisetzenden T-Zellen nachgewiesen werden.

Da die Frequenzen der Zytokin-freisetzenden T-Zellen gegen die HCC-Tumorzelllinien ein ähnliches Niveau zeigten wie gegen die als Referenz geltende HLA-A2 positive Leukämiezelllinie UT7 oder die nur mit Influenza-Peptid ohne weitere Tumorzelllinie stimulierten Spender-T-Zellen, lässt sich folgende Aussage ableiten: HCC-assoziierte Tumorzelllinien scheinen in der Lage zu sein Peptide zu präsentieren und dadurch eine Immunantwort mit den Zytokinen IFN γ und TNF α bei T-Zellen zu induzieren.

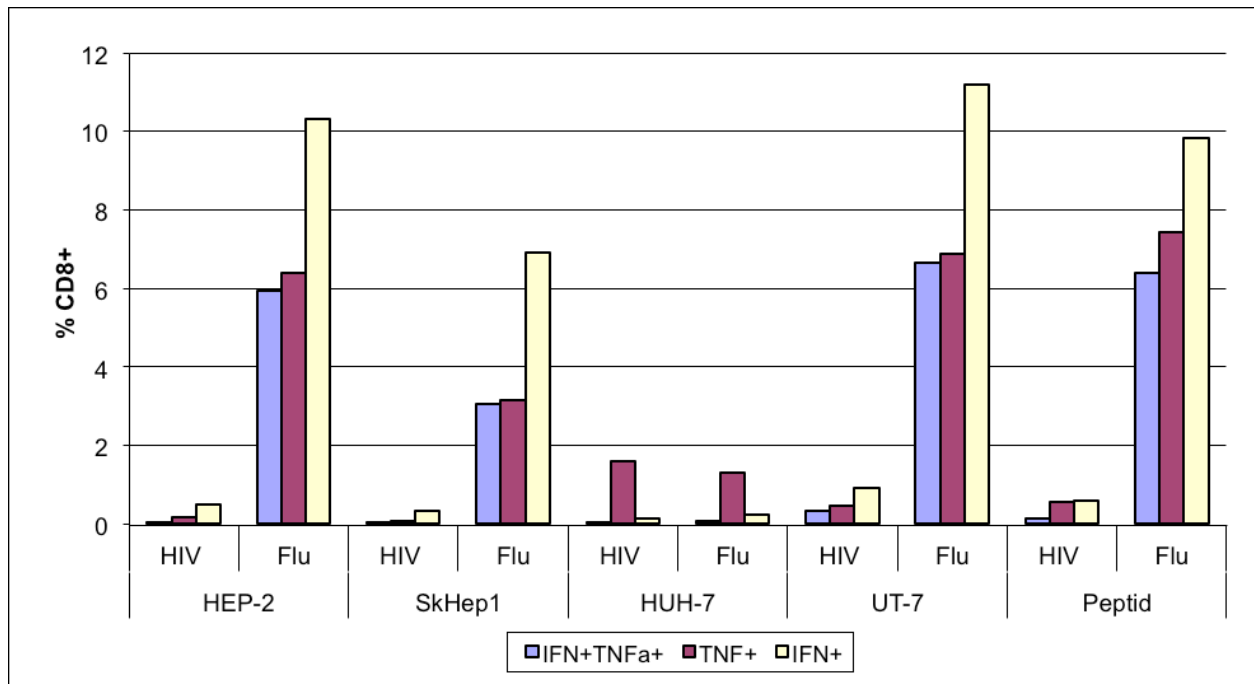


Abbildung 10: Immunantwort von spezifischen CD8⁺ T-Zellen gegen Tumorzellen. Gezeigt werden die drei HCC-Tumorzelllinien von denen zwei HLA-A2 positiv (HEP-G2, Sk-Hep1) und eine HLA-A2 negativ (HUH-7) sind. Außerdem wurde die HLA-A2 positive Leukämiezelllinie UT-7 als Referenz-Zelllinie eingesetzt. Die Weiteren werden unter Peptid die expandierten T-Zellen des HLA-A2 positiven Spenders, die nur mit Influenzapeptid stimuliert wurden, gezeigt. Dargestellt werden in Prozent die Frequenzen von TNFα-(rot) und IFNγ-(gelb)freisetzender und CD8⁺ T-Zellen bzw. die Frequenzen in Prozent der doppelt positiven TNFα/IFNγ(blau) freisetzender und CD8⁺ T-Zellen von einem auf das Influenza-Peptid positiv reagierenden HLA-A2 positiven Spender. Die T-Zellen des vorher genannten Spenders wurden über 10 bis 14 Tagen unter einmaliger Zugabe von Influenzapeptid (10µL/ml) und mehrmaliger Zugabe von IL-2 und IL-7 auf einer 96er well Platte expandiert. Die expandierten T-Zellen wurden 16 Stunden in Kontakt mit Influenza-(FLU) oder HIV-Peptid (HIV) beladenen Tumorzellen inkubiert. Ein zweifacher Anstieg der Immunantwort in der Influenza-Gruppe im Gegensatz zur HIV-Gruppe wurde als positive Antwort innerhalb einer Tumorzelllinie gewertet.

3.3 Spontane T-Zell-Antworten nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix

Die Analyse der spontanen Immunität von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen gegen WT1 von Patienten mit CH, LZ, HCC und von gesunden Kontrollpersonen erfolgte mittels Stimulation durch einen WT1-Peptidmix, bestehend aus 110 überlappenden Peptiden. Die PBMCs der zu untersuchenden Personen inkubierten für 16 Stunden entweder mit dem WT1-Peptidmix oder mit DMSO als Negativ-Kontrolle mit einer Konzentration von 1µg/ml. Danach wurden die Proben mit Fluochrommarkierten-Antikörpern nach einem in unserem Labor etablierten Färbeprotokoll gefärbt (siehe Methodenteil) und nach der in Abbildung 11 gezeigten Gating-Strategie ausgewertet. Kleine Lymphozyten (Gate I) werden nach Herausfilterung toter Zellen (Gate II FSC-H/FSC-A und Gate III Vivid

Gate) und „gaten“ auf $CD3^+$ T-Zellen (Gate IV) herausgefiltert. Daraufhin wird diese Population in $CD3^+CD4^+$ T-Zellen und in $CD3^+CD8^+$ T-Zellen eingeteilt (Gate V). Als letzter Schritt werden von $CD3^+CD4^+$ und von den $CD3^+CD8^+$ T-Zellen die Zytokin-Antworten ($TNF\alpha$ und $IFN\gamma$) gemessen (Gate IV).

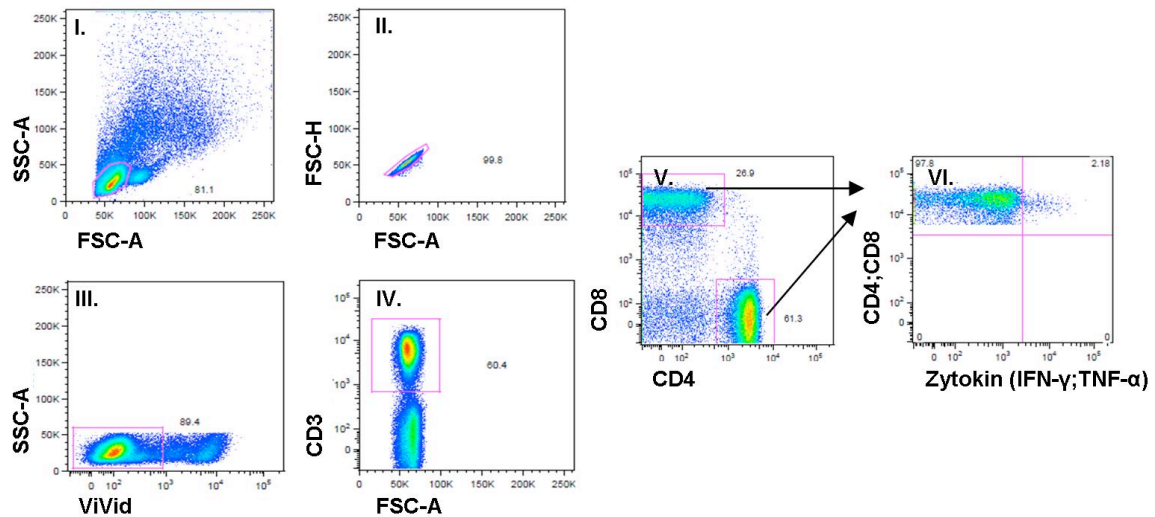


Abbildung 11. Auswertungsstrategie zur Identifizierung von $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen und deren Zytokinsekretion. I.: Lymphozyten gate. II.: FSH-H/FSC-A. III.: Vivid gate. IV.: $CD3^+$ /FSC-A. V.: $CD8^+$ / $CD4^+$. VI.: $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ und Zytokine ($TNF\alpha^+$, $IFN\gamma^+$).

Als positive Immunantwort definieren wir eine Verdopplung des Anteils an $CD3^+CD8^+$ bzw. $CD3^+CD4^+$ Zytokin-produzierender T-Zellen im Vergleich zur Stimulation mit DMSO. Die positive Immunantwort ist in den folgenden Balkendiagrammen als schwarz eingefärbter Balken markiert. Eine negativ gewertete Immunantwort wird in grau gerahmten Balken dargestellt.

Die statistischen Analysen erfolgten hierbei mit dem Mann-Whitney-Test und die Varianzanalyse mit dem Kruskal-Wallis Test. Für die statistischen Analysen wurde der prozentuale Anteil der $CD4^+IFN\gamma^+/TNF\alpha^+/CD137^+$ bzw. $CD8^+IFN\gamma^+/TNF\alpha^+/CD137^+$ T-Zellen innerhalb der $CD3^+$ T-Zell-Population verwendet. Was im folgendem als $CD4^+INF^+/TNF\alpha^+/CD137^+$ bzw. als $CD8^+IFN\gamma^+/TNF\alpha^+/CD137^+$ T-Zellen beschrieben wird.

3.3.1 Spontane WT1-spezifische CD4⁺ T-Zellen

In der Population der CD3⁺CD4⁺ T-Zellen konnte nach Stimulation der Zellen mit dem WT1-Peptidmix die Freisetzung von IFN γ (n= 3), TNF α (n= 7) bei insgesamt 21 Patienten in der HCC-Gruppe nachgewiesen werden. Die IFN γ -Zytokin-Antworten lagen bei 15%, 1,59%, und bei 0,45% der CD3⁺CD4⁺ T-Zellen bei einem Median von 0,32% der CD3⁺CD4⁺ T-Zellen. Die TNF α -Zytokin-Antworten waren bei 2,44%, 2,32%, 2,26%, 1,32%, 0,72%, 0,26%, 0,24%, der CD3⁺CD4⁺ T-Zellen bei einem Median von 0,25% der CD3⁺CD4⁺ T-Zellen.

In der LZ-Gruppe zeigten 4 von 23 Patienten positive Immunantworten der CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix. Hierbei lag die Verteilung von IFN γ -produzierender-T-Zellen (n= 1) mit einer Frequenz von 0,09% der CD3⁺CD4⁺ T-Zellen und von TNF α -produzierender-T-Zellen (n= 3) mit einer Frequenz von 2,34%, 1,75%, und 0,24% der CD3⁺CD4⁺ T-Zellen bei einem Median von 0,24% der CD3⁺CD4⁺ T-Zellen.

In der CH-Gruppe zeigten 3 von 20 Patienten eine positive Zytokin-Antwort der CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix. Hierbei lagen die IFN γ -Frequenzen (n= 3) bei 1,65%, 0,41% und 0,22% und der CD3⁺CD4⁺ T-Zellen bei einem Median von 0,25% der CD3⁺CD4⁺ T-Zellen. Die TNF α -Frequenzen betragen 0,44% und 0,11% der CD3⁺CD4⁺ T-Zellen (n= 2, Median 0,11%).

In der gesunden Kontrollgruppe konnten keine positive Zytokin-Produktion der CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix nachgewiesen werden (siehe Abbildung 12, Abbildung 13, Abbildung 14).

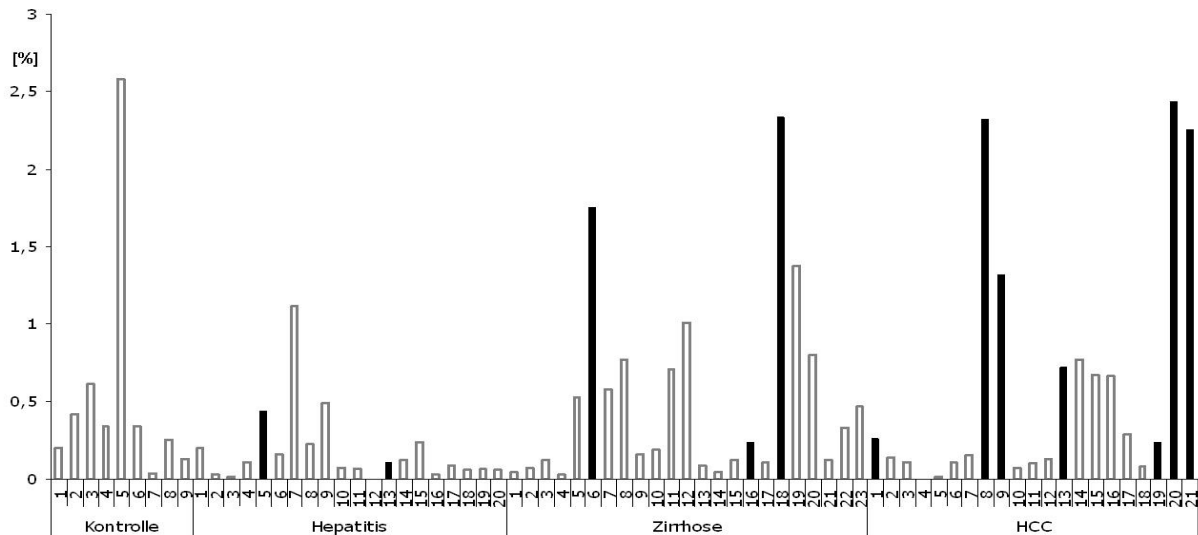


Abbildung 12: CD3⁺CD4⁺ T-Zell TNF α -Zytokin-Antworten nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix. Dargestellt sind die Frequenzen der CD3⁺CD4⁺TNF α ⁺ Zytokin-Antworten von Patienten mit chronischer Hepatitis (CH), Leberzirrhose (LZ), HCC oder der gesunden Spender in der Kontrollgruppe (Kontrolle) nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix. Eine zweifache Erhöhung der Zytokin-Antwort in der WT1-Peptidmix-stimulierten Probe im Vergleich zur DMSO stimulierten Probe wurde als positive Antwort gewertet und ist in der Abbildung als schwarz gefärbter Balken gezeigt. Die grau gerahmten Balken zeigen die als negativ gewerteten Zytokin-Antworten. Die Proben wurden entweder mit WT1-Peptidmix oder mit DMSO in einer Konzentration von 1 μ g/ml für 16 Stunden stimuliert und danach nach einem in unserem Labor etablierten Färbeprotokoll mit Fluochrommarkierten-Antikörpern gefärbt (siehe auch Methodenteil).

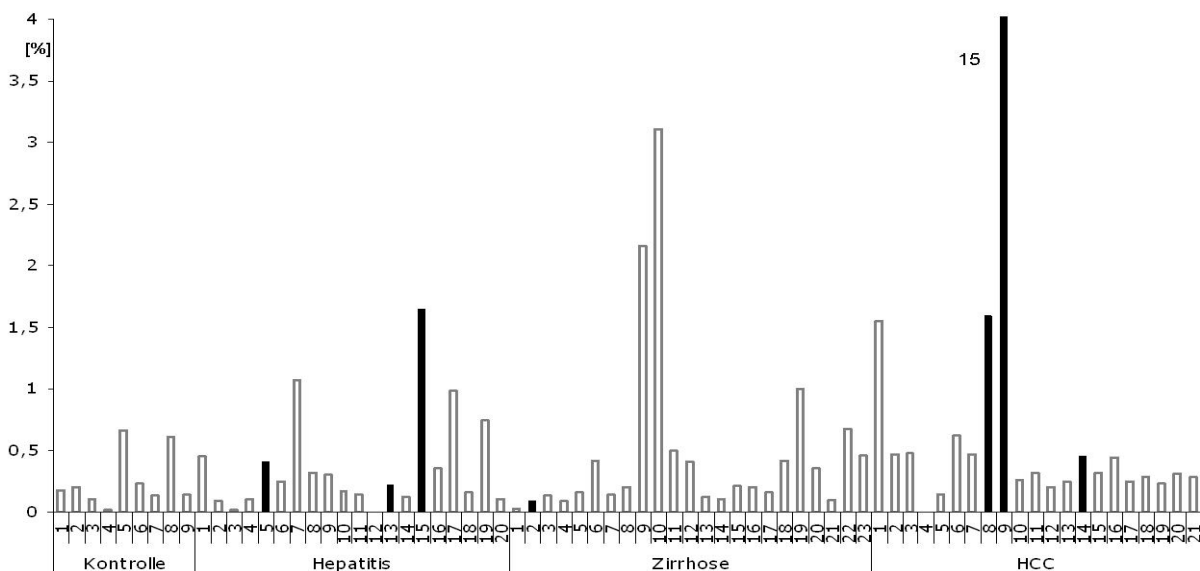


Abbildung 13: CD3⁺CD4⁺ T-Zell IFN γ -Zytokin-Antworten nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix. Dargestellt sind die Frequenzen der CD3⁺CD4⁺IFN γ ⁺ Zytokin-Antworten von Patienten mit chronischer Hepatitis (CH), Leberzirrhose (LZ), HCC oder der gesunden Spender in der Kontrollgruppe (Kontrolle) nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix. Eine zweifache Erhöhung der Zytokin-Antwort in der WT1-Peptidmix stimulierten Probe im Vergleich zur DMSO stimulierten Probe wurde als positive Antwort gewertet und ist in der Abbildung als schwarz gefärbter Balken gezeigt. Die grau gerahmten Balken zeigen die als negativ gewerteten Zytokin-Antworten. Die Proben wurden entweder mit WT1-Peptidmix oder mit DMSO in einer Konzentration von 1 μ g/ml für 16 Stunden stimuliert und danach nach einem in unserem Labor etablierten Färbeprotokoll mit Fluochrommarkierten-Antikörpern gefärbt (siehe auch Methodenteil).

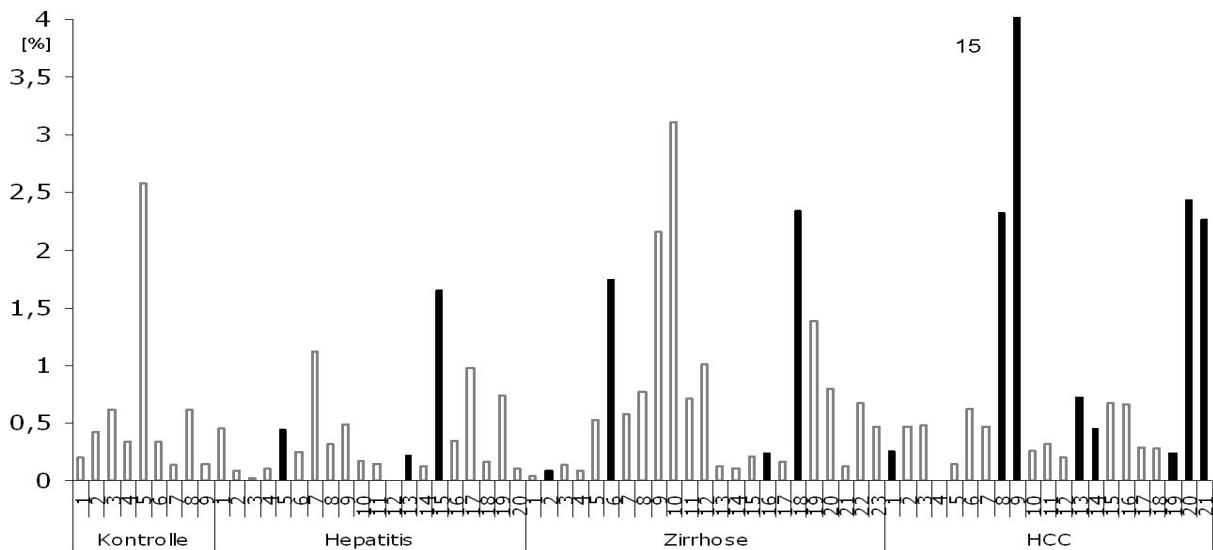


Abbildung 14: CD3⁺CD4⁺ T-Zell-Zytokin-Antworten nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix. Dargestellt sind die Frequenzen der CD3⁺CD4⁺ TNFα⁺ oder IFNγ⁺ Zytokin-Antworten von Patienten mit chronischer Hepatitis (CH), Leberzirrhose (LZ), HCC oder der gesunden Spender in der Kontrollgruppe (Kontrolle) nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix. Es wurden in dieser Abbildung die jeweils höheren Zytokin-Antworten (TNFα, IFNγ) der CD3⁺CD4⁺ T-Zellen gewertet. Eine zweifache Erhöhung der Zytokin-Antwort in der WT1-Peptidmix stimulierten Probe im Vergleich zur DMSO stimulierten Probe wurde als positive Antwort gewertet und ist in der Abbildung als schwarz gefärbter Balken gezeigt. Die grau gerahmten Balken zeigen die als negativ gewerteten Zytokin-Antworten. Die Proben wurden entweder mit WT1-Peptidmix oder mit DMSO in einer Konzentration von 1µg/ml für 16 Stunden stimuliert und danach nach einem in unserem Labor etablierten Färbeprotokoll mit Fluochrommarkierten-Antikörpern gefärbt (siehe auch Methodenteil).

Es konnte ein signifikanter Unterschied der Frequenzen der WT1-spezifischen CD4⁺IFNγ⁺ T-Zellen zwischen der HCC-Gruppe (Mittelwert 0,74%, Median 0,18, Bereich 0,041-9,9%, n=20, p= 0,0034) und der Kontrollgruppe (Mittelwert 0,11%, Median 0,09%, Bereich 0,01%-0,33%, n=9) sowie zwischen der HCC-Gruppe (Mittelwert 0,74%, Median 0,18, Bereich 0,041-9,9%, n=20, p= 0,0360) und der CH-Gruppe (Mittelwert 0,21%, Median 0,13%, Bereich 0,01%-1,10%, n=20) gezeigt werden.

Außerdem konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Frequenzen der WT1-spezifischen CD4⁺TNFα⁺ T-Zellen der HCC-Gruppe (Mittelwert 0,38%, Median 0,14%, Bereich 0,01%-1,47%, n= 20, p= 0,0104) und der CH-Gruppe (Mittelwert 0,09%, Median 0,05%, Bereich 0,01%-0,37%, n=20) gezeigt werden. Des Weiteren zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Frequenzen der WT1-spezifischen CD4⁺TNFα⁺ T-Zellen zwischen der LZ-Gruppe (Mittelwert 0,35%, Median 0,13%, Bereich 0,02%-

1,64%, n=23) und der CH-Gruppe (Mittelwert 0,09%, Median 0,05%, Bereich 0,01%-0,37%, n=20, p= 0,002).

Zwischen den Frequenzen der WT1-spezifischen CD4⁺IFN γ ⁺ T-Zellen zeigte sich zwischen der HCC-Gruppe (Mittelwert 0,74%, Median 0,18, Bereich 0,041-9,9%, n=20, p= 0,096) und der LZ-Gruppe (Mittelwert 0,33%, Median 0,14%, Bereich 0,02-1,97%, n= 23) sowie zwischen den Frequenzen der WT1-spezifischen CD4⁺ TNF α ⁺ T-Zellen der HCC-Gruppe (Mittelwert 0,38%, Median 0,14%, Bereich 0,01%-1,47%, n= 20, p= 0,418) und LZ-Gruppe (Mittelwert 0,34%, Median 0,13%, Bereich 0,02%-1,64%, n=23) kein signifikanter Unterschied.

Die Auswertung des Kruskal-Wallis-Test ergab für die CD4⁺TNF α ⁺ T-Zellen einen signifikanten Unterschied mit p=0,0176 für CD4⁺IFN γ ⁺ T-Zellen einen nahezu signifikanten Unterschied mit einem p= 0,054.

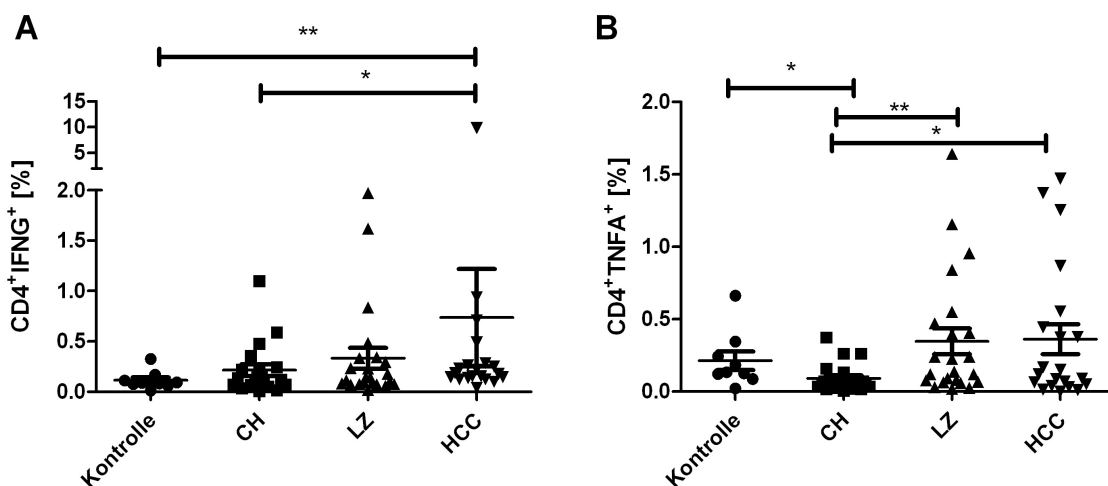


Abbildung 15: CD4⁺IFN γ ⁺ und CD4⁺TNF α ⁺ Frequenzen bei hepatologischen Erkrankungen und bei der gesunden Kontrollgruppe. Die Frequenzen werden als Prozent innerhalb der CD3⁺ T-Zellen dargestellt. Die Gruppen werden unterteilt in eine gesunde Kontrollgruppe (Kontrolle n=9), chronische Hepatitis-Gruppe (CH, n=20), Leberzirrhose-Gruppe(LZ, n=23) und HCC-Gruppe (HCC; n=20).* p<0,05, ** p< 0,01, *** p<0,0001

3.3.2 Spontane CD8⁺ T-Zellen

In der CD3⁺CD8⁺ T-Zell-Population konnten nach Stimulation der Zellen mit dem WT1-Peptidmix die Freisetzung von IFN γ (n= 4), TNF α (n= 7) bei insgesamt 21 Patienten in der HCC-Gruppe nachgewiesen werden. Die IFN γ -Zytokin-Frequenzen lagen bei 29%, 1,92%, 0,63% und 0,49% der CD3⁺CD8⁺ T-Zellen bei einem Median von 0,64% der CD3⁺CD8⁺ T-Zellen und die TNF α -Zytokin-Frequenzen lagen bei 3,39%, 2,89%, 2,72%, 2,38%, 1,23%, 1,05% und 0,57% der CD3⁺CD8⁺ T-Zellen bei einem Median von 0,99% der CD3⁺CD8⁺ T-Zellen.

In der LZ-Gruppe zeigten 6 von 23 Patienten positive Immunantworten der CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix. Hierbei lag die Verteilung von IFN γ -produzierender-T-Zellen (n= 3) mit einer Frequenz von 0,70%, 0,52% und 0,48% der CD3⁺CD8⁺ T-Zellen bei einem Median von 0,70% der CD3⁺CD8⁺ T-Zellen und von TNF α -produzierender-T-Zellen (n= 4) mit einer Frequenz von 5,39%, 2,24%, 0,92% und 0,74%, der CD3⁺CD8⁺ T-Zellen bei einem Median von 0,92% der CD3⁺CD8⁺ T-Zellen.

In der CH-Gruppe zeigten 5 von 20 Patienten eine positive Zytokin-Antwort der CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix. Hierbei lagen die IFN γ -Frequenzen (n= 3) bei 3,5%, 1,74% und 1,58%, der CD3⁺CD8⁺ T-Zellen bei einem Median von 0,80% der CD3⁺CD8⁺ T-Zellen. Die TNF α -Frequenzen betragen 6,82%, 2,13%, 0,41% und 0,12% der CD3⁺CD8⁺ T-Zellen (n= 4, Median 1,05).

Die gesunde Kontrollgruppe zeigte keine positive Zytokin-Produktion der CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix. (siehe auch Abbildung 19, Abbildung 17, Abbildung 18).

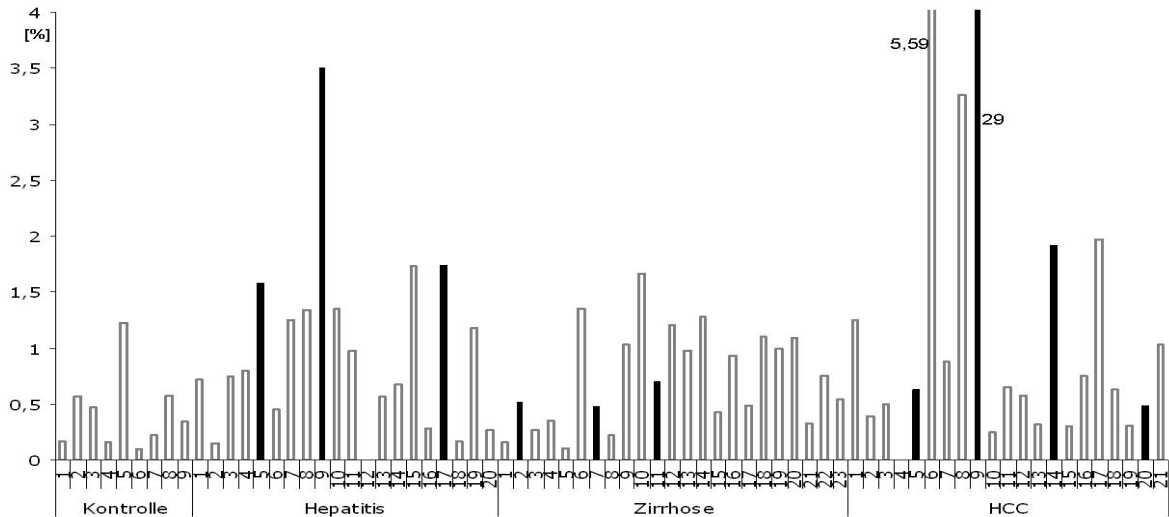


Abbildung 16: CD3⁺CD8⁺ T-Zell IFN γ -Zytokin-Antworten nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix. Dargestellt sind die Frequenzen der CD3⁺CD8⁺IFN γ ⁺-Zytokin-Antworten von Patienten mit chronischer Hepatitis (CH), Leberzirrhose (LZ), HCC oder der gesunden Spender in der Kontrollgruppe (Kontrolle) nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix. Eine zweifache Erhöhung der Zytokin-Antwort in der WT1-Peptidmix stimulierten Probe im Vergleich zur DMSO stimulierten Probe wurde als positive Antwort gewertet und ist in der Abbildung als schwarz gefärbter Balken gezeigt. Die grau gerahmten Balken zeigen die als negativ gewerteten Zytokin-Antworten. Die Proben wurden entweder mit WT1-Peptidmix oder mit DMSO in einer Konzentration von 1 μ g/ml für 16 Stunden stimuliert und danach nach einem in unserem Labor etablierten Färbeprotokoll mit Fluochrommarkierten-Antikörpern gefärbt (siehe auch Methodenteil).

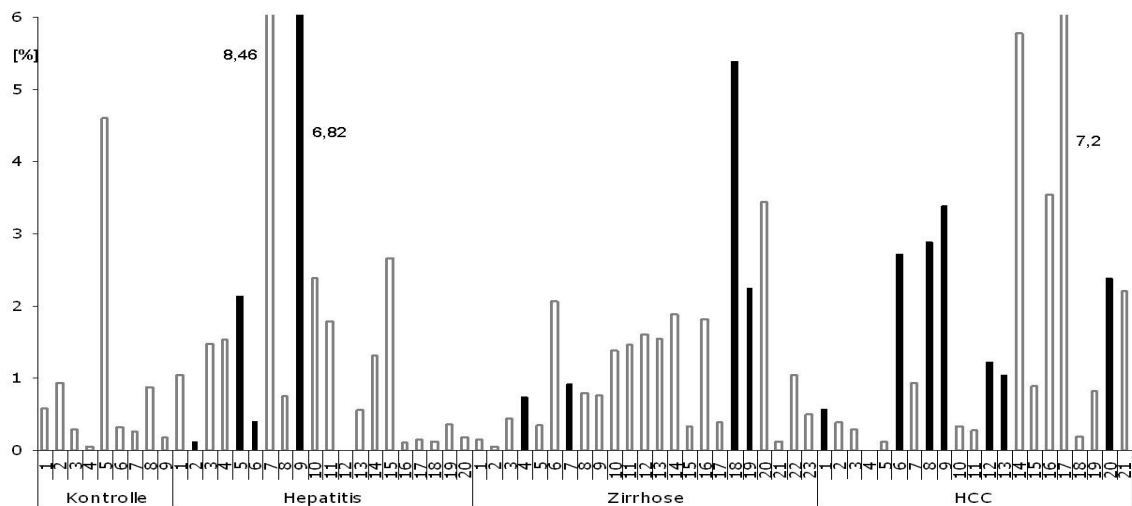


Abbildung 17: CD3⁺CD8⁺ T-Zell TNF α -Zytokin-Antworten nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix. Dargestellt sind die Frequenzen der CD3⁺CD8⁺TNF α ⁺-Zytokin-Antworten von Patienten mit chronischer Hepatitis (CH), Leberzirrhose (LZ), HCC oder der gesunden Spender in der Kontrollgruppe (Kontrolle) nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix. Eine zweifache Erhöhung der Zytokin-Antwort in der WT1-Peptidmix stimulierten Probe im Vergleich zur DMSO stimulierten Probe wurde als positive Antwort gewertet und ist in der Abbildung als schwarz gefärbter Balken gezeigt. Die grau gerahmten Balken zeigen die als negativ gewerteten Zytokin-Antworten. Die Proben wurden entweder mit WT1-Peptidmix oder mit DMSO in einer Konzentration von 1 μ g/ml für 16 Stunden stimuliert und danach nach einem in unserem Labor etablierten Färbeprotokoll mit Fluochrommarkierten-Antikörpern gefärbt (siehe auch Methodenteil).

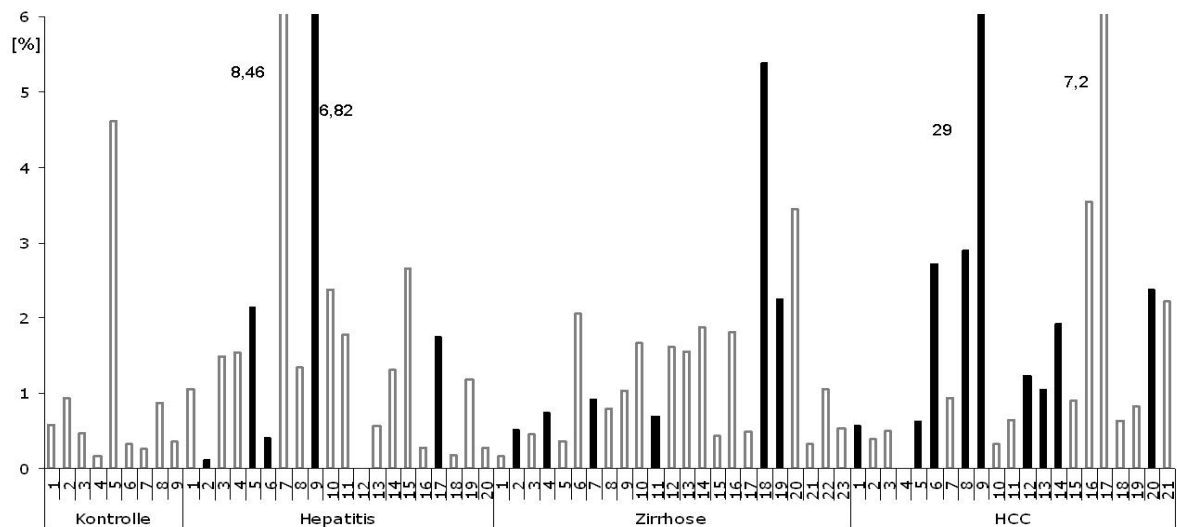


Abbildung 18: CD3⁺CD8⁺ T-Zell-Zytokin-Antworten nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix. Dargestellt sind die Frequenzen der CD3⁺CD8⁺ TNFα⁺- oder IFNγ⁺-Zytokin-Antworten von Patienten mit chronischer Hepatitis (CH), Leberzirrhose (LZ), HCC oder der gesunden Spender in der Kontrollgruppe (Kontrolle) nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix. Es wurden in dieser Abbildung die jeweils höheren Zytokin-Antworten (entweder TNFα oder IFNγ) der CD3⁺CD8⁺ T-Zellen gewertet. Eine zweifache Erhöhung der Zytokin-Antwort in der WT1-Peptidmix stimulierten Probe im Vergleich zur DMSO stimulierten Probe wurde als positive Antwort gewertet und ist in der Abbildung als schwarz gefärbter Balken gezeigt. Die grau gerahmten Balken zeigen die als negativ gewerteten Zytokin-Antworten. Die Proben wurden entweder mit WT1-Peptidmix oder mit DMSO in einer Konzentration von 1µg/ml für 16 Stunden stimuliert und danach nach einem in unserem Labor etablierten Färbeprotokoll mit Fluochrommarkierten-Antikörpern gefärbt (siehe auch Methodenteil).

Es konnte ein signifikanter Unterschied der Frequenzen der WT1-spezifischen CD8⁺IFNγ⁺ T-Zellen zwischen der HCC-Gruppe (Mittelwert 0,74%, Median 0,26%, Bereich 0,04-7,7%, n=20, p= 0,0029) und der Kontrollgruppe (Mittelwert 0,15%, Median 0,07%, Bereich 0,01%-0,71%, n=9) sowie zwischen der LZ-Gruppe (Mittelwert 0,22%, Median 0,17%, Bereich 0,046-0,60%, n=23, p= 0,02) und der gesunden Kontrollgruppe (Mittelwert 0,15%, Median 0,07%, Bereich 0,01%-0,71%, n=9) als auch zwischen der CH-Gruppe (Mittelwert 0,37%, Median 0,35%, Bereich 0,05-1,53%, n=20, p=0,011) und der gesunden Kontrollgruppe (Mittelwert 0,15%, Median 0,07%, Bereich 0,01%-0,71%, n=9) gezeigt werden (siehe Abbildung 19).

Außerdem konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Frequenzen der WT1-spezifischen CD8⁺TNFα⁺ T-Zellen der HCC-Gruppe (Mittelwert 0,66%, Median 0,33%, Bereich 0,01%-3,0%, n= 20, p= 0,023) und der gesunden Kontrollgruppe (Mittelwert 0,40%, Median 0,08%, Bereich 0,05-2,66%, n=9) sowie zwischen LZ-Gruppe (Mittelwert 0,40%, Median 0,23%, Bereich 0,01-1,73%, n=23, p= 0,047) und der gesunden

Kontrollgruppe (Mittelwert 0,40%, Median 0,08%, Bereich 0,05-2,66%, n=9) gezeigt werden.

Zwischen den Frequenzen der WT1-spezifischen $CD8^+TNF\alpha^+$ T-Zellen zeigte sich zwischen der CH-Gruppe (Mittelwert 0,67%, Median 0,33%, Bereich 0,036-4,1%, n=20) und der gesunden Kontrollgruppe (Mittelwert 0,40%, Median 0,08%, Bereich 0,05-2,66%, n=9) kein signifikanter Unterschied (Abbildung 19).

Die Auswertung des Kruskal-Wallis-Test ergab für die $CD8^+IFN\gamma^+$ T-Zellen einen signifikanten Unterschied mit einem $p=0,02$ und für $CD8^+TNF\alpha^+$ T-Zellen keinen signifikanten Unterschied mit einem $p=0,26$.

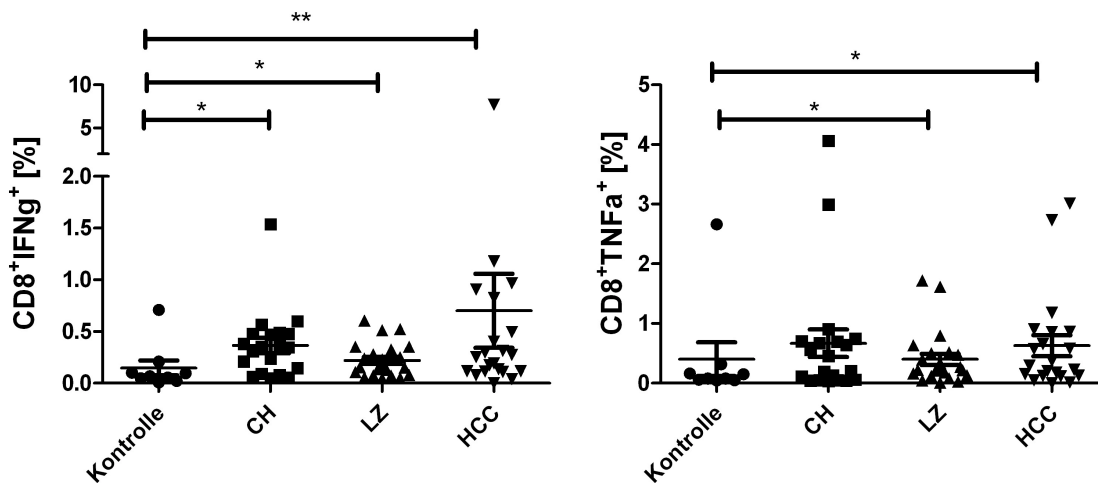


Abbildung 19: $CD8^+IFN\gamma^+$ - und $CD8^+TNF\alpha^+$ -Frequenzen bei hepatologischen Erkrankungen und bei der gesunden Kontrollgruppe. Die Frequenzen werden als Prozent innerhalb der $CD3^+$ T-Zellen dargestellt. Die Gruppen werden unterteilt in eine gesunde Kontrollgruppe (Kontrolle n=9), chronische Hepatitis-Gruppe (CH, n=20), Leberzirrhose-Gruppe(LZ, n=23) und HCC-Gruppe (HCC; n=20).* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,0001$

3.3.3 Analyse des Aktivierungsmarkers CD137 auf CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺-T-Helfer-Zellen

Der Aktivierungsmarker CD137 gehört zur *tumor necrosis factor*-Rezeptor-Familie und wird auch als *4-1BB* oder *TNFR superfamily 9* bezeichnet [155]. Er wird auf aktivierten CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen exprimiert und ist auch noch auf anderen Zellen beschrieben worden [156]. Es wird angenommen, dass über den CD137-Rezeptor eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert wird [157], die zur Aktivierung von NF-kappaB und zur Kostimulation von T-Zell-Wachstum sowie zur Aktivitätssteigerung von T-Zellen führt [157, 158].

Daher untersuchten wir die CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen auf das Vorkommen des Aktivierungsmarkers CD137 nach dem im Methodenteil beschriebenen Färbetechniken. In der HCC-Gruppe hatten 4 von 21 Patienten WT1-spezifische CD4⁺CD137⁺ T-Zellen mit Frequenzen von 0,14%, 0,12%, 0,12% und 0,09% der CD4⁺CD137⁺ T-Zellen (Median 0,12%); und 4 von 21 HCC-Patienten hatten WT1-spezifische CD8⁺CD137⁺ T-Zellen mit Frequenzen von 0,23%, 0,11%, 0,09% und 0,087% der CD8⁺CD137⁺ T-Zellen (Median 0,18%). Zwei HCC-Patienten zeigten sowohl CD4⁺CD137⁺ T-Zellen als auch CD8⁺CD137⁺ T-Zellen.

In der Gruppe der LZ-Patienten hatten 4 von 23 Patienten WT1-spezifische CD4⁺CD137⁺ T-Zellen mit Frequenzen von 0,26%, 0,23%, 0,18% und 0,12% der CD4⁺CD137⁺ T-Zellen (Median 0,10%). Die Frequenzen der WT1-spezifischen CD8⁺CD137⁺ T-Zellen lagen bei 2 von 23 Patienten bei 0,22% und 0,18% der CD8⁺CD137⁺ T-Zellen (Median 0,16%).

Unter den CH-Patienten fielen die Ergebnisse wie folgt aus: Es gab 3 von 20 CH-Patienten mit WT1-spezifischen CD4⁺CD137⁺ T-Zellen. Die Frequenzen waren bei 0,25%, 0,04% und 0,03% der CD4⁺CD137⁺ T-Zellen (Median 0,03%,). Kein Patient innerhalb der CH-Patientengruppe zeigte WT1-spezifische CD8⁺CD137⁺ T-Zellen. Die Daten sind hier nicht graphisch dargestellt.

Zwischen der HCC-Gruppe (Mittelwert 0,27%, Median 0,06%, Bereich 0,01%-3,03%, n=20) und der gesunden Kontrollgruppe (Mittelwert 0,03%, Median 0,02%, Bereich 0,02%-0,04%, n=5) ergab sich ein signifikanter Unterschied der WT1-spezifischen CD4⁺CD137⁺ T-Zellen mit einem p=0,019. Außerdem gab es einen signifikanten Unterschied der WT1-spezifischen CD4⁺CD137⁺ T-Zellen zwischen der LZ-Gruppe

(Mittelwert 0,08%, Median 0,07%, Bereich 0,01-0,18%) und der gesunden Kontrollgruppe (Mittelwert 0,03%, Median 0,02%, Bereich 0,02-0,04%, n=5) mit einem $p=0,002$ (siehe Abbildung 20).

Des Weiteren gab es einen signifikanten Unterschied zwischen der HCC-Gruppe (Mittelwert 0,27%, Median 0,06 %, Bereich 0,01-3,03, n=20) und der CH-Gruppe (Mittelwert 0,03%, Median 0,02%, 0,004-0,15%, n=20) der WT1-spezifischen $CD4^+CD137^+$ T-Zellen mit $p=0,0003$ sowie zwischen der LZ-Gruppe (Mittelwert 0,08%, Median 0,07%, Bereich 0,01-0,18%, n=20) und der CH-Gruppe (Mittelwert 0,03%, Median 0,02%, 0,004-0,15%, n=20) mit einem $p<0,0001$. Zwischen der HCC-Gruppe und der LZ-Gruppe bestand kein signifikanter Unterschied (siehe Abbildung 20).

Für die WT1-spezifischen $CD8^+CD137^+$ T-Zellen gab es einen signifikanten Unterschied zwischen der HCC-Gruppe (Mittelwert 0,08%, Median 0,05%, Bereich 0,01-0,46%, n=19) und der CH-Gruppe (Mittelwert 0,02%, Median 0,02%, Bereich 0,01-0,04%, n=20) mit $p=0,0003$ sowie zwischen der LZ-Gruppe (Mittelwert 0,07%, Median 0,04%, Bereich 0,01-0,25%, n=20) und CH-Gruppe (Mittelwert 0,02%, Median 0,02%, Bereich 0,01-0,04%, n=20) mit $p=0,002$ (siehe Abbildung 20).

Der Kruskal-Wallis Test zur Varianzanalyse war sowohl für die $CD4^+CD137^+$ -T-Zellen ($p<0,0001$) als auch für die $CD8^+CD137^+$ -T-Zellen ($p=0,002$) signifikant.

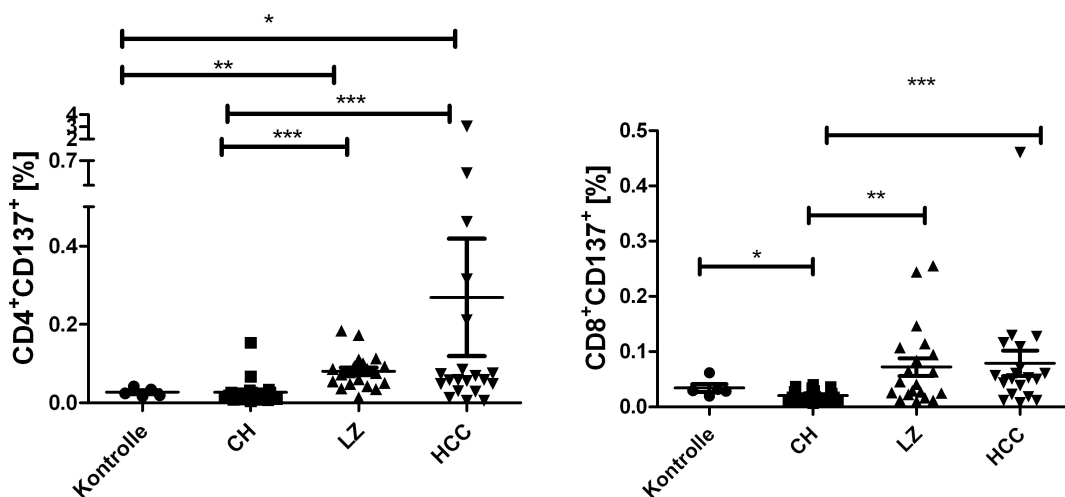


Abbildung 20: $CD4^+CD137^+$ - und $CD8^+CD137^+$ -Frequenzen bei hepatologischen Erkrankungen und bei der gesunden Kontrollgruppe. Die Frequenzen werden als Prozent innerhalb der $CD3^+$ T-Zellen dargestellt. Die Gruppen werden unterteilt in gesunde Kontrollgruppe (Kontrolle n=5), chronische Hepatitis-Gruppe (CH, n=20), Leberzirrhose-Gruppe (LZ, n=20) und HCC-Gruppe (HCC; n=20). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,0001$

3.4 T_{reg} -Frequenzen im peripheren Blut von Patienten mit HCC, LZ und CH sowie der gesunden Kontrollgruppe nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix

T_{regs} sind prinzipiell in der Lage die Immunantwort von $CD8^+$ bzw. $CD4^+$ T-Zellen einzuschränken oder zu unterdrücken [98, 100]. Somit könnte ein Vorhandensein von T_{regs} im peripheren Blut von Patienten mit HCC, LZ oder CH nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix eine eingeschränkte Zytokin-Antwort der $CD8^+$ bzw. $CD4^+$ T-Zellen auf den WT1-Peptidmix hervorrufen.

Wir analysierten daher die Frequenzen von $CD4^+CD25^+CD127^-$ T_{regs} im peripheren Blut von HCC-, LZ- und CH-Patienten sowie das periphere Blut von der gesunden Kontrollgruppe nach Stimulation mit WT1-Peptidmix.

Die Proben der Patienten (HCC, LZ, CH) und der gesunden Kontrollgruppe inkubierten 16 Stunden mit dem WT1-Peptidmix und wurden danach mit Fluochrommarkierten-Antikörpern nach einem in unserem Labor etablierten Versuchsprotokoll gefärbt (siehe auch Methodenteil).

Zur Auswertung der Probe wurde die folgende Gating-Strategie angewandt (siehe Abbildung 21): Kleine Lymphozyten (Gate I) werden nach Herausfilterung toter Zellen (Gate II FSC-H/FSC-A und Gate III Vivid Gate) und „gaten“ auf $CD3^+CD4^+$ T-Zellen (Gate IV) in $CD4^+CD25^+CD127^-$ eingeteilt (Gate V). Die $CD4^+CD25^+CD127^-$ T-Zellen werden nun im Gate VI auf ihre Sekretion von TGF β hin untersucht.

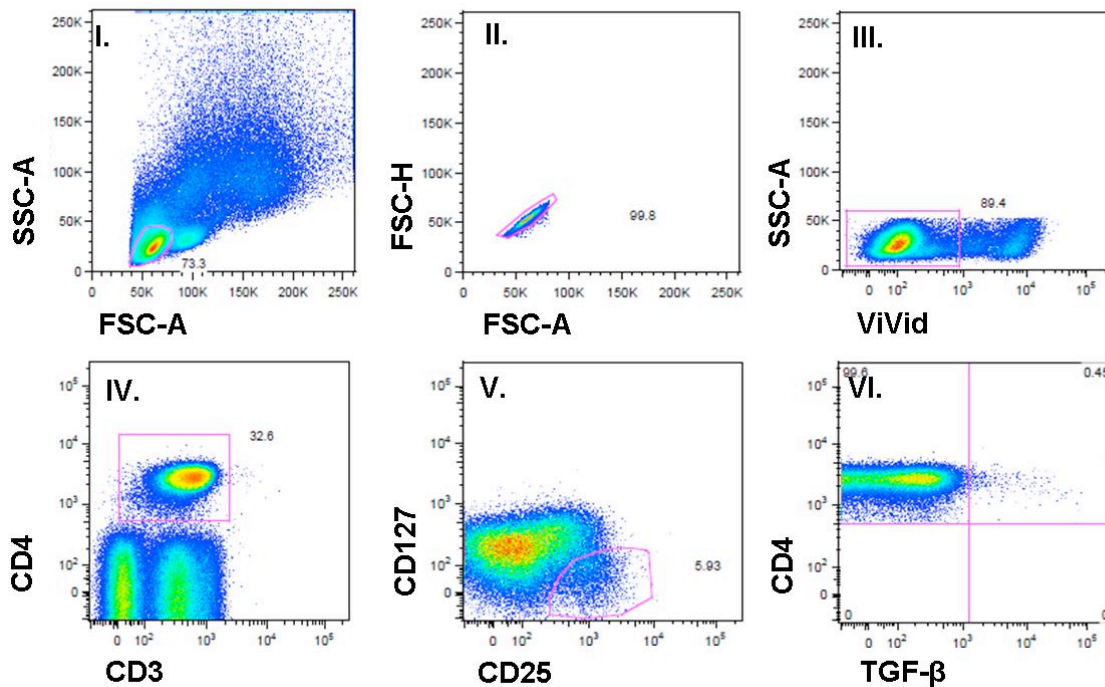


Abbildung 21: Auswertungsstrategie zur Identifizierung von T_{regs} und der Sekretion von $TGF\beta$. I.: Lymphozyten-Gate. II.: FSH-H/FSC-A. III.: Vivid-Gate. IV.: $CD3^+/CD4^+$. V.: $CD127^-/CD25^+$. $CD4^+/TGF\beta^+$.

Die statistischen Analysen erfolgten hierbei mit dem Mann-Whitney-Test und die Varianzanalyse mit dem Kruskal-Wallis Test. Für die statistischen Analysen wurde der prozentuale Anteil der $CD25^+CD127^-$ innerhalb der $CD3^+CD4^+$ Population verwendet. Ebenfalls wurde für die statistischen Analysen der prozentuale Anteil der $CD25^+CD127^-TGF\beta^+$ innerhalb der $CD4^+CD25^+CD127^-$ genommen. Was im Folgendem als $CD4^+CD25^+CD127^-$ bzw. $CD4^+CD25^+CD127^-TGF\beta^+$ T-Zellen beschrieben wird.

3.4.1 Analyse der T_{reg} -Frequenzen

Wir konnten zeigen, dass alle Erkrankungsgruppen (HCC-, LZ-, CH-Patienten) einen statistisch signifikanten Unterschied ihrer $CD4^+CD25^+CD127^-$ T-Zellen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe hatten: HCC-Gruppe (Mittelwert 1,37%, Median 1,19%, Bereich 0,66%-3,48%, n=15), LZ-Gruppe (Mittelwert 1,92%, Median 1,85%, Bereich 0,72%-3,70%, n=21), CH-Gruppe (Mittelwert 1,46%, Median 1,44%, Bereich 0,23%-3,46%, n=20), gesunde Kontrollgruppe (Mittelwert 0,32%, Median 0,24%, Bereich 0,14%-0,65%, n=8). Es zeigte sich damit ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen allen Erkrankungsgruppen und der gesunden Kontrollgruppe mit $p < 0,0001$.

Zusätzlich gab es einen signifikanten Unterschied zwischen der CH-Gruppe (Mittelwert 1,46%, Median 1,44%, Bereich 0,23-3,46%, n=20) und der LZ- Gruppe (Mittelwert 1,92%, Median 1,85%, Bereich 0,72-3,70%, n=21) mit $p=0,0105$.

Weiterhin zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der HCC-Gruppe (Mittelwert 1,37%, Median 1,19%, Bereich 0,66%-3,48%, n=15) und der LZ-Gruppe (Mittelwert 1,92%, Median 1,85%, Bereich 0,72-3,7%, n=21) mit $p=0,0039$, bemerkenswerterweise mit den höheren Frequenzen an T_{regs} in der LZ-Gruppe.

Zwischen der CH-Gruppe (Mittelwert 1,46%, Median 1,44%, Bereich 0,23-3,46%, n=20) und der HCC-Gruppe (Mittelwert 1,37%, Median 1,19%, Bereich 0,66%-3,48%, n= 15) konnte kein signifikanter Unterschied mit $p=0,26$ gezeigt werden (siehe unter Abbildung 22).

Der Kruskal-Wallis-Test zur Varianzanalyse der einzelnen Gruppen zeigte einen signifikanten Unterschied mit einem $p<0,0001$.

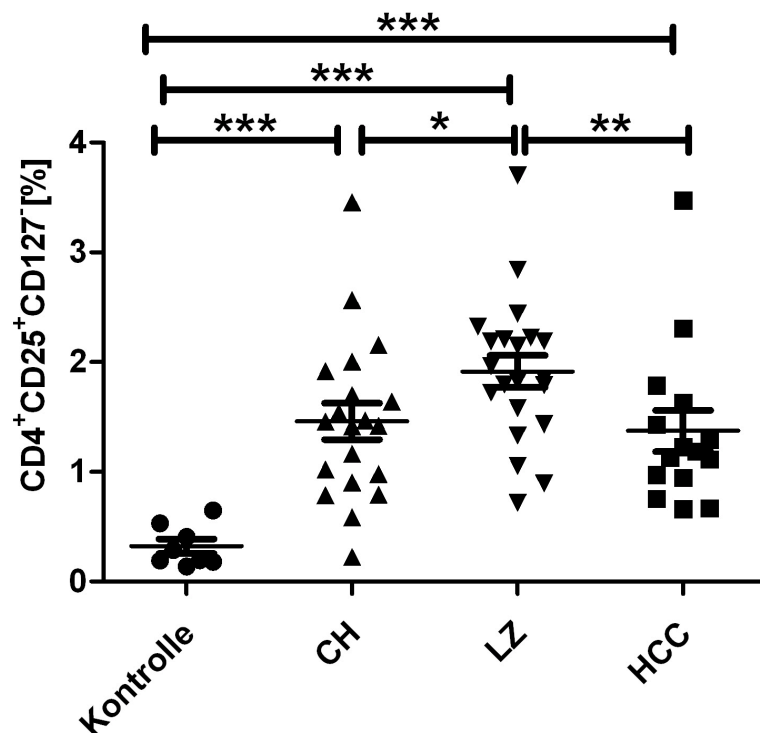


Abbildung 22: T_{reg} -Frequenzen bei hepatologischen Erkrankungen und bei der gesunden Kontrollgruppe. Die Frequenzen der $CD4^+CD25^+CD127^-$ T_{regs} werden als Prozent innerhalb der $CD4^+CD3^+$ T-Zellen dargestellt. Die Gruppen unterteilen sich in gesunde Kontrollgruppe (Kontrolle n=8), chronische Hepatitis-Gruppe (CH, n=20), Leberzirrhose-Gruppe (LZ, n=21) und HCC-Gruppe (HCC; n=20). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,0001$

3.4.2 Funktionelle Analyse der TGFβ-Sekretion von T_{regs}

Es ist bereits beschrieben, dass T_{regs} möglicherweise in der Lage sind das Zytokin TGFβ zu sezernieren [98] und dass TGFβ wahrscheinlich einen hemmenden Effekt auf CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen hat [98]. Es wurden bereits von unterschiedlichen Arbeitsgruppen erhöhte TGFβ-Frequenzen bei Patienten mit HCC beschrieben [159, 160].

Neben der Frequenz-Analyse der T_{regs} in den unterschiedlichen Krankheitsgruppen CH, LZ, HCC und der gesunden Kontrollgruppe (siehe unter 3.4.1) erfolgte daher eine zusätzliche funktionelle Charakterisierung der TGFβ-Sekretion von T_{regs}.

Die PBMCs der Patienten und gesunden Kontrollpersonen inkubierten 16 Stunden mit dem WT1-Peptidmix und wurden danach mit Fluochrommarkierten-Antikörpern nach einem in unserem Labor etablierten Versuchsprotokoll gefärbt. Danach wurden die Frequenzen der Sekretion von TGFβ der CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T_{regs} gemessen. Zur Auswertung der Proben wurde die folgende Auswertungsstrategie, welche im Punkt 3.4 beschrieben wird (siehe Abbildung 21), angewandt.

Insgesamt zeigten sich sehr geringe Frequenzen an CD25⁺CD127⁻ TGFβ⁺ T_{regs}.

In der Literatur wurden bereits erhöhte Frequenzen von T_{regs} sowohl im *tumor microenvironment* [160] als auch im peripheren Blut von HCC-Patienten beschrieben [159]. Die Frequenzen wurden hierbei im Serum gemessen und lagen bei TGFβ1 bei HCC-Patienten bei 130,51pg/ml (61-38-249,31 pg/ml) im Gegensatz zur gesunden Kontrollgruppe 74,12pg/ml (57,39-136,04 pg/ml) [159]. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den HCC-Patienten und der gesunden Kontroll-Gruppe [159].

Nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix konnten signifikante Unterschiede in den Frequenzen der CD4⁺CD25⁺CD127⁻TGFβ⁺ T_{regs} zwischen der gesunden Kontrollgruppe (Mittelwert 0,006%, Median 0,003%, Bereich 0,001-0,02%, n=8) und der HCC-Gruppe (Mittelwert 0,02%, Median 0,01%, Bereich 0,003-0,06%, n=15, p=0,0284) sowie zwischen der gesunden Kontrollgruppe (Mittelwert 0,006%, Median 0,003%, Bereich 0,001-0,02%, n=8) und der LZ-Gruppe (Mittelwert 0,011%, Median 0,01%, Bereich 0,003-0,03%, n=23, p=0,0248) gezeigt werden.

Außerdem zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der CH-Gruppe (Mittelwert 0,009%, Median 0,006%, Bereich 0,0005-0,07%, n=20) und der LZ-Gruppe (Mittelwert 0,011%, Median 0,01%, Bereich 0,003-0,03%, n=23, p=0,0129) sowie zwischen der

CH-Gruppe (Mittelwert 0,009%, Median 0,006%, Bereich 0,0005-0,07%, n=20) und der HCC-Gruppe (Mittelwert 0,02%, Median 0,01%, Bereich 0,003-0,06%, n=15, p=0,0237). Jedoch bestanden zwischen der gesunden Kontrollgruppe und der CH-Gruppe (p= 0,3705) sowie zwischen der LZ-Gruppe (p= 0,2954) und der HCC-Gruppe keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 23).

Der Kruskal-Wallis-Test zur Varianzanalyse für die $CD4^+CD25^+CD127^-TGF\beta^+$ T_{reg} -Frequenzen war für die Gruppen signifikant mit p=0,031.

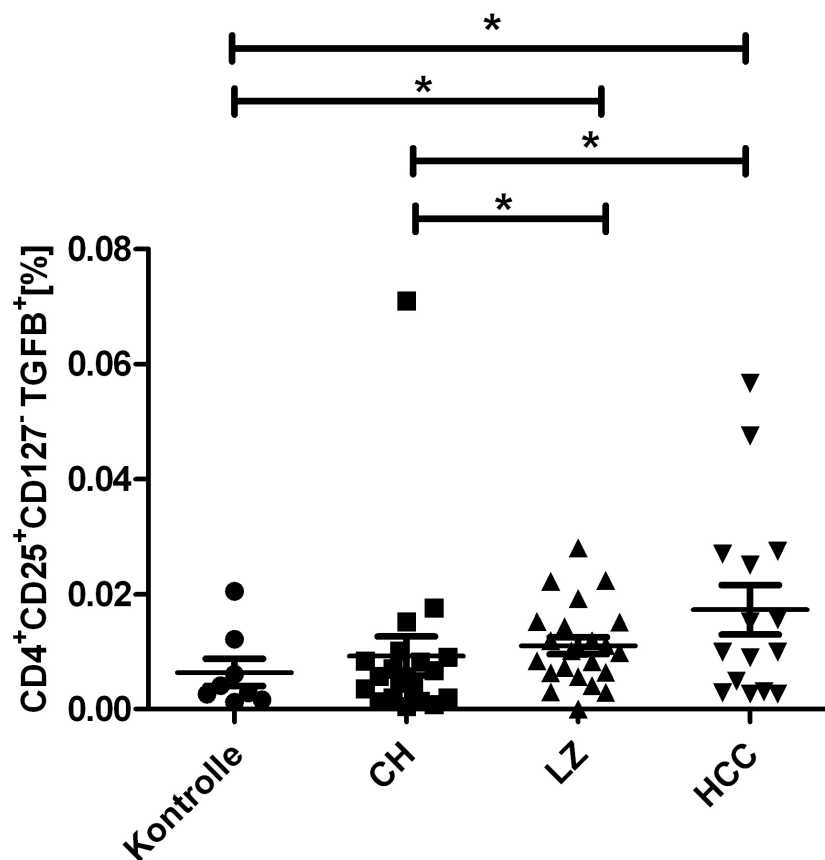


Abbildung 23: Funktionelle Analyse der TGFβ-Frequenzen bei hepatologischen Erkrankungen und bei der gesunden Kontrollgruppe. Die Frequenzen der $CD4^+CD25^+CD127^-TGF\beta^+$ T_{regs} werden als Prozent innerhalb der $CD4^+$ T-Zellen dargestellt. Die Gruppen unterteilen sich in eine gesunde Kontrollgruppe (Kontrolle n=8), chronische Hepatitis-Gruppe (CH, n=20), Leberzirrhose-Gruppe (LZ, n=23) und HCC-Gruppe (HCC; n=15). * p<0,05, ** p< 0,01, *** p<0,0001

3.5 Korrelation zwischen der Zytokin-Freisetzung von T_{regs} und $CD8^+$ bzw. $CD4^+$ T-Zellen

Des Weiteren untersuchten wir die Korrelation zwischen der Sekretion von TGF β der $CD4^+CD25^+CD127^- T_{regs}$ und der Zytokinsekretion der $CD8^+$ und der $CD4^+$ T-Zellen innerhalb der einzelnen Patientengruppen. Die Patientenproben wurden alle in einem Ansatz gefärbt. Wir werteten hierbei die prozentualen Werte der $CD25^+CD127^-TGF\beta^+$ innerhalb der $CD4^+$ T-Zell-Population sowie die prozentualen Werte der $CD4^+ IFN\gamma^+/TNF\alpha^+$ bzw. $CD8^+IFN\gamma^+/TNF\alpha^+$ innerhalb der $CD3^+$ T-Zell-Population aus. Daraufhin untersuchten wir, ob sich eine Korrelation zwischen den Frequenzen der TGF β -Sekretion der $CD4^+CD25^+CD127^- T_{regs}$ und den Frequenzen von TNF α -Sekretion bzw. IFN γ -Sekretion der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen ergab. Es konnte in keiner Patientengruppe eine Korrelation zwischen der $CD4^+/CD8^+TNF\alpha^+$ oder zwischen der $CD4^+/CD8^+IFN\gamma^+$ T-Zell-Population in Korrelation mit der TGF β -Sekretion der T_{regs} festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

3.6 MDSCs bei Patienten mit HCC, chronischer Hepatitis und Leberzirrhose

Die MDSCs stellen eine heterogene Zellgruppe dar. Es gibt zum derzeitigen Zeitpunkt in der Wissenschaft noch keinen Konsens über eine exakte Charakterisierung an Hand von Oberflächenmarkern. Die Zellen leiten sich von IMZ ab, aus denen vor allem Makrophagen, dendritische Zellen und Granulozyten hervorgehen [109, 113].

MDSCs wurden bereits bei den unterschiedlichsten Tumorentitäten, wie auch beim HCC beschrieben [113]. Außerdem konnte eine immunsupprimierende Wirkung der MDSCs gegen Tumorantigen-spezifische T-Zellen beschrieben werden [30]. Aus diesem Grund untersuchten wir sowohl Patienten mit CH, LZ oder HCC als auch gesunde Spender auf das Vorkommen von MDSCs als eine weitere immunsupprimierende Komponente.

Die Proben der PBMCs von Patienten mit CH, LZ oder HCC und gesunden Spendern wurden aufgetaut, ruhten über Nacht und wurden am folgenden Tag nach einem etablierten Versuchsprotokoll mit Fluochrom-markierten-Antikörpern direkt *ex vivo* gefärbt. Die Identifizierung der MDSCs erfolgte nach folgender Auswertungsstrategie: Zunächst „gateten“ wir in einem Gate unter I auf alle lebenden Zellen, da ein kleines

Lymphozyten-Gate bereits die MDSCs ausgeschlossen hätte. In einem nächsten Schritt unter II teilten wir die Zellen in *lineage*-negative und CD14-positive Zellen ein. Aus diesen filterten wir in einem letzten Schritt unter III die CD14⁺HLADR^{low} MDSCs heraus (siehe Abbildung 25).

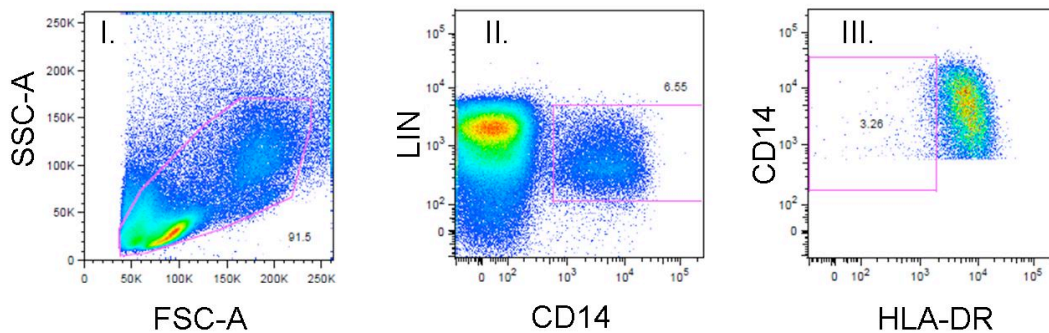


Abbildung 25: Auswertungsstrategie zur Identifizierung von MDSCs. I: PBMC Gate. II: Lineage/CD14⁺ Diskriminierung. III: CD14⁺/ HLA-DR^{low}

Die statistischen Analysen erfolgten hierbei mit dem Mann-Whitney-Test und die Varianzanalyse mit dem Kruskal-Wallis-Test. Für die statistischen Analysen wurde der prozentuale Anteil der CD14⁺HLADR^{low} MDSCs innerhalb der LIN⁻CD14⁺-Population verwendet. Welche im folgendem als CD14⁺HLADR^{low} MDSCs beschrieben werden.

Die HCC-Gruppe (Mittelwert 2,24%, Median 0,99%, Bereich 0,14-7,61%, n=21) zeigte in den Frequenzen der CD14⁺HLADR^{low} MDSCs sowohl zur gesunden Kontrollgruppe (Mittelwert 0,20%, Median 0,13%, Bereich 0,07-0,80%, n=13) mit einem p<0,0001 als auch zur CH-Gruppe (Mittelwert 0,73%, Median 0,24%, Bereich 0,03-4,25%, n=15) mit einem p=0,006 signifikante Unterschiede. Des Weiteren zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den Frequenzen der CD14⁺HLADR^{low} MDSCs zwischen der HCC-Gruppe (Mittelwert 2,24%, Median 0,99%, Bereich 0,14-7,61%, n=21) und der LZ-Gruppe (Mittelwert 1,07%, Median 0,24%, Bereich 0,03-7,03%, n=19) mit einem p=0,013 (siehe Abbildung 26).

Zwischen der gesunden Kontrollgruppe (Mittelwert 0,20%, Median 0,13%, Bereich 0,07-0,80%, n=13) gab es in den Frequenzen der CD14⁺HLADR^{low} MDSCs sowohl zur CH-Gruppe (Mittelwert 0,73%, Median 0,24%, Bereich 0,03-4,25%, n=15) als auch zur LZ-Gruppe (Mittelwert 1,07%, Median 0,24%, Bereich 0,03-7,03%, n=19) keine signifikanten Unterschiede. Die CH-Gruppe (Mittelwert 0,73%, Median 0,24%, Bereich 0,03-4,25%, n=15) zeigte zur LZ-Gruppe (Mittelwert 1,07%, Median 0,24%, Bereich 0,03-7,03%, n=19) auch keinen signifikanten Unterschied (siehe Abbildung 26).

Der Kruskal-Wallis-Test zur Varianzanalyse der zu untersuchenden Gruppen lag bei $p=0,0013$ und war damit signifikant.

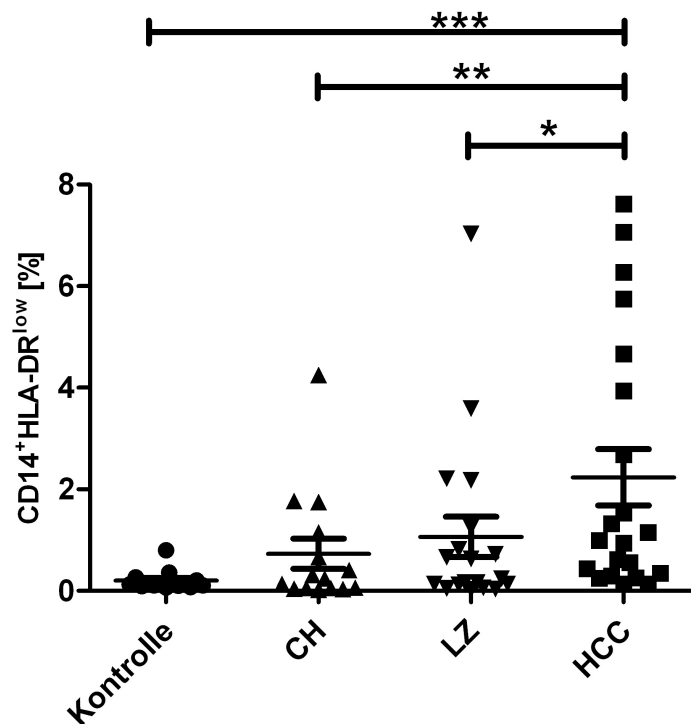


Abbildung 26: CD14⁺HLADR^{low} MDSC-Frequenzen bei Patienten mit HCC, LZ und CH sowie bei der gesunden Kontrollgruppe. Die Frequenzen der CD14⁺HLADR^{low} MDSCs werden als Prozent innerhalb der LIN⁺CD14⁺-Population dargestellt. Die Einteilung erfolgt zum einen in eine gesunde Kontrollgruppe (Kontrolle, n=13) und zum anderen in die Patientengruppen mit chronischer Hepatitis (CH, n=15), mit Leberzirrhose (LZ, n=19) und mit HCC (HCC, n=21). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,0001$

	CH	LZ	HCC
WT1 CD4 IFN γ	↓	↓	↑↑
WT1 CD4 TNF α	↑	↑	↑
WT1 CD8 IFN γ	↑	↑	↑↑
WT1 CD8 TNF α	↓	↑	↑
T _{reg}	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
MDSC	↓	↓	↑↑↑

Tabelle 8. Veränderung des Immunstatus bei Patienten mit CH, LZ und HCC im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Die Pfeile geben signifikante Veränderungen des Vorkommens von WT1-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und deren Zytokinproduktion und des Vorkommens von T_{regs} und MDSCs in den unterschiedlichen Krankheitsgruppen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe an. Die Tabelle dient als Übersicht zum Ergebnisteil.

3.7 Korrelation zwischen T_{reg} -Frequenzen und MDSC-Frequenzen

T_{regs} und MDSCs können potentielle immunsupprimierende Faktoren für $CD8^+$ bzw. $CD4^+$ T-Zellen darstellen [16, 109, 163] und somit womöglich eine Immunantwort der $CD8^+$ bzw. $CD4^+$ T-Zellen unterdrücken [16, 163]. Einige Arbeiten konnten bereits eine potentielle Korrelation zwischen T_{regs} und MDSCs zeigen [164, 165].

Wir verglichen bei Patienten mit CH, LZ und HCC (siehe auch unter den Punkten 3.4 und 3.6) die Verteilungen zwischen den $CD14^+HLADR^{low}$ MDSCs:

gesunde Kontrollgruppe (Mittelwert 0,20%, Median 0,13%, Bereich 0,07-0,80%, Standardabweichung 0,19, n=13), CH-Gruppe (Mittelwert 0,73%, Median 0,24%, Bereich 0,03-4,25%, Standardabweichungen 1,14, n=15), LZ-Gruppe (Mittelwert 1,07%, Median 0,24%, Bereich 0,03-7,03%, Standardabweichung 1,73, n=19), HCC-Gruppe (Mittelwert 2,24%, Median 0,99%, Bereich 0,14-7,61%, Standardabweichung 2,53, n=21) und den $CD4^+CD25^+CD127^- T_{regs}$:

gesunde Kontrollgruppe (Mittelwert 0,32%, Median 0,24%, Bereich 0,14%-0,65%, Standardabweichung 0,19, n=8), CH-Gruppe (Mittelwert 1,46%, Median 1,44%, Bereich 0,23-3,46%, Standardabweichung 0,74, n=20), LZ-Gruppe (Mittelwert 1,92%, Median 1,85%, Bereich 0,72-3,70%, Standardabweichung 0,67, n=21), HCC-Gruppe (Mittelwert 1,37%, Median 1,19%, Bereich 0,66%-3,48%, Standardabweichung 0,78, n= 15) (siehe auch Abbildung 27).

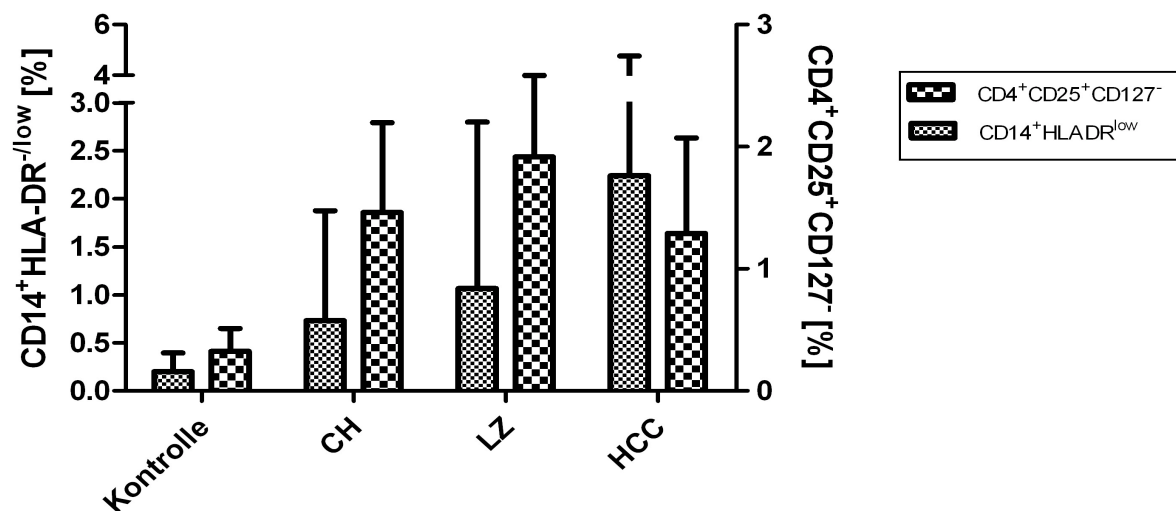


Abbildung 27: Verteilung der CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T_{regs} und der CD14⁺HLADR^{low} MDSCs bei Patienten mit chronischer Hepatitis (CH), Leberzirrhose (LZ) und hepatozellulärem Carcinom (HCC) sowie bei der gesunden Kontrollgruppe (Kontrolle). In der Abbildung sind die unterschiedlichen Verteilungen der Frequenzen der CD14⁺HLADR^{low} MDSCs als Prozent innerhalb der Lin⁻CD14⁺-Population und die Frequenzen der CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T_{regs} als Prozent innerhalb der CD4⁺CD3⁺-Population bei Patienten mit chronischer Hepatitis (CH), Leberzirrhose (LZ), HCC (HCC) und in der gesunden Kontrollgruppe (Kontrolle) gezeigt.

Danach analysierten wir, ob die CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T_{reg}-Frequenzen und die CD14⁺HLADR^{low} MDSC-Frequenzen bei den Patienten mit chronischer Hepatitis, Leberzirrhose und HCC miteinander korrelieren. Dafür wurden die Mittelwerte der prozentualen Anteile der CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T_{reg}-Frequenzen innerhalb der CD4⁺CD3⁺-Population und die Mittelwerte der prozentualen Anteile der CD14⁺HLADR^{low} MDSC-Frequenzen innerhalb der LIN⁻CD14⁺-Population gebildet.

Wir kamen zu dem Ergebnis, dass die Frequenz der CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T_{regs} und der CD14⁺HLADR^{low} MDSCs in der gesunden Kontrollgruppe, der CH-Gruppe und der LZ-Gruppe miteinander korrelierten ($R^2 = 0,9877$). Jedoch fehlte die Korrelation zwischen den Frequenzen der CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T_{regs} und der CD14⁺HLADR^{low} MDSCs in der HCC-Gruppe (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28). Dieses könnte vermutlich am hohen Anteil der MDSCs liegen.

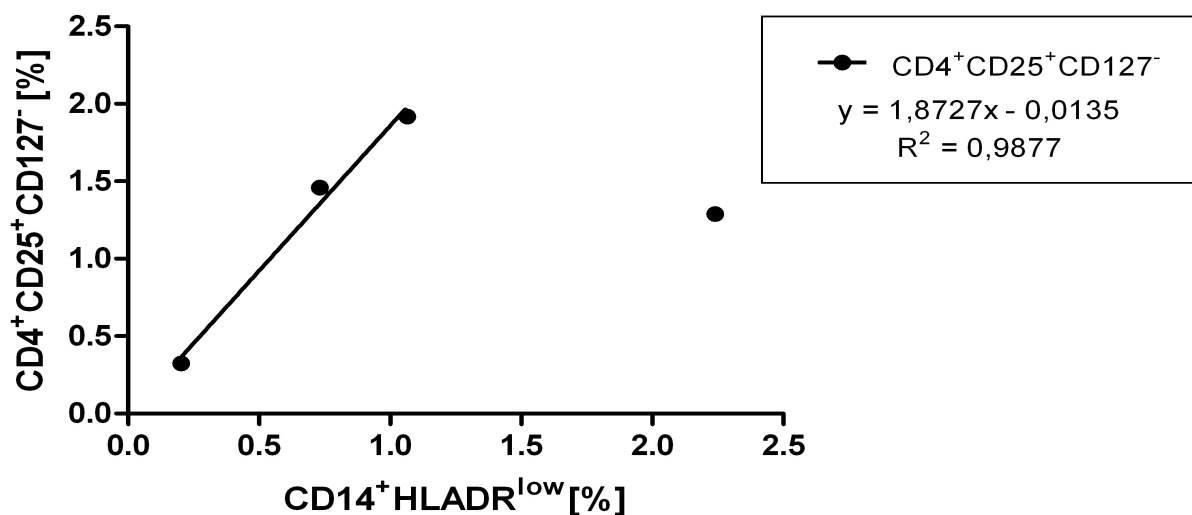


Abbildung 28: Korrelation zwischen den CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T_{regs} und den MDSCs. In der Abbildung sind die Mittelwerte der CD25⁺CD127⁻ und den CD14⁺HLADR⁻ MDSCs in Prozent dargestellt und in Korrelation gebracht. Die Mittelwerte wurden aus den prozentualen Anteilen der jeweiligen Zellgruppen aus der CD3⁺- (CD25⁺CD127⁻) und Lin-CD14⁺- (CD14⁺HLADR⁻) Population errechnet.

3.8 Assoziation zwischen immunologischen Hintergrund und klinischen Daten

Nach Analyse des immunologischen Status, das heißt der Datenerhebung der Frequenzen von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen, von CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T_{regs} und von MDSCs im peripheren Blut von Patienten mit HCC, CH bzw. LZ, betrachteten wir diese Daten im klinischen Zusammenhang. Hierbei verglichen wir in den unterschiedlichen Patientengruppen (HCC, CH, LZ) die unterschiedlichen klinischen Parameter der einzelnen Patienten.

Wir analysierten in der HCC-Gruppe den potentiellen Zusammenhang zur Vorbehandlung der Patienten, z. B. der Tumorresektion, der Transplantation oder der Tumorthherapie bzw. die krankheitsrelevanten Vorerkrankungen.

Für die LZ- und CH-Patienten verfahren wir in ähnlicher Weise mit der Analyse der Viruslast bei den CH-Patienten bzw. dem Stadium der Leberzirrhose bei den LZ-Patienten.

Der Vergleich der zuvor beschriebenen immunologischen Parameter mit den klinischen Daten zeigte, dass die Patienten Nummer 21 und Nummer 2 der HCC-Gruppe weder eine Transplantation, eine Resektion des Tumors oder eine TACE als therapeutische Intervention in ihrem Krankheitsgeschehen hinter sich hatten, das heißt diese Patienten

hatten eine große Tumorlast bzw. das HCC war untherapiert. Diese Patienten zeigten die höchsten T_{reg} -Frequenzen mit 3,48% bei Patient Nummer 21 und Patient Nummer 2 mit 2,30% $CD4^+ CD25^+ CD127^- T_{regs}$.

Außerdem ist den Ergebnissen der CH-Gruppen eine Tendenz zu entnehmen, dass eine hohe Viruslast eine geringe T_{reg} -Frequenz nach sich zieht (siehe Abbildung 29).

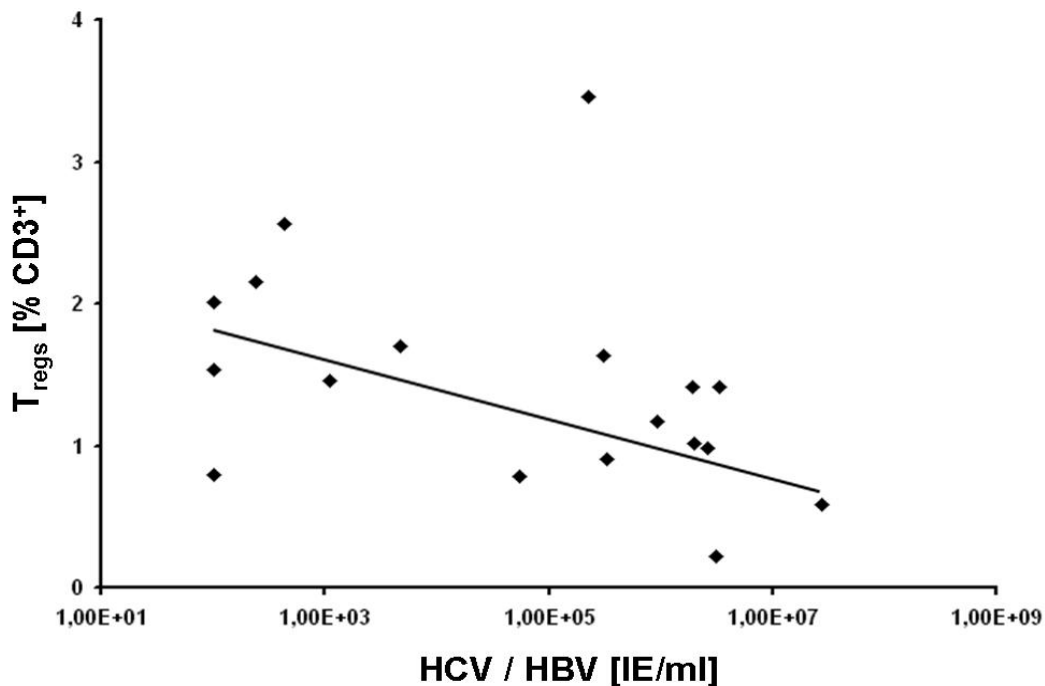


Abbildung 29: Zusammenhang zwischen T_{regs} und Viruskopien im Blut bei Patienten mit chronischer Hepatitis. $CD4^+ CD25^+ CD127^- T_{regs}$ werden angegeben in Prozent innerhalb der $CD3^+ CD4^+$ Population. Die Kopien der HCV RNA und HBV DNA werden in IE/ml angegeben. Die Werte stammen in dieser Abbildung nur von Patienten mit chronischer Hepatitis.

Als weitere Annahme könnte das CHILD-Stadium der LZ-Patienten mit einer erhöhten T_{reg} -Frequenz assoziiert werden. Die LZ-Patienten mit den Nummern 19 und 9 zeigen T_{reg} -Frequenzen von 2,44% und 2,33% und haben zugleich das CHILD-Stadium C im Vergleich zu den Patientennummern 4, 7, 8 und 15 mit dem CHILD-Stadium A, deren T_{reg} -Frequenzen zwischen 1,79-1,97% liegen.

In den folgenden Tabellen (siehe Tabelle 9, Tabelle 10, Tabelle 11) sind die klinischen Parameter der Patienten zu entnehmen. Wir versuchten einen Zusammenhang zwischen den immunologischen Daten und den klinischen Daten der einzelnen Patientengruppen zu erheben, jedoch konnten wir auf Grund der geringen Patientenzahlen keinen direkten Zusammenhang zwischen den klinischen Parametern und den analysierten immunologischen Daten herstellen.

Pat.- Nr.	LZ	CH		PCR IE/ml	TX	RX	TC	CX	T _{reg}	MDSC	CD8+		CD4+	
		B	C								TNFα/IFNG	TNFα/IFNG		
1	B	-	+	-	-	-	-	-	0,67	5,75	0,57	1,25	0,26	1,55
2	B	-	+	-	-	-	-	-	2,30	7,62	0,39	0,39	0,14	0,47
3	+	-	+	-	+	-	-	-	0,98	2,69	0,29	0,5	0,11	0,48
4	A	-	+	-	-	-	+	+	1,11	7,06	?	?	?	?
5	A	-	+	-	-	+	-	-	1,43	1,54	0,12	0,63	0,02	0,14
6	-	-	-	-	-	+	-	-	1,29	0,99	2,72	5,59	0,11	0,62
7	A	-	+	-	+	-	+	-	1,79	0,61	0,94	0,88	0,15	0,47
8	+	-	+	227400	+	-	-	-	1,23	0,25	2,89	3,26	2,32	1,59
9	+	-	+	2.59*10 ⁶	+	-	-	-	0,66	3,94	3,39	29	1,32	15
10	+	-	+	-	-	-	+	-	1,19	0,55	0,33	0,25	0,07	0,26
11	+	+	+	<100	+	-	+	-	0,95	0,35	0,28	0,65	0,10	0,32
12	?	?	?	?	?	?	?	?	1,13	0,30	1,23	0,58	0,13	0,20
13	?	-	?	-	?	?	?	?	?	0,44	1,05	0,32	0,72	0,25
14	+	-	+	3950	+	-	-	-	?	0,27	5,77	1,92	0,77	0,45
15	?	-	?	-	-	-	+	+	?	1,16	0,90	0,3	0,67	0,32
16	B	-	+	1.17*10 ⁶	-	-	+	-	?	1,32	3,54	0,76	0,66	0,44
17	-	-	-	-	-	+	-	-	0,75	0,14	7,2	1,97	0,29	0,25
18	+	-	+	5.82*10 ⁶	+	-	+	-	1,63	4,67	0,19	0,63	0,08	0,28
19	A	-	+	63000	-	+	-	-	?	6,28	0,83	0,31	0,24	0,23
20	?	-	?	-	-	-	-	-	?	0,95	2,38	0,49	2,44	0,31
21	B	-	+	-	-	-	-	-	3,48	0,14	2,21	1,03	2,26	0,28

Tabelle 9: Klinische Angaben für HCC-Patienten im immunologischen Zusammenhang: In dieser Tabelle werden die klinische Angaben der HCC-Patienten beschrieben. Hierbei steht (+) für die Durchführung einer Intervention (TX: Transplantation, RX: Leberteilresektion, TC: transarterielle Chemoembolisation, Cx: Chemotherapie erhalten) bzw. den Nachweis der Erkrankung (LZ: Leberzirrhose, CH: chronische Hepatitis); das (-) steht wiederum für keine Durchführung einer Intervention bzw. für keinen Nachweis einer Erkrankung, das (?) steht hierbei für nicht bekannt. Unter PCR versteht sich der Nachweis der Virus DNS Kopien im Serum der Patienten. Hierbei steht (-) für keinen Nachweis solcher Kopien und Zahlen stehen für die Anzahl der Kopien in IE/ml, die im Blut der Patienten nachgewiesen wurden. Dabei steht der Wert <100 IE/ keinen Anhalt von Virus-Kopien innerhalb der Nachweisgrenze des Testes. Unter dem Punkt LZ (Leberzirrhose) gibt der angegebene Buchstabe das Child-Stadium an, falls diese ermittelt wurde.

Pat.- Nr.	LZ	CH		PCR IE/ml	TX	RX	TC	CX	T _{reg}	MDSC	CD8+		CD4+	
		B	C								TNFa/IFNG	TNFa/IFNG		
1	-	-	+	202*10 ⁴	-	-	-	-	1,02	1,15	1,05	0,77	0,20	0,45
2	-	+	-	1110	-	-	-	-	1,45	0,67	0,12	0,15	0,03	0,09
3	-	-	+	263*10 ⁴	-	-	-	-	0,98	0,06	1,48	0,75	0,01	0,02
4	-	-	+	303*10 ³	-	-	-	-	1,63	0,04	1,53	0,80	0,11	0,11
5	-	+	-	238	-	-	-	-	2,15	0,06	2,13	1,58	0,44	0,41
6	-	+	-	4740	-	-	-	-	1,70	1,77	0,41	0,45	0,16	0,25
7	-	+	-	<100	-	-	-	-	1,54	0,03	8,46	1,25	1,12	1,07
8	-	+	-	435	-	-	-	-	2,56	0,24	0,75	1,34	0,22	0,32
9	-	-	+	224*10 ³	-	-	-	-	3,46	4,25	6,82	3,50	0,49	0,30
10	-	-	+	524*10 ²	-	-	-	-	0,79	0,31	2,38	1,35	0,07	0,17
11	-	+	-	<100	-	-	-	-	0,79	0,14	1,78	0,98	0,06	0,14
12	-	-	+	330*10 ³	-	-	-	-	0,90	1,75	?	?	?	?
13	-	-	+	273*10 ⁵	-	-	-	-	0,59	0,41	0,56	0,57	0,11	0,22
14	-	-	+	316*10 ⁴	-	-	-	-	0,23	0,06	1,31	0,68	0,12	0,12
15	-	-	+	?	-	-	-	-	1,47	?	2,66	1,73	0,24	1,65
16	-	-	+	931*10 ³	-	-	-	-	1,17	?	0,11	0,28	0,03	0,35
17	-	-	+	195*10 ⁴	-	-	-	-	1,41	?	0,16	1,74	0,08	0,98
18	?	-	+	?	-	-	-	-	1,92	?	0,12	0,17	0,06	0,16
19	+	-	+	333*10 ⁴	-	-	-	-	1,42	?	0,36	1,18	0,07	0,74
20	-	+	-	<100	-	-	-	-	2,01	0,04	0,18	0,27	0,06	0,11

Tabelle 10: Klinische Angaben für Hepatitis-Patienten im immunologischen Zusammenhang: In dieser Tabelle werden die klinische Angaben der Hepatitis-Patienten beschrieben. Hierbei steht (+) für die Durchführung einer Intervention (TX: Transplantation, RX: Leberteilresektion, TC: transarterielle Chemoembolisation, Cx: Chemotherapie erhalten) bzw. den Nachweis der Erkrankung (LZ: Leberzirrhose, CH: chronische Hepatitis); das (-) steht wiederum für keine Durchführung einer Intervention bzw. für keinen Nachweis einer Erkrankung, das (?) steht hierbei für nicht bekannt. Unter PCR versteht sich der Nachweis der Virus DNS Kopien im Serum der Patienten. Hierbei steht (-) für keinen Nachweis solcher Kopien und Zahlen stehen für die Anzahl der Kopien in IE/ml, die im Blut der Patienten nachgewiesen wurden. Dabei steht der Wert <100 IE/ Dabei steht der Wert <100 IE/ml für keinen Anhalt von Virus-Kopien innerhalb der Nachweisgrenze des Testes. Unter dem Punkt LZ (Leberzirrhose) gibt der angegebene Buchstabe das Child-Stadium, an falls diese ermittelt wurde.

Pat.- Nr.	LZ	CH		PCR IE/ml	TX	RX	TC	CX	T _{reg}	MDSC	CD8+		CD4+	
		B	C								TNFa/IFNG	TNFa/IFNG		
1	B	-	-	-	-	-	-	-	1,05	7,03	0,15	0,16	0,04	0,03
2	B	-	+	106*10 ³	-	-	-	-	1,83	0,03	0,06	0,52	0,07	0,09
3	+	+	-	597*10 ⁵	-	-	-	-	3,70	0,04	0,45	0,27	0,12	0,13
4	A	-	+	8*10 ³	-	-	-	-	1,80	0,06	0,74	0,36	0,03	0,09
5	B	-	-	-	-	-	-	-	1,33	0,14	0,35	0,11	0,53	0,16
6	B	-	-	-	-	-	-	-	1,44	0,24	2,06	1,35	1,75	0,42
7	A	-	+	717*10 ³	-	-	-	-	1,85	0,03	0,92	0,48	0,58	0,14
8	A	-	-	-	-	-	-	-	1,97	0,17	0,79	0,22	0,77	0,20
9	C	-	-	-	-	-	-	-	2,32	0,13	0,77	1,03	0,16	2,16
10	+	-	+	182*10 ⁴	-	-	-	-	2,21	0,12	1,38	1,66	0,19	3,11
11	+	-	-	-	-	-	-	-	2,19	0,82	1,46	0,70	0,71	0,50
12	B	-	-	-	-	-	-	-	1,72	?	1,61	1,21	1,01	0,41
13	+	-	-	-	-	-	-	-	2,22	0,63	1,55	0,98	0,09	0,12
14	+	-	-	-	-	-	-	-	2,19	1,25	1,88	1,26	0,05	0,11
15	A	-	+	487*10 ⁴	-	-	-	-	1,79	0,66	0,33	0,43	0,12	0,21
16	+	-	+	71*10 ⁴	-	-	-	-	2,84	0,16	1,81	0,93	0,24	0,20
17	+	-	-	-	-	-	-	-	1,58	0,73	0,39	0,49	0,11	0,16
18	+	-	-	-	-	-	-	-	0,72	?	5,39	1,10	2,34	0,42
19	C	-	-	-	-	-	-	-	2,44	?	2,24	1,00	1,38	1,00
20	+	-	+	?	-	-	-	-	2,15	?	3,44	1,09	0,80	0,35
21	C	-	-	-	-	-	-	-	0,89	2,21	0,12	0,33	0,12	0,10
22	B	-	-	-	-	-	-	-	?	2,18	1,05	0,76	0,33	0,67
23	A	-	-	-	-	-	-	-	?	3,59	0,50	0,54	0,47	0,46

Tabelle 11: Klinische Angaben für Leberzirrhose-Patienten im immunologischen Zusammenhang:

In dieser Tabelle werden die klinische Angaben der Leberzirrhose-Patienten beschrieben. Hierbei steht (+) für die Durchführung einer Intervention (TX: Transplantation, RX: Leberteilresektion, TC: transarterielle Chemoembolisation, Cx: Chemotherapie erhalten) bzw. den Nachweis der Erkrankung (LZ: Leberzirrhose, CH: chronische Hepatitis); das (-) steht wiederum für keine Durchführung einer Intervention bzw. für keinen Nachweis einer Erkrankung, das (?) steht hierbei für nicht bekannt. Unter PCR versteht sich der Nachweis der Virus DNS Kopien im Serum der Patienten. Hierbei steht (-) für keinen Nachweis solcher Kopien und Zahlen stehen für die Anzahl der Kopien in IE/ml, die im Blut der Patienten nachgewiesen wurden. Dabei steht der Wert <100 IE/ml für keinen Anhalt von Virus-Kopien innerhalb der Nachweisgrenze des Testes. Unter dem Punkt LZ (Leberzirrhose) gibt der angegebene Buchstabe das Child-Stadium an, falls diese ermittelt wurde.

4 Diskussion

4.1 Immunstimulatorische Eigenschaften von HCC-Tumorzelllinien

Eine essentielle Frage bei der Entwicklung von immuntherapeutischen Strategien beim HCC ist, in welchem Ausmaß das HCC ein immunogener Tumor ist. Dabei ist zu berücksichtigen, dass das HCC eine Tumorentität ist, welche typischerweise mit einer chronischen Entzündung der Leber assoziiert ist [16, 166]. In den meisten Fällen entwickelt sich das HCC auf dem Boden einer chronischen HBV- oder HCV-Infektion. Die chronische HBV- und HCV-Infektion der Leber führt auch gleichzeitig zu einer chronischen Entzündung der Leber. Aufgrund der chronischen Entzündung der Leber werden vermehrt Zytokine und Wachstumsfaktoren produziert, welche die Ausbildung einer Fibrose bzw. Zirrhose unterstützen, was letztendlich die Hepatokarzinogenese fördert [166].

Die chronische HCV-Infektion ist für einige Veränderung in der Genexpression verantwortlich, welche beispielsweise die Proliferation von Zellen unterstützen [167]. Bei der chronischen HBV-Infektion ist anzumerken, dass das HB-Antigen in der Lage ist die Transkription von Genen zu verändern und damit die Ausbildung eines HCCs zu begünstigen [168]. Diese Zusammenhänge machen es verständlich, dass durch die Impfung gegen das HBV die Rate der HCC-Neuerkrankungen in Ländern mit hoher HBV-Infektionsrate, wie beispielsweise in Taiwan, reduziert werden konnte [4].

Für das HCC sind einige Tumorantigene beschrieben, gegen die spezifische T-Zell-Antworten detektiert worden sind [144, 166, 169-172]. Neben dem für das HCC bekannten Tumorantigen AFP, das bei 80% der HCCs nachweisbar ist [144], wurden auch gegen andere bereits beschriebene Tumorantigene, wie beispielsweise MAGE [146] und NY-ESO [65], welches bei bis zu 50 % der HCCs exprimiert wird [16], von mehreren Arbeitsgruppen spezifische T-Zell-Antworten gegen diese Tumorantigene beschrieben [144, 146, 170-173]. Zudem konnten Antikörper-Antworten gegen unterschiedliche TAAs nachgewiesen werden [16, 166]. Eine präoperativ erhöhte Rate an NK-Zellen war mit einem verbesserten Überleben assoziiert [174].

In dem ersten Ansatz dieser Arbeit sollte die prinzipielle immunstimulatorische Fähigkeit von HCC-Tumorzelllinien untersucht werden. Zum Einen sollte gezeigt werden, dass HCC-Tumorzelllinien fähig sind Antigene zu präsentieren und dadurch eine T-Zell-

Antwort induziert werden könnte. Zum Anderen sollte gezeigt werden, ob T-Zellen prinzipiell in der Lage sind auf HCC-Tumorzelllinien Antigene zu erkennen.

Wir nehmen anhand der Zytokin-Produktion der Influenza-spezifischen-T-Zellen aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern an, dass das Antigen auf der Oberfläche der HCC-Tumorzelllinie erkannt wurde und es somit auch auf der Oberfläche exprimiert wurde und dass die Influenza-spezifischen-T-Zellen gegen das auf der HCC-Tumorzelllinie exprimierte Antigen eine gerichtete T-Zell-Antwort auslösen können.

Dieses Ergebnis lässt sich mit den Ergebnissen von Komori et al. und von Shang et al. vergleichen [171, 175]. Diese beiden Gruppen detektierten gerichtete antigenspezifische T-Zell-Antworten gegen HCC-Tumorzelllinien, welche vorher mit dem jeweiligen Tumorantigen transfiziert wurden. Die beiden Gruppen benutzten jeweils unterschiedliche Tumorantigene. Komori et al. konnten eine gerichtete antigenspezifische T-Zell-Antwort zeigen, die sich gegen das Tumorantigen Glypican-3 (GPC3) richtete, welches sowohl beim HCC als auch beim Melanom gefunden wird [175]. Shang et al. berichteten über antigenspezifische T-Zell-Antworten gegen das *cancer-testis* Antigen NY-ESO-1, welches ebenfalls beim HCC exprimiert wird [171, 175].

4.2 WT-1 spezifische T-Zell-Antworten bei Patienten mit HCC, chronischer Hepatitis und Leberzirrhose

Spontane T-Zell-Antworten gegen Tumorantigene lassen sich bei einem Teil von Tumorpatienten im peripheren Blut nachweisen. Ein Großteil dieser tumorspezifischen T-Zellen besitzt *in vitro* lytische Fähigkeiten gegenüber autologen und zum Teil auch gegenüber HLA-gematchten allogenen Tumorzellen [42, 116]. Allerdings fehlt in den meisten Fällen der direkte Nachweis, dass diese Tumorantigen-spezifischen T-Zellen auch in der Lage sind *in vivo* autologe Tumorzellen zu zerstören [42]. Für WT1 sind bereits bei anderen Tumorentitäten, wie beispielsweise dem Melanom oder der AML [153, 176] spontane spezifische T-Zell-Antworten beschrieben worden. In dieser Arbeit analysierten wir WT1-spezifische T-Zellen von Patienten mit HCC, aber auch bei Patienten mit chronischer Hepatitis und Leberzirrhose.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zell-Antworten im peripheren Blut von HCC-Patienten zu finden sind.

Hierbei zeigte sich, dass es zwischen der gesunden Kontrollgruppe und den HCC-Patienten sowohl bei den WT1-spezifischen CD3⁺CD8⁺ T-Zellen als auch bei den CD3⁺CD4⁺ T-Zellen signifikante Unterschiede in ihrer Zytokin-Sekretion (IFN γ und TNF α) gab. Dies lässt darauf schließen, dass T-Zellen von HCC-Patienten bereits eine Antigenerfahrung mit dem WT1-Antigen hatten. So ließ sich durch Stimulation mit WT1-Peptidmix eine Immunantwort gegen das WT1-Antigen detektieren.

Mehrere Arbeitsgruppen konnten bereits unterschiedliche HCC-assoziierte TAA und TAA-spezifische T-Zell-Antworten beschreiben [177]. Zu nennen sind z.B. AFP, GPC-3, NY-ESO, MAGE-A, humane Telomerase-reverse Transkriptase (hTERT), SXX-2 [173, 177, 178].

Korany et al. konnten bei HCC-Patienten spontane spezifische T-Zell-Antworten gegen das NY-ESO-1-Antigen zeigen, welches sowohl beim HCC als auch beim Melanom, Ovarial- oder Mamma-karzinom re-exprimiert wird [178]. Zudem beschrieb die Arbeitsgruppe, dass sowohl die Antikörper-Titer als auch die spezifischen CD8⁺ T-Zell-Antworten eines Patienten nach Behandlung mit einer TACE abfielen [65]. Beim Melanom konnte auch schon gezeigt werden, dass es eine Korrelation zwischen dem Auftreten des Melanoms und des Titers der NY-ESO-1-spezifischen Antikörper gab [179].

Auch in dieser Arbeit zeigte einer der HCC-Patient (Nr. 10), der als einzige Therapie eine TACE erhielt, ebenfalls nur geringe Immunantworten der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Man könnte in diesem Fall annehmen, dass der Tumor aufgrund des durch die TACE auftretenden Zelltodes und der daraus hervorgehenden Nekrose weniger mit dem Gefäßsystem verbunden ist. Hierdurch könnte die Antigen-Präsentation gegenüber dem Immunsystem eingeschränkt sein, was eine Immunantwort vermindern würde.

Jedoch zeigte der HCC-Patient Nr. 16, der auch als einzige Therapiemaßnahme eine TACE erhielt, erhöhte CD8⁺ TNF α -Immunantworten bei sonst geringen Immunantworten der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (siehe auch Tabelle 9). Neben Korany et al. konnten auch andere Gruppen NY-ESO-1-spezifische T-Zell-Antworten im peripheren Blut von HCC-Patienten beschreiben. Keine der Arbeitsgruppen konnte jedoch *ex vivo* T-Zell-Antworten gegen NY-ESO-1 nachweisen, sondern erst nach einer *in vitro* Expansion der T-Zellen, was dafür sprechen könnte, dass es nur sehr niedrige

Frequenzen NY-ESO-1-spezifischer T-Zellen im peripheren Blut von HCC-Patienten gibt [65, 171, 178].

Zudem konnten Butterfield et al. erhöhte Frequenzen tumorspezifischer T-Zell-Antworten gegen das tumorspezifische Antigen AFP und gegen seine sub-dominanten AFP-spezifischen Epitope im peripheren Blut bei HCC-Patienten im Gegensatz zu gesunden Kontrollpersonen nachweisen, welche vom Phänotyp naiven, aber auch Effektor-, zentralen und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen entsprachen [144, 178]. Dies könnte darauf hinweisen, dass die T-Zellen nach dem Kontakt mit dem Tumorantigen AFP *in vivo* expandierten. Jedoch gab es keine Korrelation zwischen der Anzahl AFP-spezifischer T-Zellen und dem Spiegel von AFP im Serum von HCC-Patienten [144]. Thimme et al. verglichen AFP-spezifische CD8⁺ T-Zell-Antworten aus dem peripheren Blut mit denen von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) nach Stimulation mit einem AFP-Protein und konnten eine AFP-spezifische T-Zell-Antwort bei HCC-Patienten nachweisen [178, 180].

Ein weiteres onkofötales Antigen ist GPC-3, welches auf 70% der HCCs exprimiert wird [177]. Gegen GPC-3 wurden ebenfalls spezifische T-Zell-Antworten nachgewiesen [181] und es gibt bereits eine Phase-I-Studie, bei der GPC-3 in einem immuntherapeutischen Ansatz beim HCC zur Anwendung kam [181]. Hierbei konnten Immunantworten gegen GPC-3 bei 30 von 33 Patienten nachgewiesen werden. Außerdem konnten schwache hTERT-spezifische T-Zell-Antworten im peripheren Blut bei HCC-Patienten nachgewiesen werden [182].

Interessanterweise zeigte der Vergleich zwischen LZ- und HCC-Patienten in dieser Arbeit ähnliche Frequenzen Zytokin-produzierender T-Zellen in der CD3⁺CD4⁺ T-Zell-Population und in der CD3⁺CD8⁺ T-Zell-Population. Dieses könnte ein Hinweis darauf sein, dass bereits bei LZ-Patienten eine WT1-spezifische Immunantwort von T-Zellen induziert werden kann. In diesem Zusammenhang sind die Daten von Sera et al. interessant, welche annehmen, dass das Vorkommen von WT1 im zirrhotischen Lebergewebe ein onkogenes Potenzial hat. Somit könnten auch schon LZ-Patienten interessant für Vakzinierungsstrategien sein, um eine mögliche Entstehung des HCCs durch frühzeitige Immunerkennung zu verhindern.

Ein weiterer interessanter Punkt bei der Auswertung der CD3⁺CD8⁺ T-Zell-Antworten war, dass sich im Hinblick auf die klinischen Daten eine Tendenz dazu ergab, dass hohe CD3⁺CD8⁺ T-Zell-Antworten mit erhöhter Viruslast assoziiert waren. Dies könnte bedeuten, dass in diesen Fällen das Immunsystem das Virus beherrscht bzw.

erfolgreich bekämpft [183]. Claassen et al. beschreiben zum einen, dass HCV-spezifische T-Zellen essentiell für eine protektive Immunität gegenüber dem HCV und zur Krankheitskontrolle sind. Zum anderen zeigen Claassen et al., dass eine persistente und chronische HCV Infektion mit einer Dysfunktion der T-Zellen einhergeht [184].

Weiterhin konnten Shrivastava et al. bei HBsAg-positiven Neugeborenen im Vergleich zu gesunden Neugeborenen zeigen, dass die Anzahl der zirkulierenden CD8⁺ T-Zellen keinen signifikanten Unterschied zwischen HBsAg-positiven Neugeborenen und gesunden Neugeborenen aufwies [185]. Die Gruppe um Shrivastava et al. konnten weiterhin nachweisen, dass die CD8⁺ T-Zellen eine verringerte IFN γ -Produktion aufwiesen [185] und werteten dies als T-Zell-Dysfunktion und sahen einen Zusammenhang zur Viruspersistenz [185].

4.3 Potentiell immunsuppressive Mechanismen bei Patienten mit HCC, chronischer Hepatitis und Leberzirrhose

Mehrere Arbeitsgruppen beschrieben bereits die zentrale Rolle von immunsuppressiven Faktoren, wie beispielsweise MDSCs und T_{regs} in der Tumorimmunologie und beim HCC [186]. Sowohl für T_{regs} als auch für MDSCs wurden bereits in mehreren Arbeiten gezeigt, dass diese eine mögliche immunsupprimierende Wirkung auf die anti-Tumor-Immunantwort haben könnten [186]. Weitere Arbeitsgruppen konnten bereits bei Patienten mit CH, LZ und HCC erhöhte T_{reg}-Frequenzen im peripheren Blut nachweisen [186, 187] und beschrieben eine mögliche Korrelation zwischen erhöhten T_{reg}-Frequenzen sowohl im peripheren Blut als auch im *Tumormicroenvironment* des HCCs und einem Tumor-Progress bzw. der Hepatokarzinogenese [106, 160, 186].

Eine weitere interessante Zell-Population unter potentiell immunsuppressiven Zellen sind MDSCs. MDSCs stellen eine heterogene Zell-Gruppe dar, deren Ursprung vermutlich von myeloischen und unreifen myeloischen Zellen ausgeht [109]. Weiterhin wird angenommen, dass diese Zellpopulation in der Lage ist eine spezifische T-Zell-Antwort zu unterdrücken [186]. Dieses wurde bereits für AFP-spezifische T-Zellen gezeigt [186]. Außerdem wurden immunsupprimierenden Mechanismen und die immunsuppressive Wirkung von MDSCs auf NK-Zellen bei Patienten mit HCC von Hoechst et al. untersucht [188]. Der Konsens zur genauen Charakterisierung dieser Zellen gestaltet sich jedoch immer noch schwierig und es gibt auch nicht genügend

Daten für MDSCs in einem nicht Tumor-assoziierten Kontext [109], die zum besseren Verständnis dieser Zell-Population beitragen könnten.

Auch in dieser Arbeit zeigten sich im Vergleich zwischen der gesunden Kontrollgruppe und den HCC-Patienten nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix signifikant erhöhte Frequenzen von T_{regs} und MDSCs im peripheren Blut von HCC-Patienten. Diese Ergebnisse könnten für gesteigerte immunsuppressive Mechanismen beim HCC sprechen.

T_{regs} spielen eine entscheidende Rolle in Hinblick auf Autoreaktivität des Körpers und bei Transplantatabstoßungsreaktionen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es zwischen der gesunden Kontrollgruppe und den Patienten mit HCC und den Patienten mit LZ signifikante Unterschiede in den Frequenzen der zirkulierenden T_{regs} gab. Jedoch kamen höhere Frequenzen zirkulierender T_{regs} bei den LZ-Patienten vor als beispielsweise in der HCC-Gruppe. Hierbei war der Unterschied zwischen diesen beiden Patientengruppen signifikant. Dieses lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass einige der Patienten in der HCC-Gruppe bereits ein Lebertransplantat bekommen haben. Unter den HCC-Patienten gab es 8 Patienten die bereits ein Lebertransplantat bekommen haben. Demirkiran et al. zeigten in ihrer Arbeit einen signifikanten Unterschied in der T_{reg} -Anzahl vor und nach Lebertransplantation. Die Patienten zeigten nach der Transplantation niedrigere T_{reg} -Frequenzen als noch vor der Operation [189]. In unserem HCC-Patienten-Kollektiv konnten wir jedoch anhand der geringen Anzahl von Patienten keinen signifikanten Unterschied ausmachen. Des Weiteren wird angenommen, dass häufig verwendete Immunsuppressiva die Induktion und Funktion von T_{regs} einschränken, was als eine der Ursachen der Abstoßungsreaktion von Transplantaten angesehen wird [189, 190]. In Hinblick auf eine mögliche Vakzinierungsstrategie mit WT1-Peptid sollte erwogen werden, inwiefern niedrige T_{reg} -Frequenzen, die durch die gegebenen Immunsuppressiva möglicherweise ausgelöst werden, eventuell eine positive Auswirkung auf eine präventive Vakzinierung für Leber-transplantierte Patienten hätten.

In dieser Arbeit wurden nur periphere zirkulierende T_{regs} betrachtet. Ein interessanter Punkt wäre die Analyse von TIL und deren phänotypische Beschreibung bzw. Verteilung im Vergleich zu CH- und LZ-Lebergewebe. Schon Unitt et al. berichteten in ihren Analysen, dass das Gewebe von HCC-Patienten eine höhere Konzentration von T_{regs} aufweist im Vergleich zu dem Gewebe von LZ-Patienten. Unitt et al. schließen

außerdem daraus, dass die zytotoxische Funktion von $CD3^+CD8^+$ T-Zellen im Tumorgewebe dadurch eingeschränkt ist [191].

Ein weiterer Punkt dieser Arbeit ist das signifikant vermehrte Vorkommen von T_{regs} im peripheren Blut von CH-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Dies spricht, wie auch bei Cabrera et al. [192] beschrieben, dafür, dass T_{regs} auch bei einer Viruspersistenz eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen bzw. Aufschluss darüber geben könnten, ob das Virus vom Immunsystem erfolgreich bekämpft werden kann. Dies erklärt sich dadurch, dass T_{regs} die $CD3^+CD8^+$ und die $CD3^+CD4^+$ T-Zell-Antworten durch beispielsweise vermehrte TGF β -Sekretion und durch Zell-Zell Kontakt unterdrücken können [192, 193].

Man kann die erhöhte Frequenz der T_{regs} bei den CH-Patienten auch so interpretieren, dass T_{regs} eine protektive Rolle bei der CH spielen können. Yoshizawa et al. postulieren in diesem Zusammenhang, dass T_{regs} die Leber vor einem Gewebeschaden durch eine verstärkte Entzündungsreaktion durch $CD3^+CD8^+$ schützen [187].

Insgesamt gibt es jedoch widersprüchliche Daten bezüglich T_{regs} im Zusammenhang mit Viruserkrankungen. Cabrera et al. beschrieben in ihrer Arbeit, dass eine hohe Viruslast mit hohen T_{reg} -Frequenzen einhergehen, jedoch beschreiben sie T_{regs} phänotypisch nur mit den Oberflächenmarkern $CD4^+CD25^+$, was auch aktivierte Zellen sein könnten, wie Ishii et al. in ihrem Review beschreiben [183, 192]. In dieser Arbeit gab es bei den als $CD4^+CD25^+CD127^-$ beschriebenen T_{regs} keinen Zusammenhang zwischen einer hohen Viruslast und hohen T_{reg} -Frequenzen. Eher zeichnete sich eine umgekehrte Tendenz ab. Eine Ursache hierfür könnte die bereits beschriebene Inaktivierung der T_{regs} sein.

Interessanterweise war die Sekretion von TGF β bei den HCC-Patienten signifikant erhöht im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe und zur Hepatitisgruppe, was dafür sprechen könnte, dass die vorhandenen T_{regs} nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix besonders in der HCC-Gruppe eine höhere immunsupprimierende Wirkung zu haben scheinen. Allerdings zeigten die LZ-Patienten keinen signifikanten Unterschied in ihrer TGF β -Sekretion im Vergleich zu den HCC-Patienten. Somit liegen möglicherweise schon bei der LZ als eine Vorstufe des HCCs ähnliche immunologische Verhältnisse vor wie bei Patienten mit HCC. Unitt et al. fanden bei ihren HCC-Patienten ähnliche Ergebnisse für membranständiges TGF β . Zusätzlich konnten sie zeigen, dass zirkulierende T_{regs} die Proliferation von $CD3^+CD8^+$ T-Zellen sowie die Sekretion von Zytokinen unterdrücken können [191].

Die Analyse der MDSCs im peripheren Blut zeigte in dieser Arbeit signifikant höhere Frequenzen bei den HCC-Patienten im Vergleich zu allen anderen Patientengruppen. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen der gesunden Kontrollgruppe zur CH- und zur LZ-Patientengruppe. Dieses Ergebnis bestätigt die Daten anderer Arbeitsgruppen, die auf eine wichtige Rolle der MDSCs in der Pathogenese des HCCs bzw. anderer Tumorerkrankungen hinweisen:

MDSCs konnten bereits bei Lungenkarzinomen, Melanomen und RCCs gehäuft nachgewiesen werden [194-196]. Weiterhin wurde ihre immunsuppressive Wirkung auf die anti-Tumor-Antwort bei diesen Tumor-Entitäten analysiert [194-196]. Hoechst et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen bei ihrem untersuchten HCC-Patienten-Kollektiv [113, 188]. Diese Gruppe konnte auch zeigen, dass nach in-vitro-Depletion der MDSCs die AFP-spezifische T-Zell-Antwort gesteigert war [113]. Weiterhin nimmt die Gruppe um Hoechst et al. an, dass die immunsuppressive Wirkung der MDSCs bei HCC-Patienten durch die Induktion von T_{regs} bedingt wird [113]. Mizukoshi et al. beschreiben in ihrer Arbeit den Zusammenhang zwischen Radiofrequenztherapie beim HCC und Tumorantigen-spezifischen T-Zell-Antwort. Sie konnten außerdem zeigen, dass es zwischen Tumorantigen-spezifischen T-Zell-Antworten und MDSCs eine umgekehrte Korrelation bestand, was die immunsuppressiven Mechanismen auf TAA-spezifische T-Zell-Antworten auch im Zusammenhang mit Radiofrequenztherapie unterstreicht [197]. Suresh et al. zeigten in ihrer Arbeit erhöhte MDSC-Frequenzen im peripheren Blut von Patienten mit fortgeschrittenem HCC und konnten zusätzlich zeigen, dass MDSCs die tumorspezifische T-Zell-Antwort negativ beeinträchtigen [198]. Suresh et al. analysierten hierfür die *Programmed death-1*-(PD-1)+ T-Zellen und erbrachten den Nachweis immunsuppressiver Zytokine wie beispielsweise $TGF\beta$ [198].

In unserer Arbeit untersuchten wir ebenfalls eine mögliche Korrelation der immunsupprimierenden Zellpopulation im Blut von CH-, LZ- und HCC-Patienten. Es zeigte sich, dass die nicht Tumor-Patientengruppen (CH, LZ) und die gesunde Kontrollgruppe eine positive Korrelation zwischen MDSCs und T_{regs} aufwiesen, ein möglicher Hinweis auf eine Interaktion zwischen MDSCs und T_{regs} [164].

Bei den HCC-Patienten fanden wir keine Korrelation zwischen der MDSC- und der T_{reg} -Population. Im Gegensatz zur Arbeitsgruppe um Kalathil et al., die in ihrer Arbeit eine positive Korrelation zwischen T_{regs} und MDSCs bei Patienten mit fortgeschrittenen HCC zeigen konnten [198]. In unserem Kollektiv könnte dies auf die unterschiedlichen Effekte von Immunsuppressiva auf MDSCs und T_{regs} zurückzuführen sein [190]. Aufgrund der

geringen Anzahl von HCC-Patienten ohne Immunsuppressiva, insgesamt hatten 11 Patienten von 21 Patienten keine Immunsuppression erhalten, kann die Hypothese jedoch nicht statistisch untermauert werden.

Basierend auf diesen Daten stellen MDSCs und T_{regs} in Hinblick auf immuntherapeutische Ansätze für Tumorpatienten interessante Angriffspunkte dar [198-200]. Beispielsweise konnte in einem Mausmodell demonstriert werden, dass nach Depletion der T_{regs} durch einen monoklonalen Antikörper gegen CD25 eine anti-Tumorantwort ausgelöst werden konnte [177]. Jedoch geben Suresh et al. zu bedenken, dass CD25 ein sehr unspezifischer Marker ist, so dass nicht auszuschließen ist, dass durch diesen Antikörper auch aktivierte T-Zellen depletiert werden [198]. In klinischen Studien wurde durch Behandlung mit einer niedrigen Dosis Cyclophosphamid eine Depletion der T_{regs} erreicht [201] und führte zur Induktion einer AFP-spezifischen $CD4^+$ T-Zellantwort bei Patienten mit fortgeschrittenem HCC [177, 202]. Weiterhin konnten Suresh et al. zeigen, dass nach Depletion von T_{regs} , MDSCs und $PD-1^+$ T-Zellen die Zytokinantworten der $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen wieder anstiegen [198]. Der Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib wird in der Erstlinientherapie zur Behandlung des RCCs eingesetzt und es wurde gezeigt, dass Sunitinib die T_{reg} -Frequenzen bei RCC-Patienten erniedrigt [164, 203]. In einer anderen Arbeit wurde diskutiert, dass durch den Einsatz von all-trans-Retinsäure die Anzahl der $CD33+HLA-DR-Lin1$ MDSCs gesenkt wurde, dies geschieht durch eine Ausdifferenzierung der MDSCs und verbessert letztlich die anti-Tumorantwort der DZ [164, 204]. Außerdem gab es Hinweise, dass der Einsatz von Gemcitabine die Anzahl von MDSCs in der Milz reduziert ohne die $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen zu zerstören [205]. Weiterhin zeigte sich, dass durch die Gabe von 5-FU eine Depletion der MDSCs erfolgt mit einem resultierenden Anstieg der IFN γ -Produktion der tumor-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen [205].

Weitere immunsuppressive Mechanismen werden über die Rezeptoren PD-1 und CTLA-4 vermittelt [206].

In anderen Tumorentitäten wurde bereits eine erhöhte Expression von dem PD-1-Liganden (PD-L1) beschrieben. Es wird vermutet, dass PD-L1 als ein Ligand an den Rezeptor PD-1 bindet. Durch die Bindung von PD-L1 an PD-1 werden aktivierte T-Zellen inaktiviert bzw. deren Effektor-Funktionen sind durch die Bindung eingeschränkt [206]. Zudem wird angenommen, dass PD-1 auch von T_{regs} exprimiert wird. Bei den T_{regs} führt jedoch die Bindung von PD-L1 an PD-1 zu einer Zunahme der T_{regs} , was sich negativ auf die anti-Tumorantwort auswirken könnte [206]. Beim HCC konnten

tumorinfiltrierende CD8⁺ T-Zellen beschrieben werden, die eine gesteigerte Expression von PD-1 besitzen [207]. Weiterhin konnten Shi et al. zeigen, dass das vermehrte Vorkommen von PD-1/PDL1 zur Apoptose von CD8⁺ T-Zellen bei HCC-Patienten führen kann [208]. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass Kupffer-Zellen über den PD-1-Signalweg die Effektorfunktion von CD8⁺ T-Zellen einschränken können [178, 209].

Wie PD-1 ist CTLA-4 ein weiterer Rezeptor über dessen Signalkaskade die T-Zell-Aktivität eingeschränkt wird [206].

Kalathil et al. konnten erhöhte CTLA-4 positive T_{regs} bei HCC-Patienten nachweisen [210]. Es gibt bereits einige unterschiedliche Tumorentitäten (z.B. das Melanom, das Mamma-Karzinom, das Prostatakarzinom, das Lungenkarzinom) bei denen die Antikörper gegen CTLA-4 Ipilimumab und Tremelimumab zum Einsatz kommen [211, 212]. Zudem gibt es bereits eine klinische Studie, in der Tremelimumab bei Patienten mit HCC und Hepatitis C getestet wurde [213, 214]. Die Ansprechrate lag bei dieser Studie bei 17,6% und die Krankheitskontrolle bei 76,45% [213]. Die Zeit bis zur Progression der Erkrankung betrug 6,48 Monate (95% CI 3.95-9.14) [213].

Die verschiedenen nachgewiesenen immunsuppressiven Mechanismen könnten bei den HCC-Patienten eine Schwächung der Immunantwort darstellen [178]. Man kann davon ausgehen, dass die Immunantwort womöglich besser ausfallen würde, wenn man erreichen könnte diese Faktoren durch beispielsweise effektive Immuntherapie-Konzepte auszuschalten [178]. Somit könnte der Einsatz von CTLA-4-Antikörpern oder die Blockade von PD-1 möglicherweise als immuntherapeutische Strategie eingesetzt werden bzw. sind auch T_{regs} und MDSCs interessante Angriffsziele für immuntherapeutische Ansätze und sie bedürfen besonderer Aufmerksamkeit in Hinblick auf eine erfolgreiche Vakzinierungsstrategie mit dem WT-1 Tumorantigen [113].

4.4 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit gelang der Nachweis von WT1-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut von HCC-Patienten.

Der Vergleich von WT1-spezifischen T-Zell-Antworten mit anderen Krankheitsgruppen zeigte ähnliche Frequenzen in der Gruppe der HCC- und der LZ-Patienten, nicht jedoch bei CH-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe. Es ist daher anzunehmen, dass bereits im zirrhotischen Lebergewebe eine erhöhte WT1-Expression zu finden ist, die potentiell WT1-reaktive T-Zellen induzieren kann. Immuntherapeutische Ansätze mit dem WT1-Antigen könnten daher bereits bei LZ-Patienten in Erwägung gezogen werden.

Die Analyse regulatorischer Zellen zeigte nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix bei HCC-Patienten erhöhte $CD4^+CD25^+CD127^-$ T_{reg} -Frequenzen mit vermehrter TGF β -Sekretion. Sowohl das Vorkommen von T_{regs} als auch die nachgewiesenen höheren Frequenzen der MDSCs bei HCC-Patienten sprechen für immunsuppressive Mechanismen beim HCC, welche die Immunantwort gegen das WT1-Antigen hemmen bzw. die Immunantwort im Rahmen von Vakzinierungs-Strategien mit dem WT1-Antigen einschränken könnten.

Jedoch zeigt diese Arbeit auch, dass trotz des Vorkommens von *Immun-Escape*-Mechanismen, wie beispielsweise T_{regs} und MDSCs bei HCC-Patienten, WT1-spezifische T-Zell-Antworten nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix bei HCC-Patienten auftreten und nachgewiesen werden können.

Immuntherapeutische Ansätze sind daher sehr vielversprechend beim HCC, allerdings sollten neben einer spezifischen Immunstimulation auch die Verringerung vorhandener immunsuppressiver Einflüsse beim HCC berücksichtigt werden. Dazu ist die genauere Analyse und ein besseres Verständnis von *Immun-Escape*-Mechanismen bei HCC-Patienten essentiell.

5 Referenzen

1. Llovet, J.M., A. Burroughs, and J. Bruix, *Hepatocellular carcinoma*. Lancet, 2003. **362**(9399): p. 1907-17.
2. Kensler, T.W., et al., *Translational strategies for cancer prevention in liver*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(5): p. 321-9.
3. Prince, A.M., *Prevention of liver cancer and cirrhosis by vaccines*. Clin Lab Med, 1996. **16**(2): p. 493-505.
4. Chang, M.H., *Hepatitis B virus and cancer prevention*. Recent Results Cancer Res, 2011. **188**: p. 75-84.
5. Donato, F., et al., *Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women*. Am J Epidemiol, 2002. **155**(4): p. 323-31.
6. Trichopoulos, D., et al., *Hepatocellular carcinoma risk factors and disease burden in a European cohort: a nested case-control study*. J Natl Cancer Inst, 2011. **103**(22): p. 1686-95.
7. Hashimoto, E. and K. Tokushige, *Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis: Growing evidence of an epidemic?* Hepatol Res, 2012. **42**(1): p. 1-14.
8. Ertle, J., et al., *Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular carcinoma in the absence of apparent cirrhosis*. Int J Cancer, 2011. **128**(10): p. 2436-43.
9. Stickel, F. and J. Hampe, *Genetic determinants of alcoholic liver disease*. Gut, 2012. **61**(1): p. 150-9.
10. Brechot, C., B. Nalpas, and M.A. Feitelson, *Interactions between alcohol and hepatitis viruses in the liver*. Clin Lab Med, 1996. **16**(2): p. 273-87.
11. Schiff, E.R., *Hepatitis C and alcohol*. Hepatology, 1997. **26**(3 Suppl 1): p. 39S-42S.
12. Bhattacharya, R. and M.C. Shuhart, *Hepatitis C and alcohol: interactions, outcomes, and implications*. J Clin Gastroenterol, 2003. **36**(3): p. 242-52.
13. Zhang, X., et al., *Loss of heterozygosity and methylation of multiple tumor suppressor genes on chromosome 3 in hepatocellular carcinoma*. J Gastroenterol, 2013. **48**(1): p. 132-43.
14. Scharnhorst, V., A.J. van der Eb, and A.G. Jochemsen, *WT1 proteins: functions in growth and differentiation*. Gene, 2001. **273**(2): p. 141-61.
15. Sera, T., et al., *Wilms' tumour 1 gene expression is increased in hepatocellular carcinoma and associated with poor prognosis*. Eur J Cancer, 2008. **44**(4): p. 600-8.
16. Korangy, F., et al., *Immune responses in hepatocellular carcinoma*. Dig Dis, 2010. **28**(1): p. 150-4.
17. Saffroy, R., et al., *New perspectives and strategy research biomarkers for hepatocellular carcinoma*. Clin Chem Lab Med, 2007. **45**(9): p. 1169-79.
18. de Lope, C.R., et al., *Management of HCC*. J Hepatol, 2012. **56**S1: p. S75-S87.
19. Vogl, T.J., et al., *Review on transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma: palliative, combined, neoadjuvant, bridging, and symptomatic indications*. Eur J Radiol, 2009. **72**(3): p. 505-16.
20. Di Stasi, M., et al., *Percutaneous ethanol injection in the treatment of hepatocellular carcinoma. A multicenter survey of evaluation practices and complication rates*. Scand J Gastroenterol, 1997. **32**(11): p. 1168-73.

21. Allgaier, H.P., et al., *Radiofrequency thermal ablation of hepatocellular carcinoma*. Dig Dis, 2001. **19**(4): p. 301-10.
22. Llovet, J.M. and J. Bruix, *Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008*. J Hepatol, 2008. **48 Suppl 1**: p. S20-37.
23. Raoul, J.L., et al., *Relationship between baseline hepatic status and outcome, and effect of sorafenib on liver function: SHARP trial subanalyses*. J Hepatol, 2012.
24. Villanueva, A., et al., *Hepatocellular carcinoma: novel molecular approaches for diagnosis, prognosis, and therapy*. Annu Rev Med, 2010. **61**: p. 317-28.
25. Thomas, M.B., et al., *Systemic therapy for hepatocellular carcinoma: cytotoxic chemotherapy, targeted therapy and immunotherapy*. Ann Surg Oncol, 2008. **15**(4): p. 1008-14.
26. Unitt, E., et al., *Tumour lymphocytic infiltrate and recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation*. J Hepatol, 2006. **45**(2): p. 246-53.
27. Butterfield, L.H., *Immunotherapeutic strategies for hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 2004. **127**(5 Suppl 1): p. S232-41.
28. Dudley, M.E. and S.A. Rosenberg, *Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(9): p. 666-75.
29. Bray, S.M., L. Vujanovic, and L.H. Butterfield, *Dendritic cell-based vaccines positively impact natural killer and regulatory T cells in hepatocellular carcinoma patients*. Clin Dev Immunol, 2011. **2011**: p. 249281.
30. Greten, T.F., M.P. Manns, and F. Korangy, *Immunotherapy of hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2006. **45**(6): p. 868-78.
31. Butterfield, L.H., *Recent advances in immunotherapy for hepatocellular cancer*. Swiss Med Wkly, 2007. **137**(5-6): p. 83-90.
32. Balkwill, F. and A. Mantovani, *Inflammation and cancer: back to Virchow?* Lancet, 2001. **357**(9255): p. 539-45.
33. Ehrlich, P., *Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung*. Beiträge zur experimentellen Pathologie und Chemotherapie, 1909: p. p. 117-164.
34. Burnet, F.M., *Biological approach to carcinogenesis*. Acta Unio Int Contra Cancrum, 1959. **15**(1): p. 31-4.
35. Burnet, M., *Cancer; a biological approach. I. The processes of control*. Br Med J, 1957. **1**(5022): p. 779-86.
36. Thomas, L., *On immunosurveillance in human cancer*. Yale J Biol Med, 1982. **55**(3-4): p. 329-33.
37. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 137-48.
38. Shankaran, V., et al., *IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1107-11.
39. Pardoll, D., *Does the immune system see tumors as foreign or self?* Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 807-39.
40. Vajdic, C.M. and M.T. van Leeuwen, *Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation*. Int J Cancer, 2009. **125**(8): p. 1747-54.
41. Grulich, A.E., et al., *Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis*. Lancet, 2007. **370**(9581): p. 59-67.
42. Nagorsen, D., et al., *Natural T cell immunity against cancer*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(12): p. 4296-303.

43. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-7.
44. Cohen, E.P. and T.S. Kim, *Neoplastic cells that express low levels of MHC class I determinants escape host immunity*. Semin Cancer Biol, 1994. **5**(6): p. 419-28.
45. Coulie, P.G., *A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma*. PNAS, 1995. **92**(17): p. 7976-7980.
46. Robbins, P.F., et al., *A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 1185-92.
47. Smyth, M.J., G.P. Dunn, and R.D. Schreiber, *Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity*. Adv Immunol, 2006. **90**: p. 1-50.
48. Curiel, T.J., et al., *Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival*. Nat Med, 2004. **10**(9): p. 942-9.
49. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 991-8.
50. Blankenstein, T., *Do autochthonous tumors interfere with effector T cell responses?* Semin Cancer Biol, 2007. **17**(4): p. 267-74.
51. Blankenstein, T., *The role of inflammation in tumour growth and tumour suppression*. Novartis Found Symp, 2004. **256**: p. 205-10; discussion 210-4, 259-69.
52. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
53. Parmiani, G., et al., *Unique human tumor antigens: immunobiology and use in clinical trials*. J Immunol, 2007. **178**(4): p. 1975-9.
54. Ohnmacht, G.A. and F.M. Marincola, *Heterogeneity in expression of human leukocyte antigens and melanoma-associated antigens in advanced melanoma*. J Cell Physiol, 2000. **182**(3): p. 332-8.
55. Wang, R.F. and S.A. Rosenberg, *Human tumor antigens for cancer vaccine development*. Immunol Rev, 1999. **170**: p. 85-100.
56. Stevanovic, S., *Identification of tumour-associated T-cell epitopes for vaccine development*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(7): p. 514-20.
57. Boon, T., *Toward a genetic analysis of tumor rejection antigens*. Adv Cancer Res, 1992. **58**: p. 177-210.
58. Boon, T., T.F. Gajewski, and P.G. Coulie, *From defined human tumor antigens to effective immunization?* Immunol Today, 1995. **16**(7): p. 334-6.
59. Rauch, J. and O. Gires, *SEREX, Proteomex, AMIDA, and beyond: Serological screening technologies for target identification*. Proteomics Clin Appl, 2008. **2**(3): p. 355-71.
60. Boon, T. and L.J. Old, *Cancer Tumor antigens*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(5): p. 681-3.
61. Lucas, S., E. De Plaen, and T. Boon, *MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C2, and MAGE-C3: four new members of the MAGE family with tumor-specific expression*. Int J Cancer, 2000. **87**(1): p. 55-60.
62. Coulie, P.G. and A. Van Pel, *Defined antigens recognized by T lymphocytes on human tumors*. Curr Opin Oncol, 1993. **5**(6): p. 1043-8.
63. Coulie, P.G., *Human tumour antigens recognized by T cells: new perspectives for anti-cancer vaccines?* Mol Med Today, 1997. **3**(6): p. 261-8.

64. Robbins, P.F. and Y. Kawakami, *Human tumor antigens recognized by T cells*. *Curr Opin Immunol*, 1996. **8**(5): p. 628-36.
65. Korangy, F., et al., *Spontaneous tumor-specific humoral and cellular immune responses to NY-ESO-1 in hepatocellular carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(13): p. 4332-41.
66. Van den Eynde, B.J. and P. van der Bruggen, *T cell defined tumor antigens*. *Curr Opin Immunol*, 1997. **9**(5): p. 684-93.
67. Lamerz, R., *AFP isoforms and their clinical significance (overview)*. *Anticancer Res*, 1997. **17**(4B): p. 2927-30.
68. Disis, M.L., et al., *Existent T-cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer*. *Cancer Res*, 1994. **54**(1): p. 16-20.
69. Keilholz, U., et al., *Wilms' tumour gene 1 (WT1) in human neoplasia*. *Leukemia*, 2005. **19**(8): p. 1318-23.
70. Meschede, W., et al., *Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer*. *J Clin Microbiol*, 1998. **36**(2): p. 475-80.
71. Murray, R.J., et al., *Identification of target antigens for the human cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus (EBV): implications for the immune control of EBV-positive malignancies*. *J Exp Med*, 1992. **176**(1): p. 157-68.
72. Depil, S., et al., *Expression of a human endogenous retrovirus, HERV-K, in the blood cells of leukemia patients*. *Leukemia*, 2002. **16**(2): p. 254-9.
73. Gentilini, P., et al., *Long course and prognostic factors of virus-induced cirrhosis of the liver*. *Am J Gastroenterol*, 1997. **92**(1): p. 66-72.
74. Lurquin, C., et al., *Structure of the gene of tum- transplantation antigen P91A: the mutated exon encodes a peptide recognized with Ld by cytolytic T cells*. *Cell*, 1989. **58**(2): p. 293-303.
75. Boon, T. and P. van der Bruggen, *Human tumor antigens recognized by T lymphocytes*. *J Exp Med*, 1996. **183**(3): p. 725-9.
76. Bocchia, M., et al., *Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides*. *Blood*, 1996. **87**(9): p. 3587-92.
77. Berke, Z., et al., *Peptides spanning the junctional region of both the abl/bcr and the bcr/abl fusion proteins bind common HLA class I molecules*. *Leukemia*, 2000. **14**(3): p. 419-26.
78. Hogdall, E.V., et al., *P53 autoantibodies in sera from Danish ovarian cancer patients and their correlation with clinical data and prognosis*. *APMIS*, 2002. **110**(7-8): p. 545-53.
79. Ramirez, J.L., et al., *Methylation patterns and K-ras mutations in tumor and paired serum of resected non-small-cell lung cancer patients*. *Cancer Lett*, 2003. **193**(2): p. 207-16.
80. Urban, J.L. and H. Schreiber, *Tumor antigens*. *Annu Rev Immunol*, 1992. **10**: p. 617-44.
81. Van Eynde, A., et al., *Organization and alternate splice products of the gene encoding nuclear inhibitor of protein phosphatase-1 (NIPP-1)*. *Eur J Biochem*, 1999. **261**(1): p. 291-300.
82. Moreau-Aubry, A., et al., *A processed pseudogene codes for a new antigen recognized by a CD8(+) T cell clone on melanoma*. *J Exp Med*, 2000. **191**(9): p. 1617-24.
83. Staib, F., et al., *TP53 and liver carcinogenesis*. *Hum Mutat*, 2003. **21**(3): p. 201-16.

84. Jalanko, H. and E. Ruoslahti, *Differential expression of alpha-fetoprotein and gamma-glutamyltranspeptidase in chemical and spontaneous hepatocarcinogenesis*. *Cancer Res*, 1979. **39**(9): p. 3495-501.
85. Mizukoshi, E., et al., *Expression of multidrug resistance-associated protein 3 and cytotoxic T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma*. *J Hepatol*, 2008. **49**(6): p. 946-54.
86. Grizzi, F., et al., *Usefulness of cancer-testis antigens as biomarkers for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma*. *J Transl Med*, 2007. **5**: p. 3.
87. Fujiwara, K., et al., *Decreased expression of B7 costimulatory molecules and major histocompatibility complex class-I in human hepatocellular carcinoma*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2004. **19**(10): p. 1121-7.
88. Deng, X.L., et al., *Expression of class I MHC molecule, HSP70 and TAP in human hepatocellular carcinoma*. *World J Gastroenterol*, 2003. **9**(8): p. 1853-5.
89. Um, S.H., et al., *Alpha-fetoprotein impairs APC function and induces their apoptosis*. *J Immunol*, 2004. **173**(3): p. 1772-8.
90. Thomas, W.D. and P. Hersey, *TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells*. *J Immunol*, 1998. **161**(5): p. 2195-200.
91. Dobrzanski, M.J., J.B. Reome, and R.W. Dutton, *Type 1 and type 2 CD8+ effector T cell subpopulations promote long-term tumor immunity and protection to progressively growing tumor*. *J Immunol*, 2000. **164**(2): p. 916-25.
92. Hung, K., et al., *The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response*. *J Exp Med*, 1998. **188**(12): p. 2357-68.
93. Sakaguchi, S., *Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance*. *Cell*, 2000. **101**(5): p. 455-8.
94. Morse, M.A., et al., *Immunoregulatory T cells in cancer immunotherapy*. *Expert Opin Biol Ther*, 2002. **2**(8): p. 827-34.
95. Vila, J., J.D. Isaacs, and A.E. Anderson, *Regulatory T cells and autoimmunity*. *Curr Opin Hematol*, 2009. **16**(4): p. 274-9.
96. Andersen, M.H., et al., *Identification of heme oxygenase-1-specific regulatory CD8+ T cells in cancer patients*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(8): p. 2245-56.
97. Li, L. and V.A. Boussiotis, *Molecular and functional heterogeneity of T regulatory cells*. *Clin Immunol*, 2011. **141**(3): p. 244-52.
98. Zou, W., *Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(4): p. 295-307.
99. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(7): p. 523-32.
100. Piccirillo, C.A. and E.M. Shevach, *Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells*. *J Immunol*, 2001. **167**(3): p. 1137-40.
101. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*. *J Exp Med*, 2000. **192**(2): p. 303-10.
102. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober, *Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta*. *J Exp Med*, 2001. **194**(5): p. 629-44.
103. Suri-Payer, E. and H. Cantor, *Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4(+)CD25(+) T cells*. *J Autoimmun*, 2001. **16**(2): p. 115-23.

104. Ormandy, L.A., et al., *Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma*. *Cancer Res*, 2005. **65**(6): p. 2457-64.
105. Fu, J., et al., *Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(7): p. 2328-39.
106. Kobayashi, N., et al., *FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(3): p. 902-11.
107. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(3): p. 162-74.
108. Kusmartsev, S., et al., *Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species*. *J Immunol*, 2004. **172**(2): p. 989-99.
109. Greten, T.F., M.P. Manns, and F. Korangy, *Myeloid derived suppressor cells in human diseases*. *Int Immunopharmacol*, 2011.
110. Haile, L.A., et al., *Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway*. *Gastroenterology*, 2008. **135**(3): p. 871-81, 881 e1-5.
111. Rodriguez, P.C., et al., *Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses*. *Cancer Res*, 2004. **64**(16): p. 5839-49.
112. Bronte, V., et al., *L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions*. *Trends Immunol*, 2003. **24**(6): p. 302-6.
113. Hoechst, B., et al., *A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells*. *Gastroenterology*, 2008. **135**(1): p. 234-43.
114. Nagaraj, S. and D.I. Gabrilovich, *Myeloid-derived suppressor cells in human cancer*. *Cancer J*, 2010. **16**(4): p. 348-53.
115. Pittet, M.J., et al., *High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals*. *J Exp Med*, 1999. **190**(5): p. 705-15.
116. Lee, P.P., et al., *Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients*. *Nat Med*, 1999. **5**(6): p. 677-85.
117. Nagorsen, D., et al., *T cell responses against tumor associated antigens and prognosis in colorectal cancer patients*. *J Transl Med*, 2005. **3**(1): p. 3.
118. Karanikas, V., et al., *High frequency of cytolytic T lymphocytes directed against a tumor-specific mutated antigen detectable with HLA tetramers in the blood of a lung carcinoma patient with long survival*. *Cancer Res*, 2001. **61**(9): p. 3718-24.
119. Feuerer, M., et al., *Enrichment of memory T cells and other profound immunological changes in the bone marrow from untreated breast cancer patients*. *Int J Cancer*, 2001. **92**(1): p. 96-105.
120. Rodolfo, M., et al., *Antigen-specific immunity in neuroblastoma patients: antibody and T-cell recognition of NY-ESO-1 tumor antigen*. *Cancer Res*, 2003. **63**(20): p. 6948-55.
121. Valmori, D., et al., *Circulating Tumor-reactive CD8(+) T cells in melanoma patients contain a CD45RA(+)CCR7(-) effector subset exerting ex vivo tumor-specific cytolytic activity*. *Cancer Res*, 2002. **62**(6): p. 1743-50.
122. Nagorsen, D., et al., *Differences in T-cell immunity toward tumor-associated antigens in colorectal cancer and breast cancer patients*. *Int J Cancer*, 2003. **105**(2): p. 221-5.

123. Nagorsen, D., et al., *Natural T-cell response against MHC class I epitopes of epithelial cell adhesion molecule, her-2/neu, and carcinoembryonic antigen in patients with colorectal cancer*. *Cancer Res*, 2000. **60**(17): p. 4850-4.
124. Slingluff, C.L., Jr., et al., *Clinical and immunologic results of a randomized phase II trial of vaccination using four melanoma peptides either administered in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adjuvant or pulsed on dendritic cells*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(21): p. 4016-26.
125. Mocellin, S., et al., *Part I: Vaccines for solid tumours*. *Lancet Oncol*, 2004. **5**(11): p. 681-9.
126. Restifo, N.P., Rosenberg, S.A., *Use of standard criteria for assessment of cancer vaccines*. *Lancet Oncol.*, 2005. **6**: p. 3-4.
127. Weber, J., *Peptide vaccines for cancer*. *Cancer Invest*, 2002. **20**(2): p. 208-21.
128. Hu, H.M., Y. Chu, and W.J. Urba, *Undefined-antigen vaccines*. *Cancer Treat Res*, 2005. **123**: p. 207-25.
129. Oka, Y., et al., *Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(38): p. 13885-90.
130. Schlom, J., P.M. Arlen, and J.L. Gulley, *Cancer vaccines: moving beyond current paradigms*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(13): p. 3776-82.
131. Finke, L.H., et al., *Lessons from randomized phase III studies with active cancer immunotherapies--outcomes from the 2006 meeting of the Cancer Vaccine Consortium (CVC)*. *Vaccine*, 2007. **25 Suppl 2**: p. B97-B109.
132. Keilholz, U., et al., *A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS*. *Blood*, 2009. **113**(26): p. 6541-8.
133. Walter, S., et al., *Multipeptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival*. *Nat Med*, 2012.
134. Yang, L., et al., *A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story*. *Leukemia*, 2007. **21**(5): p. 868-76.
135. Siehl, J.M., et al., *Expression of Wilms' tumor gene 1 at different stages of acute myeloid leukemia and analysis of its major splice variants*. *Ann Hematol*, 2004. **83**(12): p. 745-50.
136. Cheever, M.A., et al., *The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(17): p. 5323-37.
137. Anguille, S., et al., *Identification of a Wilms' tumor 1-derived immunogenic CD4(+) T-cell epitope that is recognized in the context of common Caucasian HLA-DR haplotypes*. *Leukemia*, 2013. **27**(3): p. 748-50.
138. Scholz, H. and K.M. Kirschner, *A role for the Wilms' tumor protein WT1 in organ development*. *Physiology (Bethesda)*, 2005. **20**: p. 54-9.
139. Inoue, K., et al., *Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia*. *Blood*, 1997. **89**(4): p. 1405-12.
140. Oji, Y., et al., *Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth*. *Jpn J Cancer Res*, 1999. **90**(2): p. 194-204.
141. Oji, Y., et al., *Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers*. *Int J Cancer*, 2002. **100**(3): p. 297-303.
142. Morrison, A.A., R.L. Viney, and M.R. Ladomery, *The post-transcriptional roles of WT1, a multifunctional zinc-finger protein*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1785**(1): p. 55-62.

143. Johnstone, R.W., et al., *A novel repressor, par-4, modulates transcription and growth suppression functions of the Wilms' tumor suppressor WT1*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(12): p. 6945-56.
144. Butterfield, L.H., et al., *Spontaneous and vaccine induced AFP-specific T cell phenotypes in subjects with AFP-positive hepatocellular cancer*. Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(12): p. 1931-43.
145. Liu, Y., et al., *Hierarchy of alpha fetoprotein (AFP)-specific T cell responses in subjects with AFP-positive hepatocellular cancer*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 712-21.
146. Zhang, H.G., et al., *Specific CD8(+) T cell responses to HLA-A2 restricted MAGE-A3 p271-279 peptide in hepatocellular carcinoma patients without vaccination*. Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(12): p. 1945-54.
147. Cicinnati, V.R., et al., *Increased frequencies of CD8+ T lymphocytes recognizing wild-type p53-derived epitopes in peripheral blood correlate with presence of epitope loss tumor variants in patients with hepatocellular carcinoma*. Int J Cancer, 2006. **119**(12): p. 2851-60.
148. Fogh, J., W.C. Wright, and J.D. Loveless, *Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors*. J Natl Cancer Inst, 1977. **58**(2): p. 209-14.
149. Knowles, B.B., C.C. Howe, and D.P. Aden, *Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen*. Science, 1980. **209**(4455): p. 497-9.
150. Nakabayashi, H., et al., *Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium*. Cancer Res, 1982. **42**(9): p. 3858-63.
151. Komatsu, N., et al., *Establishment and characterization of a human leukemic cell line with megakaryocytic features: dependency on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin 3, or erythropoietin for growth and survival*. Cancer Res, 1991. **51**(1): p. 341-8.
152. Minowada, J., T. Onuma, and G.E. Moore, *Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes*. J Natl Cancer Inst, 1972. **49**(3): p. 891-5.
153. Letsch, A., et al., *High frequencies of circulating melanoma-reactive CD8+ T cells in patients with advanced melanoma*. Int J Cancer, 2000. **87**(5): p. 659-64.
154. Letsch, A. and C. Scheibenbogen, *Quantification and characterization of specific T-cells by antigen-specific cytokine production using ELISPOT assay or intracellular cytokine staining*. Methods, 2003. **31**(2): p. 143-9.
155. Arch, R.H. and C.B. Thompson, *4-1BB and Ox40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor kappaB*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(1): p. 558-65.
156. Murillo, O., et al., *Therapeutic antitumor efficacy of anti-CD137 agonistic monoclonal antibody in mouse models of myeloma*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(21): p. 6895-906.
157. Sica, G. and L. Chen, *Biochemical and immunological characteristics of 4-1BB (CD137) receptor and ligand and potential applications in cancer therapy*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 1999. **47**(5): p. 275-9.
158. Shao, Z. and H. Schwarz, *CD137 ligand, a member of the tumor necrosis factor family, regulates immune responses via reverse signal transduction*. J Leukoc Biol, 2011. **89**(1): p. 21-9.

159. Feng, X., et al., *Increased frequency of CD4+CD25(high)FoxP3+ regulatory T cells in patients with hepatocellular carcinoma*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2011. **59**(4): p. 309-14.
160. Shen, X., et al., *Increased prevalence of regulatory T cells in the tumor microenvironment and its correlation with TNM stage of hepatocellular carcinoma*. J Cancer Res Clin Oncol, 2010. **136**(11): p. 1745-54.
161. Nam, K.O., et al., *The therapeutic potential of 4-1BB (CD137) in cancer*. Curr Cancer Drug Targets, 2005. **5**(5): p. 357-63.
162. Goldstein, M.J., et al., *Adoptive Cell Therapy for Lymphoma with CD4 T Cells Depleted of CD137 Expressing Regulatory T Cells*. Cancer Res, 2012.
163. James, E., et al., *Differential suppression of tumor-specific CD8+ T cells by regulatory T cells*. J Immunol, 2010. **185**(9): p. 5048-55.
164. Lindau, D., et al., *The immunosuppressive tumor network: MDSCs, Tregs and NKT cells*. Immunology, 2012.
165. Gabitass, R.F., et al., *Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13*. Cancer Immunol Immunother, 2011. **60**(10): p. 1419-30.
166. Flecken, T., H.C. Spangenberg, and R. Thimme, *Immunobiology of hepatocellular carcinoma*. Langenbecks Arch Surg, 2012. **397**(5): p. 673-80.
167. Bartosch, B., et al., *Hepatitis C virus-induced hepatocarcinogenesis*. J Hepatol, 2009. **51**(4): p. 810-20.
168. Moradpour, D. and H.E. Blum, *Pathogenesis of hepatocellular carcinoma*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2005. **17**(5): p. 477-83.
169. Clay, T.M., et al., *Assays for monitoring cellular immune responses to active immunotherapy of cancer*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(5): p. 1127-35.
170. Mizukoshi, E., et al., *Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific t-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2011. **53**(4): p. 1206-16.
171. Shang, X.Y., et al., *The spontaneous CD8+ T-cell response to HLA-A2-restricted NY-ESO-1b peptide in hepatocellular carcinoma patients*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(20): p. 6946-55.
172. Evdokimova, V.N. and L.H. Butterfield, *Alpha-fetoprotein and other tumour-associated antigens for immunotherapy of hepatocellular cancer*. Expert Opin Biol Ther, 2008. **8**(3): p. 325-36.
173. Flecken, T., et al., *Immunodominance and functional alterations of tumor-associated antigen-specific CD8 T-cell responses in hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2013.
174. Taketomi, A., et al., *Natural killer cell activity in patients with hepatocellular carcinoma: a new prognostic indicator after hepatectomy*. Cancer, 1998. **83**(1): p. 58-63.
175. Komori, H., et al., *Identification of HLA-A2- or HLA-A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy of hepatocellular carcinoma*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(9): p. 2689-97.
176. Scheibenbogen, C., et al., *CD8 T-cell responses to Wilms tumor gene product WT1 and proteinase 3 in patients with acute myeloid leukemia*. Blood, 2002. **100**(6): p. 2132-7.
177. Schmidt, N., C. Neumann-Haefelin, and R. Thimme, *Cellular immune responses to hepatocellular carcinoma: lessons for immunotherapy*. Dig Dis, 2012. **30**(5): p. 483-91.

178. Breous, E. and R. Thimme, *Potential of immunotherapy for hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2011. **54**(4): p. 830-4.
179. Jager, E., et al., *Humoral immune responses of cancer patients against "Cancer-Testis" antigen NY-ESO-1: correlation with clinical events*. Int J Cancer, 1999. **84**(5): p. 506-10.
180. Thimme, R., et al., *Comprehensive analysis of the alpha-fetoprotein-specific CD8+ T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2008. **48**(6): p. 1821-33.
181. Filmus, J. and M. Capurro, *Glypican-3: a marker and a therapeutic target in hepatocellular carcinoma*. FEBS J, 2013.
182. Mizukoshi, E., et al., *Cytotoxic T cell responses to human telomerase reverse transcriptase in patients with hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2006. **43**(6): p. 1284-94.
183. Ishii, S. and M.J. Koziel, *Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis C virus*. Clin Immunol, 2008. **128**(2): p. 133-47.
184. Claassen, E.A., et al., *Activation and inactivation of antiviral CD8 T cell responses during murine pneumovirus infection*. J Immunol, 2005. **175**(10): p. 6597-604.
185. Shrivastava, S., et al., *Increased regulatory T cells and impaired functions of circulating CD8 T lymphocytes is associated with viral persistence in Hepatitis B virus-positive newborns*. J Viral Hepat, 2013. **20**(8): p. 582-91.
186. Zhao, F., F. Korangy, and T.F. Greten, *Cellular immune suppressor mechanisms in patients with hepatocellular carcinoma*. Dig Dis, 2012. **30**(5): p. 477-82.
187. Yoshizawa, K., et al., *Expansion of CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells in hepatitis C virus-related chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma*. Hepatol Res, 2010. **40**(2): p. 179-87.
188. Hoechst, B., et al., *Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the NKp30 receptor*. Hepatology, 2009. **50**(3): p. 799-807.
189. Demirkiran, A., et al., *Low circulating regulatory T-cell levels after acute rejection in liver transplantation*. Liver Transpl, 2006. **12**(2): p. 277-84.
190. Demirkiran, A., et al., *Impact of immunosuppressive drugs on CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells: does in vitro evidence translate to the clinical setting?* Transplantation, 2008. **85**(6): p. 783-9.
191. Unitt, E., et al., *Compromised lymphocytes infiltrate hepatocellular carcinoma: the role of T-regulatory cells*. Hepatology, 2005. **41**(4): p. 722-30.
192. Cabrera, R., et al., *An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection*. Hepatology, 2004. **40**(5): p. 1062-71.
193. Rushbrook, S.M., et al., *Regulatory T cells suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during persistent hepatitis C virus infection*. J Virol, 2005. **79**(12): p. 7852-9.
194. Filipazzi, P., et al., *Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine*. J Clin Oncol, 2007. **25**(18): p. 2546-53.
195. Srivastava, M.K., et al., *Lung cancer patients' CD4(+) T cells are activated in vitro by MHC II cell-based vaccines despite the presence of myeloid-derived suppressor cells*. Cancer Immunol Immunother, 2008. **57**(10): p. 1493-504.

196. Ko, J.S., et al., *Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(6): p. 2148-57.
197. Mizukoshi, E., et al., *Enhancement of tumor-associated antigen-specific T cell responses by radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2012.
198. Suresh, K.G., et al., *Higher frequencies of GARP+ CTLA-4+ Foxp3+ T regulatory cells and myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients are associated with impaired T cell functionality*. Cancer Res, 2013.
199. Fujimura, T., K. Mahnke, and A.H. Enk, *Myeloid derived suppressor cells and their role in tolerance induction in cancer*. J Dermatol Sci, 2010. **59**(1): p. 1-6.
200. Kao, J., et al., *Targeting immune suppressing myeloid-derived suppressor cells in oncology*. Crit Rev Oncol Hematol, 2011. **77**(1): p. 12-9.
201. Golovina, T.N. and R.H. Vonderheide, *Regulatory T cells: overcoming suppression of T-cell immunity*. Cancer J, 2010. **16**(4): p. 342-7.
202. Greten, T.F., et al., *Low-dose cyclophosphamide treatment impairs regulatory T cells and unmasks AFP-specific CD4+ T-cell responses in patients with advanced HCC*. J Immunother, 2010. **33**(2): p. 211-8.
203. Finke, J.H., et al., *Sunitinib reverses type-1 immune suppression and decreases T-regulatory cells in renal cell carcinoma patients*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(20): p. 6674-82.
204. Mirza, N., et al., *All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients*. Cancer Res, 2006. **66**(18): p. 9299-307.
205. Haile, L.A., T.F. Greten, and F. Korangy, *Immune suppression: the hallmark of myeloid derived suppressor cells*. Immunol Invest, 2012. **41**(6-7): p. 581-94.
206. Pardoll, D.M., *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 252-64.
207. Shi, F., et al., *PD-1 and PD-L1 upregulation promotes CD8(+) T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients*. Int J Cancer, 2011. **128**(4): p. 887-96.
208. Zeng, Z., et al., *Upregulation of circulating PD-L1/PD-1 is associated with poor post-cryoablation prognosis in patients with HBV-related hepatocellular carcinoma*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e23621.
209. Wu, K., et al., *Kupffer cell suppression of CD8+ T cells in human hepatocellular carcinoma is mediated by B7-H1/programmed death-1 interactions*. Cancer Res, 2009. **69**(20): p. 8067-75.
210. Kalathil, S., et al., *Higher frequencies of GARP(+)CTLA-4(+)Foxp3(+) T regulatory cells and myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients are associated with impaired T-cell functionality*. Cancer Res, 2013. **73**(8): p. 2435-44.
211. Ileana, E., S. Champiat, and J.C. Soria, *Immune-Checkpoints : the new anti-cancer immunotherapies*. Bull Cancer, 2013. **100**(6): p. 601-610.
212. Mocellin, S. and D. Nitti, *CTLA-4 blockade and the renaissance of cancer immunotherapy*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1836**(2): p. 187-196.
213. Sangro, B., et al., *A clinical trial of CTLA-4 blockade with tremelimumab in patients with hepatocellular carcinoma and chronic hepatitis C*. J Hepatol, 2013. **59**(1): p. 81-8.
214. Yao, S., Y. Zhu, and L. Chen, *Advances in targeting cell surface signalling molecules for immune modulation*. Nat Rev Drug Discov, 2013. **12**(2): p. 130-46.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Risikofaktoren für das HCC	14
Abbildung 2: Entwicklung eines HCCs aus einer chronischen Hepatopathie	15
Abbildung 3: Immuntherapeutische Ansätze gegen Tumorzellen	17
Abbildung 4: Drei Phasen eines Tumor Immunoediting	20
Abbildung 5: Entstehung und Funktion der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	25
Abbildung 6: Mechanismen von T _{regs} zur Unterdrückung einer Immunreaktion	27
Abbildung 7: Der Ursprung von MDSCs	29
Abbildung 8: Schematische Darstellung des WT1-Proteins	32
Abbildung 9 Spontane Immunantwort von CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen gegen Tumorzelllinien	50
Abbildung 10: Immunantwort von spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen gegen Tumorzellen	52
Abbildung 11. Auswertungsstrategie zur Identifizierung von CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellen und deren Zytokinsekretion	53
Abbildung 12: CD3 ⁺ CD4 ⁺ T-Zell TNF α -Zytokin-Antworten nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix	55
Abbildung 13: CD3 ⁺ CD4 ⁺ T-Zell IFN γ -Zytokin-Antworten nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix	55
Abbildung 14: CD3 ⁺ CD4 ⁺ T-Zell-Zytokin-Antworten nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix	56
Abbildung 15: CD4 ⁺ IFN γ ⁺ und CD4 ⁺ TNF α ⁺ Frequenzen bei hepatologischen Erkrankungen und bei der gesunden Kontrollgruppe	57
Abbildung 16: CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-Zell IFN γ -Zytokin-Antworten nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix	59
Abbildung 17: CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-Zell TNF α -Zytokin-Antworten nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix	59
Abbildung 18: CD3 ⁺ CD8 ⁺ T-Zell-Zytokin-Antworten nach Stimulation mit dem WT1-Peptidmix	60
Abbildung 19: CD8 ⁺ IFN γ ⁺ - und CD8 ⁺ TNF α ⁺ -Frequenzen bei hepatologischen Erkrankungen und bei der gesunden Kontrollgruppe	61
Abbildung 20: CD4 ⁺ CD137 ⁻ - und CD8 ⁺ CD137 ⁺ -Frequenzen bei hepatologischen Erkrankungen und bei der gesunden Kontrollgruppe	63

Abbildung 21: Auswertungsstrategie zur Identifizierung von T_{regs} und der Sekretion von TGF β	65
Abbildung 22: T_{reg} -Frequenzen bei hepatologischen Erkrankungen und bei der gesunden Kontrollgruppe	66
Abbildung 23: Funktionelle Analyse der TGF β -Frequenzen bei hepatologischen Erkrankungen und bei der gesunden Kontrollgruppe	68
Abbildung 24: Expression des Aktivierungsmarkers CD137 bei hepatologischen Erkrankungen	69
Abbildung 25: Auswertungsstrategie zur Identifizierung von MDSCs	71
Abbildung 26: CD14 ⁺ HLADR ^{low} MDSC-Frequenzen bei Patienten mit HCC, LZ und CH sowie bei der gesunden Kontrollgruppe	72
Abbildung 27: Verteilung der CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ T_{regs} und der CD14 ⁺ HLADR ^{low} MDSCs bei Patienten mit chronischer Hepatitis (CH), Leberzirrhose (LZ) und hepatozellulärem Carcinom (HCC) sowie bei der gesunden Kontrollgruppe (Kontrolle)	74
Abbildung 28: Korrelation zwischen den CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ⁻ T_{regs} und den MDSCs	75
Abbildung 29: Zusammenhang zwischen T_{regs} und Viruskopien im Blut bei Patienten mit chronischer Hepatitis.	76

7 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Susanne Döring, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „T-Zell Immunität beim Hepatozellulären Karzinom am Beispiel des Tumorantigens Wilms-Tumor-Protein-1 als potentiell Targetantigen immuntherapeutischer Ansätze“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Susanne Döring

8 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9 Danksagung

Ich möchte Frau Prof. Dr. med. C. Scheibenbogen meinen Dank bei der Unterstützung dieses Promotionsthemas aussprechen.

Ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. A Letsch für Ihre sehr hilfreiche und fürsorgliche Betreuung während der gesamten Dissertation.

Für die technische Unterstützung und geduldige Einarbeitung in die Methodik dieser Dissertation und für die sehr angenehme Laboratmosphäre und die vielen Diskussionen beim Mittagessen, durch die die zahlreichen Laborstunden immer auch eine freundschaftliche Komponente verband, danke ich Frau Sandra Bauer und Herrn David Stather.

Meinen Eltern möchte ich von ganzem Herzen für Ihre liebevolle und großzügige Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung danken – ohne sie wäre all dies nicht möglich gewesen.

Meinen Freundinnen Julie Schwender, Naomi Kirch und Elisabeth Dettbarn danke ich für Ihre Freundschaft, Ihre Begleitung und Unterstützung während des Studiums – durch Euch ist diese Zeit unvergesslich geworden.

Liebevoller Dank gilt meinem Mann Robert Elibay-Hartog für seine Geduld, für seine Ermutigungen und für sein Verständnis, durch Dich erscheint mir alles möglich zu sein.

Danke.