

AUS DER ABTEILUNG  
FÜR HÄMATOLOGIE UND INTERNISTISCHE ONKOLOGIE  
(Direktor: Professor Dr. med. Reinhard Andreesen)  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG DES  
IMMUNEFFEKTORZELLINFILTRATES BEIM PRIMÄREN NIERENZELLKARZINOM

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Hans Schlösser

2008

Dekan:	Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Andreas Mackensen
2. Berichterstatter:	PD Dr. med. Maximilian Burger
Tag der mündlichen Prüfung:	17.12.2008

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Nierenzellkarzinom.....</b>	<b>3</b>
1.1.1	Epidemiologie, Staging und Prognose des Nierenzellkarzinoms .....	3
1.1.2	Klinik und Diagnose des Nierenzellkarzinoms .....	6
1.1.3	Chirurgische Therapie des Nierenzellkarzinoms .....	7
<b>1.2</b>	<b>Systemische Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms .....</b>	<b>9</b>
1.2.1	Konventionelle Chemotherapie .....	9
1.2.2	Therapie des Nierenzellkarzinoms mit Tyrosinkinaseinhibitoren .....	10
1.2.3	Immunologische Therapie des Nierenzellkarzinoms.....	13
1.2.3.1	Immunüberwachung von Tumorzellen und Immunevasion .....	13
1.2.3.2	Immuntherapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms .....	18
<b>1.3</b>	<b>Zielsetzung dieser Arbeit .....</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>24</b>
2.1.1	Reagenzien .....	24
2.1.2	Medien.....	25
2.1.3	Antikörper für durchflußzytometrische Messungen .....	26
2.1.4	Antikörper für immunhistochemische Färbungen .....	27
2.1.5	Primer .....	27
2.1.6	Laborgeräte.....	28
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>29</b>
2.2.1	Patientenselektion und Gewebegewinnung .....	29
2.2.2	Aufarbeitung der Gewebeproben .....	30
2.2.2.1	Aufarbeitung der Tumorproben .....	30
2.2.2.2	Aufarbeitung der Normalgewebeproben .....	30
2.2.3	Zellkulturarbeiten .....	31
2.2.3.1	Kultur von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs).....	31
2.2.3.2	Herstellung des T-cell-growth-factor (TCGF).....	31
2.2.3.3	Kultur von Tumorzelllinien .....	32
2.2.3.4	Isolation mononukleärer Zellen mittels Ficoll.....	33
2.2.3.5	Einfrieren und Auftauen von Zellsuspensionen.....	33
2.2.3.6	Bestimmung der Zellzahlen.....	34
2.2.4	Durchflußzytometrie .....	34
2.2.4.1	Aufbau und Funktionsweise des FACSCalibur™-Durchflußzytometers .....	34
2.2.4.2	Auswertung der im FACSCalibur akquirierten Daten mittels WinMDI.....	36
2.2.4.3	Antikörperfärbung zur Messung mittels FACSCalibur .....	37
2.2.5	Polymerasekettenreaktionen.....	38

2.2.5.1	Isolation von mRNA aus Einzellsuspensionen des Tumor- und Normalgewebes mittels einer Quiagen- Säule. ....	38
2.2.5.2	Reverse-Transkription .....	38
2.2.5.3	Quantitative PCR.....	39
2.2.5.4	Spektrumtypisierung des T-Zell-Repertoires.....	40
2.2.6	Immunhistochemie .....	42
2.2.7	Statistische Auswertungen.....	42
<b>3</b>	<b><i>Ergebnisse</i> .....</b>	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Patientencharakteristik .....</b>	<b>43</b>
<b>3.2</b>	<b>Charakterisierung des Primärmaterials und dessen Aufarbeitung.....</b>	<b>45</b>
<b>3.3</b>	<b>Vergleich der lymphozytären Infiltration in Tumor- und Normalgewebe .....</b>	<b>48</b>
3.3.1	Nachweis CD3 positiver Lymphozyten im Tumor- und Normalgewebe.....	48
3.3.2	Vergleichende Phänotypische Charakterisierung der T-lymphozytären Infiltrate im Tumor- und Normalgewebe. ....	52
3.3.3	Nachweis regulatorischer T-Lymphozyten in Tumor- und Normalgewebe beim primären Nierenzellkarzinom. ....	61
3.3.4	Nachweis antigenpräsentierender Zellen in Tumor- und Normalgewebe beim primären Nierenzellkarzinom. ....	64
3.3.5	Phänotypische Charakterisierung von Tumorzellen in Einzellsuspensionen aus primären Nierenzellkarzinomen. ....	66
<b>3.4</b>	<b>Wachstum und phänotypische Charakterisierung kultivierter tumorinfiltrierender Lymphozyten. ....</b>	<b>71</b>
<b>3.5</b>	<b>Wachstum und Charakterisierung der Tumorzellkulturen. ....</b>	<b>73</b>
<b>4</b>	<b><i>Diskussion</i> .....</b>	<b>74</b>
<b>5</b>	<b><i>Zusammenfassende Darstellung</i> .....</b>	<b>83</b>
<b>6</b>	<b><i>Referenzen</i>.....</b>	<b>86</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Nierenzellkarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie, Staging und Prognose des Nierenzellkarzinoms

Karzinome der Niere haben einen Anteil von ca. 3% an allen neu auftretenden Tumorerkrankungen und verursachen weltweit ca. 95000 Todesfälle im Jahr.<sup>1-3</sup> In Deutschland erkranken jährlich etwa 16700 Menschen an malignen Neoplasien der Niere und der ableitenden Harnwege, wobei 85% auf das Nierenzellkarzinom als Malignom des Nierenparenchyms entfallen. Die an einer europäischen Standardpopulation orientierte Inzidenz in Deutschland betrug im Jahre 2002  $21,3/10^5$  für Männer und  $10/10^5$  für Frauen und ist damit die dritthöchste in Europa.<sup>4</sup> Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Frauen bei 70 und für Männer bei 65 Jahren. In den USA beträgt die Inzidenz etwa  $14,6/100000$  für Männer und  $7,0/100000$  für Frauen, wobei zwischen 1975 und 2003 eine kontinuierliche Zunahme der Inzidenz bei relativ konstanter Mortalität beobachtet wurde, was wohl am ehesten auf verbesserte diagnostische Möglichkeiten zurückzuführen ist, die eine häufigere und frühzeitigere Diagnose zur Folge haben.<sup>1,5</sup> Die Entwicklung von Inzidenz und Mortalität in Deutschland zeigte zwischen 1970 und Ende der 90er Jahre eine analoge Tendenz wie in den USA.<sup>4</sup> Risikofaktoren für die Entwicklung eines Nierenzellkarzinoms sind, neben familiären Prädispositionen, Rauchen, Adipositas, Dialyse, Bestrahlung, sowie Exposition mit Trichlorethylen, Cadmium und Asbest.<sup>3,6</sup>

Die UICC und AJCC haben 1997 eine gemeinsame histologische Klassifikation erarbeitet, die neben morphologischen Kriterien auch genetische und pathogenetische Aspekte einbezieht. Die Terminologie basiert auf der Lokalisation im Nephron und dem neoplastisch veränderten Zelltyp, wobei traditionelle Bezeichnungen möglichst beibehalten wurden. Die vorgeschlagene Klassifikation unterscheidet 3 benigne und 5 maligne Neoplasien der Niere (vgl. Tab. 1).<sup>7</sup> Besonders für klarzellige und papilläre Nierenzellkarzinome konnte zudem eine Assoziation mit bestimmten genetischen Veränderungen gezeigt werden.<sup>8</sup> Bei ca. 60% der von einem klarzelligen Nierenzellkarzinom betroffenen Patienten besteht eine Mutation oder ein Heterozygositätsverlust des von-Hippel-Lindau Gens auf Chromosom 3.<sup>3</sup> Papilläre Karzinome sind häufig mit einer Mutation des Proto-Onkogens c-met verbunden. Der überwiegende Teil dieser Mutationen tritt jedoch spontan auf und nur ca. 2% der Nierenzellkarzinome sind hereditär.<sup>9</sup>

<b><u>Maligne Neoplasien der Niere</u></b>		
Klarzelliges Karzinom	70	%
papilläres Karzinom	10-15	%
chromophobes Karzinom	5	%
Sammelrohrkarzinom	<1	%
unklassifiziertes Karzinom	4-5	%

**Tab. 1: Histologische Klassifikation des Nierenzellkarzinoms nach UICC/AJCC.**

Die erste Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms wurde 1958 von Flocks und Kadesky veröffentlicht.<sup>10</sup> Die aktuell gebräuchlichsten sind die der UICC<sup>11</sup> und eine von Robson 1969 publizierte Modifikation der Kadesky- Klassifikation.<sup>12,13</sup> Die Angabe der 5-Jahresüberlebensraten erfolgt in der Regel nach der WHO- Klassifikation (vgl. Tab. 2).

Es ist umstritten, ob die Histologie des Nierenzellkarzinoms ein unabhängiger prognostischer Faktor ist, da einige Studien den histologischen Typ als unabhängigen Prognosefaktor identifiziert haben<sup>14,15</sup>, während andere, nach einer Korrektur von Differenzierungsgrad und Stadium, keinen signifikanten Unterschied zeigen konnten.<sup>16-18</sup> Als gesicherte unabhängige Prognosefaktoren gelten eine erhöhte Serum-Lactatdehydrogenase, ein Hämoglobin-Abfall, eine Serum-Calciumerhöhung, der Grad der Tumordifferenzierung und die Stadieneinteilung nach WHO.

Die Prognose des Nierenzellkarzinoms hat sich im Laufe der letzten 30 Jahre kontinuierlich verbessert. Die American Society of Cancer beschreibt für Patienten, die zwischen 1975 und 1977 diagnostiziert wurden, ein 5-Jahresüberleben von 50,8%, während von Patienten, die zwischen 1996 und 2002 diagnostiziert wurden, 65,7% 5 Jahre überleben.<sup>5</sup> Im Stadium I diagnostizierte Patienten haben mit einem 5-Jahresüberleben von über 90% eine sehr gute Prognose. Die Prognose im Stadium II wird zwischen 74%<sup>19</sup> und über 90%<sup>20</sup> angegeben.<sup>12</sup> Im Stadium III überleben 50-65% der Patienten fünf Jahre, wobei die Prognose für Patienten mit T3 Tumoren ohne Lymphknoteninfiltration wesentlich besser zu sein scheint als für Patienten mit Infiltration der Vena cava oder regionalen Lymphknotenmetastasen.<sup>21</sup> Die Prognose von im Stadium IV diagnostizierten Patienten ist nach wie vor schlecht. 1971 wurde für diese Patienten ein 5-Jahresüberleben von 6%<sup>22</sup> beschrieben. Heute hat die Prognose sich auf 9%<sup>1</sup> bis ca. 20% (vgl. Tab. 3) verbessert. Die häufigsten Metastasenlokalisationen sind

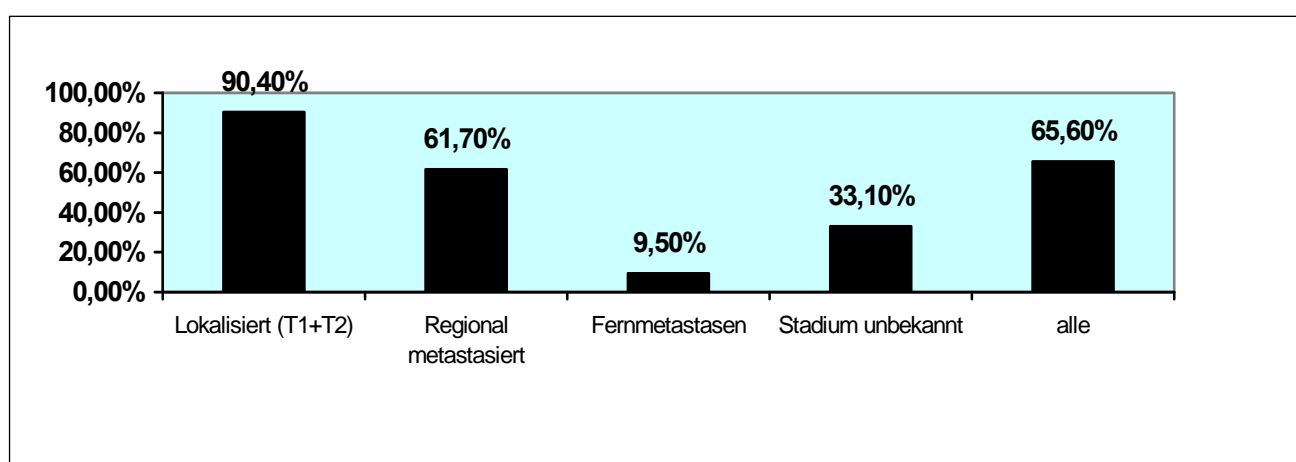
Lunge, Lymphknoten, ZNS, Skelett und Leber. Motzer et al haben für eine Kohorte von 670 Patienten eine Risikostratifizierung anhand der negativen Risikofaktoren Karnofsky-Index, Serumlactatdehydrogenase, erniedrigtes Hämoglobin, erhöhtes Serumcalcium und nicht erfolgter primärer Nephrektomie durchgeführt. Patienten ohne einen dieser Faktoren hatten eine mittlere Überlebenszeit von 20 Monaten, Patienten mit einem oder zwei dieser Faktoren überlebten im Mittel 10 Monate und Patienten mit drei oder mehr hatten eine mittlere Lebenserwartung von nur 4 Monaten.<sup>23</sup>

<b><u>TNM- Klassifikation</u></b>			
<b>T-</b>	<b>Primärtumor</b>	<b>N-</b>	<b>Regionale Lymphknoten</b>
T1	Der Tumor ist auf die Niere begrenzt und kleiner als 7cm in größter Ausdehnung.	NX	Der regionale Lymphknotenstatus ist unklar.
T2	Der Tumor ist auf die Niere begrenzt und größer als 7cm in größter Ausdehnung.	N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen.
T3	Der Tumor breitet sich in größere Venen aus, und/oder infiltriert Nebenniere und perirenales Gewebe, jedoch nicht über die Gerota-Faszie hinaus.	N1	Metastasen in einem einzelnen, regionalen Lymphknoten.
T3a	Infiltration von Nebenniere und perirenalem Gewebe.	N2	Metastasen in mehr als einem regionalen Lymphknoten.
T3b	Ausbreitung in die Vena cava bis unterhalb des Zwerchfells.	<b><u>M- Metastasierung</u></b>	
T3c	Ausbreitung in die Vena cava bis oberhalb des Zwerchfells.	MX	Fernmetastasierung nicht beurteilbar
		M0	Keine Fernmetastasen vorhanden.
		M1	Fernmetastasen vorhanden.
T4	Der Tumor durchbricht die Gerota- Faszie.		
<b><u>Stadieneinteilung</u></b>			
Stadium I	T1, N0, M0	Stadium III	T1-2, N1, M0 T3, N0/N1, M0
Stadium II	T2, N0, M0	Stadium IV	T4, N0/N1, M0 jedes T, N2, M0 jedes T, jedes N, M1

**Tab. 2: TNM- Klassifikation und WHO-Stadieneinteilung des primären Nierenzellkarzinoms.**

	Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV
Patard et al 2005 <sup>18</sup> N=4063	90,1%	77,9%	55,7%	21,9%
Kinouchi et al 1999 <sup>20</sup> N=350	95,6%	95,1%	69,6%	23,6%
Tsui et al 2000 <sup>19</sup> N= 643	91%	74%	67%	32%
Javidan et al 1999 <sup>24</sup> N= 381	95%	88%	59%	20%
Gudbjartsson et al 2005 <sup>16</sup> N=629	92,9%	79,8%	54,6%	11,4%

**Tab. 3: 5-Jahresüberlebensraten einiger aktueller Studien nach WHO-Stadien.**



**Abb. 1-1: 5-Jahresüberlebensraten (1996-2002) der National Cancer Data Base<sup>1</sup>**

### 1.1.2 Klinik und Diagnose des Nierenzellkarzinoms

Die National Cancer Data Base hat zwischen 1996 und 2002 32374 Patienten mit Nierenzellkarzinomen registriert. Bei 54% der Patienten konnte der Tumor in einem lokalisierten Stadium diagnostiziert werden, in dem es noch relativ gute Heilungschancen gibt und 90,4% der Betroffenen fünf Jahre überleben. Bei 21% der neu diagnostizierten Nierenzellkarzinome befand sich die Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose bereits im metastasierten Stadium IV (vgl. Abb. 1-2).

Zu dieser hohen Rate an spät diagnostizierten Karzinomen trägt die eher unspezifische und heterogene Klinik der Erkrankung entscheidend bei. Typische klinische Symptome des Nierenzellkarzinoms und ihre Häufigkeit sind in Tabelle 4 dargestellt.<sup>25</sup> Die klassische Symptomtrias aus Flankenschmerz, Hämaturie und tastbarem Tumor besteht zum Diagnosezeitpunkt nur bei etwa 10% der Patienten.<sup>26</sup> Der zunehmende Einsatz von Ultraschalluntersuchungen, Computertomographien und Magnetresonanztomographien hat zu



einem deutlichen Anstieg der zufällig im frühen Stadium erkannten Nierenzellkarzinome geführt. Ihr Anteil an allen Neudiagnosen betrug 1970 10% und ist bis 1998 auf 61% angestiegen.<sup>12</sup> Ein Ultraschall-Screening könnte zu einer weiteren Steigerung des Anteils der frühzeitig diagnostizierten Karzinome führen, ist aber aufgrund der niedrigen Prävalenz des Nierenzellkarzinoms umstritten.<sup>12</sup> Nach der Diagnose wird zum Staging eine Computertomographie (alternativ Magnetresonanztomographie) des Abdomens, eine Röntgenübersichtsaufnahme des Thorax und eine Abdomensonographie durchgeführt.

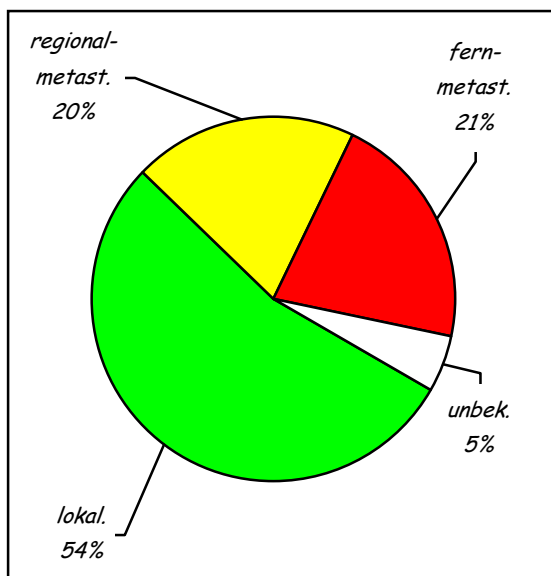


Abb. 1-2: Stadium des RCC zum Diagnosezeitpunkt<sup>1</sup>

Hämaturie	40%-60%
Flankenschmerz	40%
tastbarer Tumor	25%-45%
Anämie	30%
Gewichtsverlust	30%

Tab. 4: Typische Symptome des Nierenzellkarzinoms<sup>25</sup>

### 1.1.3 Chirurgische Therapie des Nierenzellkarzinoms

Die Therapie des lokal begrenzten Nierenzellkarzinoms wurde durch die 1962 von Robson eingeführte radikale Nephrektomie entscheidend verbessert. Durch eine stammgefäßnahe Nierengefäßligatur, eine Adrenalektomie und eine Exzision der gesamten Gerota-Faszie einschließlich des perirenen Fettgewebes und der enthaltenen Lymphknoten konnte das 5-Jahresüberleben von Patienten mit lokalisiertem Nierenzellkarzinom auf 66% gesteigert werden.<sup>12</sup> Seit ein Befall der Nebennieren durch CT und MRT mit einer Sensitivität von nahezu 100% nachgewiesen werden kann, wird bei Patienten mit unauffälligen Nebennieren in der Regel auf eine Adrenalektomie verzichtet. Eine ausgedehnte Lymphknotendisektion, die bei anderen Malignomen einen großen therapeutischen Nutzen aufweist, ist beim

Nierenzellkarzinom nicht indiziert, da die Lymphdrainage der Niere individuell stark variiert und eine Lymphknotenmetastasierung in 99% der Fälle mit einer systemischen Metastasierung vergesellschaftet ist.<sup>27</sup> Bisher konnte für keine adjuvante Therapie eine therapeutische Wirksamkeit gezeigt werden, so dass das lokal begrenzte Nierenzellkarzinom allein chirurgisch therapiert wird.<sup>28</sup>

Das bei Patienten nach einer radikalen Nephrektomie gesteigerte Risiko einer Niereninsuffizienzentwicklung<sup>29,30</sup> kann durch Einsatz der partiellen Nephrektomie reduziert werden. Etliche vergleichende Untersuchungen bei lokalisierten Nierenzellkarzinomen zeigten keinen Nachteil der partiellen gegenüber der radikalen Nephrektomie in Bezug auf 5-Jahresüberleben oder auf die Rate an Lokalrezidiven, wobei umstritten ist, ob alle Tumoren bis 4cm oder alle bis 7cm partiell nephrektomiert werden sollten.<sup>31-35</sup> Dennoch stellt die radikale Nephrektomie noch das am häufigsten eingesetzte Operationsverfahren bei Patienten mit lokalisierten Nierenzellkarzinomen dar.<sup>36,37</sup>

Sowohl die radikale als auch die partielle Nephrektomie wird zunehmend laparoskopisch durchgeführt, um eine Verbesserung des postoperativen klinischen Verlaufs und eine Verringerung des intraoperativen Blutverlustes zu erreichen.<sup>38-40</sup> Noch geringere Invasivität weisen Kryotherapie, Radiofrequenzablation und die Ablation mittels hochintensiven fokussierten Ultraschalls (HIFU) auf, allerdings befinden sich diese Verfahren beim Nierenzellkarzinom zur Zeit noch im experimentellen Stadium.<sup>41-45</sup>

Die Wertigkeit einer chirurgischen Therapie des lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Nierenzellkarzinoms ist umstritten und die Indikation muss nach individueller Abwägung erfolgen. Patienten, die Lymphknotenvergrößerungen im CT bei Abwesenheit von Organmetastasen aufweisen, sollten radikal nephrektomiert werden, da Lymphknotenvergrößerungen beim Nierenzellkarzinom in bis zu 50% nur reaktiv sind.<sup>3</sup> Patienten mit Invasion eines Tumorthrombus in die Vena cava profitieren ebenfalls von der radikalen Nephrektomie und Thrombektomie und haben unter der Voraussetzung tumorfreier Lymphknoten eine 5-Jahresprognose von 30-80%.<sup>46</sup> Die systemische Therapie des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms wird weiter unten ausführlich diskutiert. Zur Klärung der Frage, ob eine Kombination von chirurgischer und systemischer Therapie die Prognose verbessert, haben zwei prospektiv randomisierte Studien den Nutzen einer Interferon- $\alpha$  Immuntherapie mit und ohne vorherige Nephrektomie in einem identischen Studienprotokoll verglichen. In einer kombinierten Analyse mit insgesamt 331 Patienten betrug die mittlere

Überlebenszeit 13,6 Monate für die Nephrektomiegruppe gegenüber 7,8 Monaten für die Gruppe ohne Nephrektomie.<sup>47</sup> Auch die Resektion einer begrenzten Anzahl von Organmetastasen hat gute Ergebnisse gezeigt und sollte in Erwägung gezogen werden. Die besten Ergebnisse wurden bei Patienten mit pulmonalen, metachronen und komplett resektablen Metastasen erzielt, aber auch isolierte Organmetastasen in Leber, Nebenniere, ZNS und Pankreas, sowie lokale Rezidive sind erfolgreich chirurgisch therapiert worden.<sup>48</sup>

## **1.2 Systemische Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms**

### **1.2.1 Konventionelle Chemotherapie**

Im Gegensatz zu anderen soliden Tumoren spricht das Nierenzellkarzinom kaum auf Zytostatika an. Amato hat 154 publizierte Studien zur zytostatischen Therapie des Nierenzellkarzinoms untersucht und Ansprechraten von maximal 4-6% beschrieben, wobei die wenigsten der Studien randomisiert waren, so dass die Ergebnisse nicht vom natürlichen Krankheitsverlauf zu trennen sind.<sup>49</sup> Auch Motzer und Russo beschrieben in einer Revision von 51 Phase-II Studien mit insgesamt 1347 Patienten eine Zytostatikaresistenz des Nierenzellkarzinoms. Der Antimetabolit Floxuridin erwies sich in ersten Studien als viel versprechend: Nach intravenöser Infusion von Floxuridin konnte eine Ansprechrate von 20% gezeigt werden,<sup>50</sup> diese Ergebnisse konnten in Folgestudien jedoch nicht bestätigt werden (Ansprechraten von 0-14%).<sup>51</sup> Neben der Monotherapie wurden Kombinationen mehrerer Zytostatika getestet, um einen synergistischen Effekt zu erzielen. Hierdurch wurden aber meist nur die Nebenwirkungen gesteigert, ohne das Ansprechen des Tumors zu verbessern.<sup>49</sup> Eine Ausnahme stellt die Kombination von Gemcitabin und Capecitabin dar, auf die in einer Phase-II-Studie 21,4% der Patienten ansprachen. Das Patientenkollektiv war allerdings sehr klein und es wurde keine Komplettremission beobachtet, so dass diese Kombination in randomisierten Studien weiter evaluiert werden muss.<sup>52</sup>

Die Zytostatikaresistenz des Nierenzellkarzinoms wurde vielfach auf eine Expression von Membrantransportproteinen zurückgeführt, die konstitutiv im Nierengewebe vorhanden sind. Ein Beispiel für ein solches Protein ist das vom MDR-Gen kodierte P-Glykoprotein, welches sowohl von normalem proximalen Tubuluszellen als auch von Nierenzellkarzinomzellen exprimiert wird.<sup>53</sup> Die Spindelgifte Vinblastin und Doxorubicin sind Substrate dieses Transportproteins, haben aber dennoch eine geringe Wirksamkeit beim Nierenzellkarzinom

zeigt. Dies war Anlass zu Versuchen, die Wirksamkeit von Vinblastin oder Doxorubicin durch Kombination mit Wirkstoffen zu steigern, die die Funktion des P-Glykoproteins hemmen oder die MDR-Genexpression unterbinden. Die vielversprechenden In-vitro-Ergebnisse ließen sich jedoch in klinischen Studien nicht bestätigen.<sup>50</sup> Neben der Hemmung des P-Glykoproteins könnte die Resistenz durch Chemotherapeutika, die kein Substrat des P-Glykoproteins sind, überwunden werden. Eine gute In-vitro-Wirksamkeit zeigte das Spindelgift Pantupilon, das ein sehr schwaches Substrat des P-Glykoproteins ist. Klinische Studien zum Nachweis einer Wirksamkeit in vivo stehen noch aus.<sup>54</sup>

### 1.2.2 Therapie des Nierenzellkarzinoms mit Tyrosinkinaseinhibitoren

Nach dem Mehrstufenmodell der Karzinogenese von Hahn und Weinberg unterliegt eine Tumorzelle einem evolutionären Prozess, in dessen Verlauf sie Eigenschaften entwickelt, die sie zum Überleben und zur Proliferation befähigen. Diese Eigenschaften sind: Immunität gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Apoptoseresistenz, ungebremste Proliferation durch Bildung autokriner Mitosesignale, Angiogenese, sowie, bei fortgeschrittenen Karzinomen, Invasion und Metastasierung. Im Laufe dieses Prozesses finden eine Vielzahl von Mutationen und Inaktivierungen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen statt. Eine solitäre Mutation bewirkt zwar in einer Zellkultur eine Veränderung des Wachstumsverhaltens, zur Karzinomentstehung im Organismus ist sie jedoch nicht hinreichend, sondern muss von anderen begleitet sein.

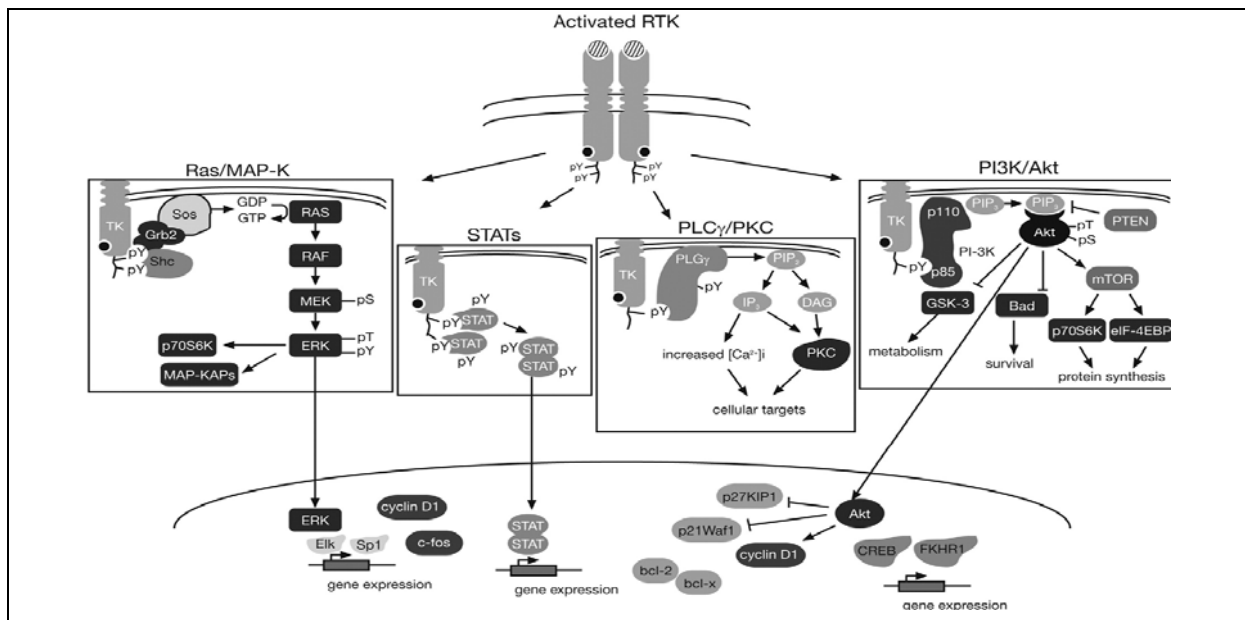


Abb. 1-3: Hauptsignalwege von Rezeptortyrosinkinasen bei der Karzinomentstehung<sup>55</sup>

Eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression haben bestimmte Signaltransduktionswege, die nach Stimulation über Signalkaskaden die Expression von einem oder mehreren Genen modifizieren und so zur malignen Transformation beitragen.<sup>56</sup> Ein Beispiel ist die Aktivierung von Phosphorylierungskaskaden nach Bindung eines Liganden an eine membranständige Rezeptortyrosinkinase. Drei Hauptsignalwegen wird eine zentrale Rolle in der Karzinomentstehung zugeschrieben: Dem Phosphatidylinositol-3-Weg/AKT, der Proteinkinase-C und dem Map-Kinase/Ras-Weg (vgl. Abb. 1-3).<sup>55</sup>

Die Erkenntnis, dass bei mindestens 75% der klarzelligen Nierenzellkarzinome eine Mutation im Bereich des von-Hippel-Lindau-Gens besteht, weist auf dessen zentrale Bedeutung in der Karzinogenese hin. Das Genprodukt des VHL-Gens ist Teil eines Proteinkomplexes, der als Ligase eine Ubiquitinierung von spezifischen Proteinen katalysiert. Eines der identifizierten Zielproteine des VHL-Komplexes ist der Hypoxie-induzierte-Faktor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), dessen physiologische Funktion in einer Expressionssteigerung von Wachstumsfaktoren bei hypoxischem Stress besteht. HIF-1 $\alpha$  wird bei Vorliegen einer VHL-Genmutation nicht mehr abgebaut und führt zur einer Überexpression der angesprochenen Wachstumsfaktoren.<sup>57</sup> Rezeptortyrosinkinasen haben eine zentrale Funktion bei der Regulation von HIF-1 $\alpha$ , da sowohl seine Bildung, als auch die autokrine und parakrine Wirkung vieler der überexprimierten Zytokine mit rezeptortyrosinkinaseabhängigen Signalkaskaden verbunden sind (vgl. Abb. 1-4). VEGF und PDGF führen parakrin über Bindung an ihre Rezeptortyrosinkinasen auf Endothelzellen zur Angiogenese, TGF- $\alpha$  führt über Bindung an seinen Rezeptor EGFR, ebenfalls eine Rezeptortyrosinkinase, zur Proliferation und Apoptoseresistenz.<sup>58</sup>

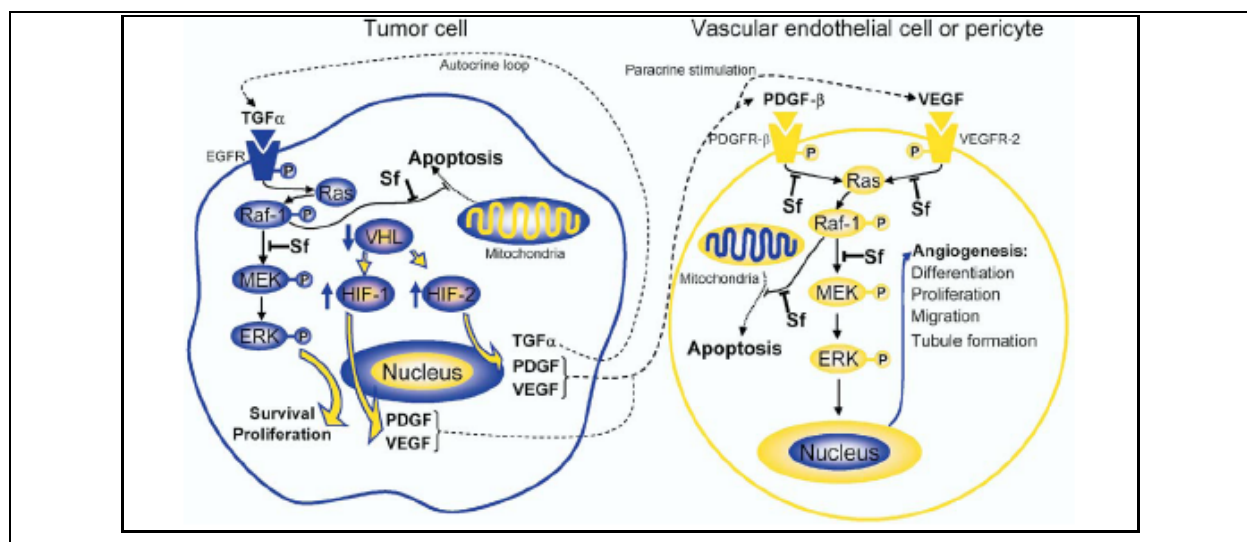


Abb. 1-4: Auto- und Parakrine Wirkungen der bei VHL-Genmutation überexprimierten Wachstumsfaktoren.<sup>58</sup>

Die beschriebene zentrale Funktion der Rezeptortyrosinkinasen hat sie in den Fokus therapeutischen Interesses gerückt und zur Entwicklung und Erprobung von Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren geführt. Dabei haben einige eine gute Wirksamkeit bei Nierenzellkarzinompatienten gezeigt, die auf eine Zytokintherapie nicht angesprochen haben, und sind daher eine Erfolg versprechende neue Therapieoption. Motzer et al beschrieben in einer kombinierten Analyse einer Phase-I und einer Phase-II- Studie mit Sunitinib bei 42% der Patienten partielle Remissionen, sowie bei 24% eine Stabilisierung der Erkrankung für mehr als 3 Monate. Für Sorafenib wurde bereits eine prospektiv-randomisierte Therapiestudie durchgeführt und eine signifikante Verlängerung der Zeit bis zum Progress beschrieben. Sunitinib und Sorafenib sind inzwischen zur Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms zugelassen. Temsirolimus zeigte bei 7% der Patienten ein partielles Ansprechen und bei 43% der Patienten eine Stabilisierung der Erkrankung. Hainsworth et al erreichten in einer Phase-II Studie einer Kombinationstherapie mit Bevacizumab, einem VEGF-Antikörper, und dem Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib bei 25% der Patienten eine partielle Remission und bei 62% der Patienten eine Stabilisierung der Erkrankung. Weniger erfolgreich waren Studien mit Gefitinib, das am EGF-Rezeptor angreift (vgl. Tab. 5).

	<b>Patientenzahl</b>	Zielproteine	Mittlere Zeit bis Progress	stabile Erkr.	partielle Remissionen	Komplettremissionen
Sunitinib Phase-II <sup>59</sup>	168	VEGF, PDGF, KIT, FLT3	8,2(7,8-10,4)	24% >3 Monate	42%	<1%
Sorafenib(Bay 43-9006) Phase II <sup>60</sup>	202	VEGF, FLT3, PDGF, Raf-1-K	10 Monate	-	-	-
Sorafenib Phase-III <sup>58</sup>	769	VEGF, FLT3, PDGF, Raf-1-K	6 Monate	-	-	-
Temsirolimus (CCI-779)	111	mTOR	5,8	fehlt	7%	fehlt
Gefitinib (zd1839) <sup>61</sup>	21	EGFR	2,7 Monate	38%	0%	0%
Gefitinib(zd1839) <sup>62</sup>	28	EGFR	110 Tage	53%	0%	0%
su 5416	29	VEGFR	59 Tage	20,8%	-	-
Erlotinib und bevacizumab <sup>63</sup>	63	EGFR	11 Monate	61% 2 Monate	25%	2%

**Tab. 5: Therapiestudien mit Tyrosinkinaseinhibitoren**

### 1.2.3 Immunologische Therapie des Nierenzellkarzinoms

#### 1.2.3.1 Immunüberwachung von Tumorzellen und Immunevasion

In der Immunologie wird zwischen angeborener und erworbener Immunität unterschieden. Die angeborene Immunität besteht aus der Barrierefunktion der Körperepithelien, Makrophagen, natürlichen Killerzellen und plasmatischen Proteinen, die zu einer Lyse von als fremd erkannten, oder mit Antikörpern besetzten Zellen führen und zusätzlich Granulozyten und andere zelluläre Bestandteile des Immunsystems anlocken. Die Gesamtheit dieser Plasmaproteine bezeichnet man als Komplementsystem. Natürliche Killerzellen bewirken als Effektorzellen der angeborenen zellulären Zytotoxizität eine direkte Lyse von mit Antikörpern beladenen, oder von durch eine Mutation im Bereich des MHC-I Komplexes nicht als körpereigen erkannten Tumorzellen. Der direkte Angriff auf Zielzellen wird über Perforin und Granzyme-B oder durch über Oberflächenrezeptoren vermittelte Apoptose-signale vermittelt.<sup>64</sup>

Bei der erworbenen oder adaptiven Immunität kommt es nach Präsentation eines als fremd erkannten Proteinfragmentes, des Antigens, durch antigenpräsentierende Zellen zu einer klonalen Expansion von Lymphozyten. Man unterscheidet humorale Immunität durch B-Lymphozyten und zelluläre Immunität durch T-Lymphozyten. B-Zellen entfalten ihre Wirkung durch Bildung von Antikörpern und ihre natürliche Funktion besteht in der Abwehr von extrazellulären Erregern und Toxinen. Für ihre Aktivierung benötigen sie zusätzlich zum Antigen kostimulatorische Signale von T-Zellen. Die Gruppe der T-Lymphozyten wird nochmals in CD8-positive zytotoxische T-Zellen und CD4-positive T-Helferzellen unterteilt. Sowohl für T-Helfer-, als auch für zytotoxische T-Zellen konnte das Membranprotein, durch das die Antigenpräsentation erfolgt, isoliert werden. Im murinen Organismus bezeichnet man dieses Molekül als MHC (major histocompatibility complex), im humanen Organismus als HLA (human leucocyte antigen). Dabei werden von der Zelle selbst erzeugte, zytosolische Proteine gespalten und auf MHC-I Komplexen präsentiert, die mit dem T-Zell-Rezeptor der zytotoxischen T-Zellen interagieren. Dieser Präsentationsweg ist vor allem für virale Infektionen, aber auch für Tumorantigene von Bedeutung. Phagozytierte Proteine, beispielsweise Bestandteile von Bakterien oder Tumorzellen, werden gespalten und auf MHC-II Komplexen dem T-Zell-Rezeptor von T-Helferzellen präsentiert. Die MHC-Spezifität, oder MHC-Restriktion der T-Zellen wird durch das CD4-Molekül der T-Helferzellen bzw. das CD8-Molekül der zytotoxischen T-Zellen vermittelt, wobei CD4 an MHC-II und CD8 an

MHC-I bindet. MHC-I wird von fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert, während MHC-II nur auf Zellen des lymphatischen Systems vorkommt. Zur Aktivierung einer naiven T-Zelle bedarf es nicht nur der Erkennung des Komplexes aus MHC und Antigen, sondern auch costimulatorischer Signale, die von der gleichen Zelle exprimiert werden müssen. Es sind drei Zellgruppen beschrieben, die zur Stimulation naiver T-Zellen befähigt sind: Dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen. Die antigenpräsentierenden Zellen wandern nach einer Aktivierung durch Kontakt mit Antigenen in die sekundären lymphatischen Organe, in denen T-Zellen in hoher Konzentration auftreten und somit eine größere Wahrscheinlichkeit für einen Kontakt mit einer spezifischen T-Zelle besteht. Die antigenpräsentierenden Zellen exprimieren zusätzlich zu den MHC ein B7-Molekül, das an CD28 naiver T-Zellen bindet und so das zur klonalen Expansion notwendige costimulatorische Signal erzeugt. Im Rahmen der folgenden klonalen Expansion kommt es zu einer Bildung von T-Effektor und T-Gedächtniszellen. Während cytotoxische T-Effektorzellen durch Perforin und Granzyme-B direkt ein spezifisches Antigen tragende Zellen angreifen, entfalten aktivierte T-Helferzellen ihre Wirkung indirekt durch Ausschüttung von Zytokinen, die zu einer Aktivierung und Chemotaxis von Granulozyten, B-Zellen und Makrophagen führen. Gedächtniszellen sind verantwortlich für eine schnellere und effizientere Immunantwort bei erneuter Exposition des Organismus mit ihrem spezifischen Antigen. Diesen Mechanismus macht man sich bei der Impfung zunutze, indem man dem Organismus für ihn ungefährliche Erreger oder Erregerbestandteile injiziert und so ein immunologisches Gedächtnis erzeugt, das bei Exposition mit dem virulenten Erreger zu einer gesteigerten Immunantwort führt.<sup>65</sup>

Die Frage, ob das Immunsystem aus körpereigenen Zellen entstandene Neoplasien abwehrt, hat schon Ende des 19. Jahrhunderts das Interesse etlicher Forscher geweckt. Paul Ehrlich übertrug Erfahrungen mit Tiermodellen bakterieller Infektionen auf die onkologische Forschung. Er transplantierte Karzinome zwischen Versuchstieren, indem er die Geschwulst entnahm, sie zerkleinerte und anschließend anderen Versuchstieren impfte, wobei die Spezies sich nicht zu stark unterscheiden durften: „Die Grenzen der Übertragbarkeit decken sich dabei mit denen der Bastardbildung.“<sup>66</sup> Die Beobachtung, dass es bei Versuchen zur Übertragbarkeit von Karzinomen zwischen Mäusen nur bei einem geringen Anteil der Empfängertiere tatsächlich zur Karzinomentstehung kam, veranlasste ihn die Hypothese eines natürlichen Abwehrmechanismus gegen Karzinome aufzustellen. Analog zu Versuchen mit Bakterien führte er zur Steigerung der „Virulenz“ seiner Modellkarzinome Impfserien durch, bei denen er die jeweils am besten wachsenden Karzinome auswählte und der nächsten Generation



impfte. Auf diese Weise erhielt er Karzinome unterschiedlicher Entität mit einem spezifischen histologischen Bild und spezifischen Wachstumseigenschaften. In Anlehnung an seinen Zeitgenossen Jensen gelang Ehrlich eine aktive Immunisierung von Mäusen gegen gut wachsende Tumoren durch vorherige Impfung mit schlecht wachsenden Tumoren, wobei der histologische Typ nicht übereinstimmen musste. Jensen beobachtete zudem Rückbildungen von bereits in der Entstehung befindlichen Neoplasien nach Impfung mit abgetöteten Karzinomen. Ein weiteres Argument Ehrlichs für die Existenz einer Immunüberwachung, die neoplastisches Gewebe erkennt, war die These, dass es aufgrund der Komplexität und Störungsanfälligkeit der Embryonalentwicklung einen Schutzmechanismus gegen neoplastisches Gewebe geben müsse.<sup>66,67</sup> Durch die Erfolge in der Erforschung der Transplantatabstoßungsreaktion Anfang der 50er Jahre wuchs auch das Interesse an immunologischen Vorgängen bei der Karzinomentstehung. Burnet und Thomas argumentierten, dass die evolutionsbiologische Ursache der zellulären Transplantatabwehr in der Notwendigkeit eines immunologischen Schutzes gegen spontane Karzinome liege und es sich somit im Grunde um einen natürlichen Schutzmechanismus gegen bei Vertebraten häufig auftretende Mutationen handele. Der experimentelle Beweis gelang zunächst jedoch nicht, da die verfügbaren immunkompromittierten Mäuse, atymische Nacktmäuse, keine gesteigerte Inzidenz von spontanen oder chemisch induzierten Karzinomen aufwiesen.<sup>68,69</sup> Das genauere Verständnis der immunologischen Beeinträchtigung atymischer Nacktmäuse und die Tatsache, dass sie noch eine messbare Population an zytotoxischen  $\alpha\beta$ -T-Zellen aufweisen, erklären aus heutiger Sicht das Scheitern der damaligen Versuche. Shankaran et al konnten 2001 in einer Studie mit Mäusen, die aufgrund einer Mutation im RAG2-Gen keine funktionsfähigen  $\alpha\beta$ -T-, B-, NKT- oder  $\gamma\delta$ -T-Zellen bilden können, eine, gegenüber einer Vergleichsgruppe mit Wildtypmäusen, eindeutig gesteigerte Inzidenz von spontanen und chemisch induzierten Karzinomen zeigen. Zudem zeigten sie, dass Mäuse mit einer Mutation im STAT-1 Gen, das für die intrazelluläre Signalvermittlung des Zytokins IFN- $\beta$  verantwortlich ist, ebenfalls eine gesteigerte Inzidenz aufwiesen.<sup>70,71</sup>

Auch im humanen Organismus gibt es eine Vielzahl von klinischen Beobachtungen, die die Bedeutung des Immunsystems bei Tumorentstehung und Tumorabstoßung unterstützen. Retrospektive Untersuchungen zeigten eine gegenüber der Normalpopulation deutlich gesteigerte Inzidenz von Karzinomen bei aufgrund einer Organtransplantation immunsupprimierten Patienten. Dabei war neben lymphoproliferativen Erkrankungen und viral bedingten Neoplasien, wie z.B. dem Kaposi Sarkom, auch die Inzidenz von Tumoren

gesteigert, für die es keine bekannte infektiöse Genese gibt. So zeigte sich ein gehäuftes Auftreten von Melanomen bei herz-, lungen-, knochenmark- und nierentransplantierten Patienten. Weitere Neoplasien mit gesteigerter Inzidenz waren Basaliome, Plattenepithelkarzinome der Haut, Zungenkarzinome, Schilddrüsenkarzinome und Gliome.<sup>72-75</sup>

Für zahlreiche Malignome konnte eine positive Korrelation von Prognose und Ausmaß der lymphozytären Infiltration gezeigt werden: für Ovarialkarzinom<sup>76,77</sup>, Pankreaskarzinom<sup>78</sup>, Gallengangskarzinom<sup>79</sup>, Seminom<sup>80</sup>, Ösophaguskarzinom<sup>81</sup>, Nierenzellkarzinom<sup>82</sup>, Blasenkarzinom<sup>83</sup> und besonders eindrucksvoll für das Colonkarzinom.<sup>84</sup> Galon et al zeigten in einer 2006 erschienenen Arbeit für das Colonkarzinom eine prognostische Überlegenheit des Ausmaßes der Lymphozyteninfiltration gegenüber der klassischen TNM- Klassifikation.<sup>84</sup> Auch die Tatsache, dass eine unspezifische Stimulation des Immunsystems bei einigen Tumorentitäten zu Tumorremissionen und Verlängerung des Überlebens führt, spricht für eine Bedeutung des Immunsystems bei der Tumorentstehung. Beispiele hierfür sind die intravesikale Injektion von BCG beim Blasenkarzinom und die Therapie des Nierenzellkarzinoms mit IFN- $\alpha$  oder IL-2, auf die im Weiteren genauer eingegangen wird. Die bei ca. 1% der Patienten mit Melanomen oder Nierenzellkarzinomen beobachteten Spontanremissionen deuten ebenfalls auf eine Erkennung und Abstoßung der Karzinome durch das Immunsystem hin.

Gemäß der zu Beginn dieses Kapitels beschriebenen Prinzipien der Immunologie, bedarf es zur Induktion einer zellulären Immunantwort einer Präsentation von tumorspezifischen Antigenen durch spezialisierte antigenpräsentierende Zellen. Diese Antigene werden von T-Zellen und dendritischen Zellen als fremd erkannt, da sie nur im Tumor und nicht auf normalen HLA-positiven Körperzellen vorkommen. Beispielsweise entstehen durch Mutationen neue Antigene, es werden Proteine gebildet, die nur auf männlichen Keimzellen vorkommen, oder es werden Proteine überexprimiert.<sup>65</sup> Da es trotz der beschriebenen Immunüberwachung von Tumorzellen und der Nachweisbarkeit von tumorinfiltrierenden Lymphozyten zur Entstehung von Krebserkrankungen kommt, müssen die Tumorzellen einen Weg finden, dem Immunsystem zu entgehen. Dunn et al beschrieben die Tumorentstehung als interaktiven Prozess, in dessen Verlauf sich Tumor und Immunsystem gegenseitig modifizieren, wobei Tumorzellen, die einer Immunantwort entgehen, einen Selektionsvorteil haben.<sup>68</sup> Bisher beschriebene Mechanismen der Immunevasion sind:<sup>68,85</sup>

- 1) Produktion immuninhibitorischer Zytokine durch Tumorzellen, oder infiltrierende Zellen,
- 2) Antigenverlust der Tumorzellen,
- 3) Chemotaxis regulatorischer T- Zellen,
- 4) Resistenz der Lymphozyten gegen immunstimulatorische Zytokine und
- 5) ein die Funktion von T-Zellen hemmendes Mikromilieu.<sup>85</sup>

Im Folgenden werden die einzelnen Mechanismen genauer erläutert und an Beispielen veranschaulicht, die möglichst aus Untersuchungen am Nierenzellkarzinom stammen. Die Zytokine IL-6, VEGF, M-CSF und IL-1 $\beta$  hemmen die Reifung von dendritischen Zellen<sup>85,86</sup>, TGF- $\beta$ , IL-10 und VEGF hemmen die Aktivierung von dendritischen Zellen und T-Zellen.<sup>87</sup> Für das von einem Großteil der klarzelligen Nierenzellkarzinome exprimierte CD70 konnte gezeigt werden, dass es in-vitro zu einer gesteigerten Apoptose von zytotoxischen T-Zellen führt.<sup>88</sup> Das von Tumorzellen vermehrt gebildete Enzym Indoleamin 2,3- Dioxygenase (IDO) führt über eine gesteigerte Bildung von immuninhibitorischen Tryptophanmetaboliten zu einer Blockade der Bildung von cytotoxischen T Zellen und Apoptose von T-Helferzellen.<sup>85,89</sup> Der Verlust einer zur Immunogenität ausreichenden Expression von HLA-I ist ein bei vielen Karzinomen beobachtetes Phänomen. Für das Nierenzellkarzinom konnte eine Assoziation von HLA-I Minderexpression und ungünstiger Prognose gezeigt werden.<sup>90</sup> Neben einer verminderten Expression des HLA-I, kann auch die Prozessierung des Antigens gestört sein, so dass HLA-I zwar in normaler Konzentration gebildet wird, die Antigenbeladung aber ausbleibt. Für die Proteasombestandteile LMP-2 und LMP-7, sowie das Transportprotein TAP-1, das Proteinbruchstücke aus dem Zytosol ins Endoplasmatische Retikulum transportiert, in dem die Antigenbeladung erfolgt, konnte eine Minderexpression in Nierenzellkarzinomzellen gezeigt werden.<sup>91</sup> Der dritte Mechanismus wird durch Zellen vermittelt, die inhibitorisch auf T-Zellen wirken und vom Tumor angelockt werden. Beschriebene Zellen mit inhibitorischer Funktion sind CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>-T<sub>reg</sub><sup>92</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> $\alpha\beta$ <sup>+</sup>-DN-T-Zellen (doppelt negative  $\alpha\beta$ <sup>+</sup>-T-Zellen)<sup>93</sup>, NKT-Zellen und plasmazytoide dendritische Zellen.<sup>85,94</sup> Für CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>-T<sub>reg</sub>, die durch Positivität für CD3, CD4 und eine starke Expression von CD25 gekennzeichnet sind, konnte beispielsweise beim Ovarialkarzinom eine Assoziation mit einer schlechteren Prognose gezeigt werden.<sup>95</sup> Für das Nierenzellkarzinom ist ihre Funktion unklar und eine starke Infiltration mit CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>-T<sub>reg</sub> zeigte in einer Arbeit von Siddiqui et al keine negative prognostische Bedeutung,<sup>96</sup> während Griffiths et

al eine negative Korrelation von Prognose und relativem Anteil dieser Zellpopulation in peripherem Blut und Tumorgewebe zeigen konnten.<sup>97</sup> Zu Funktion und Nachweisbarkeit von DN-T-Zellen, NKT-Zellen und plasmacytoiden dendritischen Zellen in Nierenzellkarzinomen gibt es bisher keine Untersuchungen. Für Prostatakarzinom, Melanom und Adenokarzinom der Lunge konnte ein vermindertes Ansprechen auf das immunstimulatorische Zytokin IFN- $\gamma$  gezeigt werden. Die normalerweise bei erhöhter Konzentration von IFN- $\gamma$  auftretende vermehrte Expression von HLA-I blieb aus, oder war vermindert.<sup>68</sup> Neben den oben beschriebenen vom Tumor sezernierten Zytokinen, wirkt auch das Mikromilieu im Tumor negativ auf die Proliferation von Immunzellen. Eine Eigenschaft von Karzinomzellen ist die anaerobe Verstoffwechselung von Glucose mit Bildung von Milchsäure, die hemmend auf die Proliferation und Funktion von T-Zellen<sup>98</sup> und dendritischen Zellen<sup>99</sup> wirkt.

#### *1.2.3.2 Immuntherapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms*

Die bei Nierenzellkarzinomen und Melanomen beobachteten Spontanremissionen werden als Hinweis auf eine besondere Immunogenität dieser Tumorentitäten interpretiert. Die Modifikation der Immunantwort ist ein therapeutischer Ansatz, der aufgrund der ausgeprägten Chemotherapieresistenz des Nierenzellkarzinoms vor allem für Patienten in inoperablen Stadien relevant ist. Coppin et al führten eine Metaanalyse von 58 prospektiv-randomisierten Phase II und III-Studien durch, die mindestens ein immuntherapeutisches Agens enthalten. Insgesamt wurden 6880 Patienten mit lokal inoperablen, oder metastasierten Nierenzellkarzinomen eingeschlossen. Dabei erreichten die Immuntherapien eine Remissionsrate (komplett und inkomplett) von 12,4% gegenüber 6% in der Placebo- und 2,4% in der unverblindeten Kontrollgruppe. Eine Korrelation von Remissionsraten und Überleben konnte jedoch nicht gezeigt werden.<sup>100</sup> Das Zytokin Interleukin-2 führt zu einer Aktivierung von T- und NK-Zellen und wurde in den USA aufgrund bei 5-7% der Patienten beobachteter andauernder Komplettremissionen, die bei anderen Therapien äußerst selten sind, zugelassen. Die hochdosierte Therapie ist aufgrund ihrer hohen Toxizität mit häufiger Intensivpflichtigkeit umstritten, zumal eine Verlängerung des 1-Jahres-Überlebens im Vergleich zu einer niedrigeren Dosierung nur für eine Subgruppe mit pulmonalen oder ossären Metastasen gezeigt werden konnte.<sup>100</sup> Das in Europa bevorzugte Zytokin Interferon- $\alpha$  erreichte ähnliche Ansprechraten wie eine niedrigdosierte Interleukin-2-Therapie. Die Metaanalyse von Coppin et al zeigte für die Interferon- $\alpha$  Monotherapie eine Verlängerung des mittleren Überlebens um

3,8 Monate und eine Steigerung des Einjahresüberlebens um 44%. Eine prospektiv randomisierte Studie, die Interferon- $\alpha$  mit einer hochdosierten Interleukin-2-Therapie vergleicht, wurde bisher nicht durchgeführt. Bei Studien zum Nachweis eines synergistischen Effektes der beiden Zytokine erzielte eine kombinierte Gabe zwar höhere Remissionsraten und verlängerte das ereignisfreie Überleben, konnte das Ein-Jahres-Überleben aber nicht steigern.<sup>100</sup> Eine Verbesserung der Therapie durch Hinzunahme eines Zytostatikums war Gegenstand etlicher Studien, als Wirkmechanismus wird neben einer direkten Toxizität für Tumorzellen auch eine Steigerung der Immunogenität durch Endozytose apoptotischer Tumorzellen postuliert. Vielversprechende Ergebnisse durch Kombination von Interleukin-2 und Interferon- $\alpha$  mit 5-Fluorouracil konnten jedoch nicht durch prospektiv-randomisierte Studien bestätigt werden.<sup>50,101,102</sup> Gleiches gilt für eine Therapie mit Interleukin-2 und/oder Interferon- $\alpha$  und 13-cis Retinsäure, einem Wirkstoff, der zur Ausreifung von Tumorzellen führt: Während Aass et al in einer Studie mit 320 Patienten eine Steigerung der Effektivität einer Interferon- $\alpha$  Therapie durch Kombination mit 13-cis-Retinsäure zeigen konnten,<sup>103</sup> ergab eine zuvor von Motzer et al durchgeführte Studie mit insgesamt 284 Patienten keine signifikante Steigerung von Ansprechrate und progressionsfreiem Überleben.<sup>104</sup>

Ein weiterer Ansatz zur Induktion oder Verstärkung einer Immunantwort gegen das Nierenzellkarzinom ist der Einsatz tumorspezifischer Antikörper, die nach Bindung ihres Antigens auf der Zellmembran von Nierenzellkarzinomzellen zur Aktivierung der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität führen. Für den VEGF-Antikörper Bevacizumab, der zusätzlich antiangiogenetisch wirkt, konnte in einer Phase-II-Studie eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens gezeigt werden. Bleumer et al zeigten eine therapeutische Wirksamkeit von Antikörpern gegen die von klarzelligen Nierenzellkarzinomen exprimierte Carboanhydrase IX, die durch gleichzeitige Applikation von niedrigdosiertem Interleukin-2 noch gesteigert werden konnte.<sup>105,106</sup> Eine andere Möglichkeit der therapeutischen Nutzung monoklonaler Antikörper besteht in ihrer Konjugation mit radioaktiven Stoffen. Der therapeutische Einsatz von <sup>131</sup>I-markierten Carboanhydrase-IX-Antikörpern führte zwar zu einer für solide Tumore sehr hohen Anreicherung, wies aber nur eine geringe Effektivität auf.<sup>107,108</sup>

Schon Paul Ehrlich führte in Tierversuchen Impfungen mit Tumoranteilen zur Therapie oder Prävention von Karzinomen durch.<sup>67</sup> Eine erfolgreiche Vakzinierung wäre eine hervorragende Therapie des Nierenzellkarzinoms mit hoher Spezifität und je nach Antigen relativ geringen

Nebenwirkungen. Man unterscheidet zellbasierte von nicht zellbasierten Vakzinierungsverfahren.<sup>109</sup> Bei nicht zellbasierten Verfahren werden autologe Tumorzellen aus einem Resektionspräparat des Patienten gewonnen und durch Lyse oder Bestrahlung so behandelt, dass sie als nicht mehr vermehrungsfähiges Antigengemisch reinjiziert werden können. Repmann et al beobachteten in einer als adjuvante Studie konzipierten Untersuchung, in die insgesamt 236 radikal nephrektomierte Patienten im Stadium T2N0M0 und T3N0M0 eingeschlossen wurden, eine 5-Jahres-Überlebensrate von 86% in der vakzinierten Gruppe gegenüber 71,4% in der Kontrollgruppe. Ein noch größerer Vorteil zeigte sich im Stadium T3N0M0 mit 77,5% 5-Jahres-Überleben in der Vakzine- und 25% in der Kontrollgruppe.<sup>110</sup> Eine große, prospektiv-randomisierte Multicenterstudie mit insgesamt 553 eingeschlossenen Patienten ergab ebenfalls ein signifikant höheres progressionsfreies Überleben für vakzinierte Patienten. Hier waren in der T3-Population nach 70 Monaten 72% der vakzinierten und 59,3% der Patienten in der Kontrollgruppe progressionsfrei.<sup>111</sup> Für Patienten im metastasierten Stadium konnten Pizza et al in einer Pilotstudie mit insgesamt 30 Patienten eine Verlängerung des mittleren Überlebens von 12,2 auf 18,9 Monate durch Vakzinierung mit einem Gemisch aus autologen und allogenen Tumorzellen zeigen.<sup>112</sup> Eine weitere Möglichkeit besteht in der Vakzinierung mit löslichem Antigen, das spezifisch für Nierenzellkarzinomzellen ist. Die Antigene können künstlich hergestellt werden, so dass diese Methode nicht auf komplizierte und störungsanfällige Aufbereitungsverfahren zur Herstellung der Vakzine angewiesen ist. Nach Injektion von Carboanhydrase IX konnte sowohl im Mausmodell als auch an Patienten einer Phase-I-Studie eine spezifische Aktivierung des Immunsystems gezeigt werden. In der Phase-I-Studie wurde bei drei von 29 Patienten eine partielle Remission und bei sechs eine Stabilisierung der Erkrankung erreicht.<sup>113,114</sup> Andere noch genauer zu evaluierende Peptide sind MUC-1 und das Hitze-Schock-Protein-96.

Wesentlich aufwendigere und doch, aufgrund der zentralen Stellung dendritischer Zellen in der Immunregulation, vielversprechende Ansätze verwenden ex vivo generierte autologe oder allogene dendritische Zellen. Dendritische Zellen haben die einzigartige Fähigkeit sowohl die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen, als auch von T-Helferzellen und Zellen der angeborenen Immunität bewirken zu können.<sup>109</sup> Um eine Antwort des Immunsystems auf den Tumor zu erreichen, müssen die dendritischen Zellen tumorspezifische Antigene präsentieren. Das etablierteste Verfahren zur Integration dieser Antigene ist die Elektropermeabilisation, bei der es durch Anlage eines Spannungsfeldes an ein Gemisch aus dendritischen Zellen und Antigen zu einer vorübergehenden Steigerung der Membranpermeabilität und so zum Transfer

des Antigens in die Zellen kommt.<sup>115</sup> Andere Möglichkeiten sind der Einsatz von Vektoren oder die Zellfusion.<sup>116</sup> Berntsen et al fassten 14 bis April 2006 durchgeführte Phase-I/II Studien zur Vakzinierungstherapie des Nierenzellkarzinoms mit dendritischen Zellen zusammen und beschrieben für 73 (37%) der insgesamt 197 Patienten ein Ansprechen, das jedoch meist nur in einer Stabilisierung der Erkrankung bestand. Komplettremissionen wurden in drei der 14 Studien beobachtet, partielle Remissionen in sechs.<sup>116</sup> Holtl et al führten eine Studie zur Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms mit autologen dendritischen Zellen durch, die mit autologem Tumorlysate beladen wurden. Von insgesamt 27 Patienten erfuhren zwei eine Komplettremission, einer eine partielle Remission und bei weiteren sechs Patienten kam es zu einer Stabilisierung der Erkrankung.<sup>117</sup> Wierecky et al behandelten insgesamt 20 Patienten mit mit MUC-1-Peptid beladenen autologen dendritischen Zellen und beschrieben eine 24 Monate andauernde Komplettremission, sowie zwei partielle Remissionen, wobei der Einsatz in vitro generierter Peptide die Herstellung des Vakzins erleichterte und die Messung einer spezifischen Antwort ermöglichte.<sup>118</sup> Gentechnisch modifizierte Tumorzellen, deren Immunogenität durch Transfektion immunstimulatorischer Zytokine oder durch Transfektion costimulatorischer Moleküle wie B-7.1 oder B-7.2 gesteigert werden soll, sind eine andere zellbasierte Strategie zur Induktion einer spezifischen Immunantwort, die jedoch die Nachteile des aufwendigen Verfahrens und der schwierigen Kultivierbarkeit von Tumorzellen beinhalten und bisher keine anderen Verfahren überlegene Ergebnisse brachten.<sup>109</sup>

Die bisher in diesem Kapitel beschriebenen Therapieansätze zielen auf eine in vivo Stimulation des Immunsystems mit Bildung tumorspezifischer Lymphozyten ab. Ein anderer Ansatz ist die in vitro Stimulation autologer Lymphozyten mittels Zytokinen, antigen-präsentierenden Zellen oder Vektoren, der adoptive Zelltransfer. Dabei wurden peripher gewonnene Lymphozyten<sup>119</sup>, Lymphozyten aus Lymphknotenbiopsien<sup>120</sup> oder tumor-infiltrierende Lymphozyten<sup>121</sup> verwendet. Figlin et al schlossen 62 Patienten in eine Studie zur Evaluation einer adjuvanten Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms mittels einer kombinierten Therapie aus Interleukin-2, Interferon- $\alpha$  und aus den Nephrektomiepräparaten gewonnenen tumorinfiltrierenden Lymphozyten ein. Insgesamt sprachen 19(34,6%) der 62 Patienten auf die Therapie an, bei fünf Patienten trat eine komplette und bei 14 eine partielle Remission ein.<sup>121</sup> Eine prospektiv randomisierte Studie mit insgesamt 178 eingeschlossenen Patienten, die entweder ex vivo stimulierte, zytotoxische tumorinfiltrierende Lymphozyten plus rekombinantes Interleukin, oder rekombinantes Interleukin allein erhielten, musste

vorzeitig abgebrochen werden, da sich die beiden Studienarme nicht signifikant unterschieden.<sup>122</sup> Chang et al gewannen tumorspezifische Lymphozyten aus drainierenden Lymphknoten nach Vakzinierung mit Tumorzelllysate und expandierten diese in vitro mittels Interleukin-2 und Anti-CD3-Antikörpern, bis eine ausreichend hohe Zellzahl zur Infusion erreicht war. Von 39 in diese Studie eingeschlossenen Patienten zeigten vier eine komplette und fünf eine partielle Remission.

Der letzte in diesem Kapitel zu besprechende Therapieansatz ist die in der Behandlung hämatologischer Neoplasien etablierte allogene Stammzelltransplantation. Die Beobachtung, dass die Prognose von Patienten, die eine leichte Spender-Gegen-Empfänger-Reaktion erlitten besser ist als die von Patienten, bei denen diese Nebenwirkung nicht auftrat, hat zur Entdeckung der Spender-Gegen-Tumor-Reaktion als einen der Hauptwirkmechanismen dieser ursprünglich zur Erhöhung der Chemotherapiedosis entwickelten Therapie geführt. Da dieser Mechanismus auch bei der Behandlung solider Tumore wirken könnte, wurden Studien zur allogenen Stammzelltransplantation in der Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms und anderer solider Tumore durchgeführt, wobei meist nichtmyeloablative Konditionierungsschemata verwendet wurden.<sup>123</sup> Childs et al konnten in einer Studie mit insgesamt 19 an primären Nierenzellkarzinomen erkrankten Patienten eine Wirksamkeit der Therapie zeigen. Sie beobachteten bei zehn Patienten ein Ansprechen der Therapie, sieben partielle und drei komplette Remissionen. Der Therapieeffekt trat meist einige Monate nach Transplantation und nach Reduktion der immunsuppressiven Therapie auf, was mit einem Spender-Gegen-Tumor-Effekt vereinbar ist. Die allogene Stammzelltransplantation weist auch mit abgeschwächten Konditionierungsschemata eine hohe Toxizität und Mortalität auf. So starben im Verlauf der von Childs et al durchgeführten Studie zwei Patienten an transplantationsbedingten Nebenwirkungen.<sup>124</sup> Im Rahmen einer großen europäischen Multizenterstudie erfolgte bei 124 Nierenzellkarzinompatienten im metastasierten Stadium eine allogene Stammzelltransplantation. 29% der Patienten sprachen auf die Therapie an und es wurde bei vier Patienten ein komplettes und bei 24 ein partielles Ansprechen beobachtet, wobei eine chronische Spender-Gegen-Empfänger-Reaktion mit einer besseren Prognose assoziiert war.<sup>125</sup> Die allogene Stammzelltransplantation hat somit eine therapeutische Wirksamkeit in der Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms gezeigt, bedarf jedoch aufgrund der hohen Toxizität des Verfahrens einer sorgfältigen Auswahl der Patienten, um sicherzustellen, dass nur Patienten behandelt werden, die auch von der Therapie profitieren.



### 1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Die im vorangegangenen Kapitel beschriebene Immunogenität des Nierenzellkarzinoms und die daraus entstandenen Therapieansätze verdeutlichen die Bedeutung eines genaueren Verständnisses der immunologischen Vorgänge im Nierenzellkarzinom, zumal die Prognose, besonders des metastasierten Nierenzellkarzinoms, nach wie vor schlecht ist.

Mit Hilfe durchflußzytometrischer, immunhistochemischer und molekularbiologischer Untersuchungen soll in dieser Arbeit eine vergleichende ex vivo Charakterisierung des Immuneffektorzellinfiltrates im primären Nierenzellkarzinom und im normalen Nierengewebe von Nierenzellkarzinompatienten erfolgen. Durch den Vergleich mit normalem Nierengewebe soll verhindert werden, dass nierenspezifische Beobachtungen als tumorspezifisch fehl gedeutet werden. Des Weiteren wird ein Nachweis der regulatorischen Lymphozytenpopulationen  $CD3^+CD4^+CD25^{high}$ -T<sub>reg</sub> und DN-T-Zellen im Nierenzellkarzinomgewebe angestrebt und es soll untersucht werden, ob diese Zellpopulationen quantitative oder phänotypische Unterschiede zwischen Tumorgewebe und Normalgewebe aufweisen.

Durch quantitative PCR-Analysen der Expression von B7-H1, PD-1 und CD70 in Tumor- und Normalgewebe soll zudem der Einfluss von Mechanismen untersucht werden, mit denen Tumorzellen Immunzellen zur Apoptose anregen, um einer Immunantwort zu entgehen.

Dendritische Zellen können neben der antigenpräsentierenden auch immunregulatorische Funktionen ausüben. Für plasmazytoide Dendritische Zellen wird eine tolerogene Wirkung in malignen Neoplasien angenommen. Um eine Bedeutung der beschriebenen Populationen in der Tumorbilogie des primären Nierenzellkarzinoms zu zeigen wird im Rahmen dieser Arbeit der Vergleich ihrer Infiltration in Tumorgewebe und normales Nierengewebe angestrebt.

Neben dieser ex vivo Charakterisierung einiger zellulärer Bestandteile des primären Nierenzellkarzinoms wird die Erstellung einer Bank aus Tumorzelllinien, kultivierten tumorinfiltrierenden Lymphozyten und von aus peripheren Blutproben der Patienten isolierten mononukleären Zellen angestrebt. Tumorkulturen und Lymphozytenkulturen werden mittels durchflußzytometrischer Analysen phänotypisch charakterisiert und mit den ex-vivo Messungen verglichen.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Reagenzien

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
RPMI 1640	GIBCO, Karlsruhe
Humanes AB- Serum	PAN, Aidenbach
Fetales Kälberserum	BIO Whittaker, Baltimore
Basal Isocove Medium	Biochrom, Berlin
2- Mercaptoethanol	GIBCO, Karlsruhe
Gentamycin 50mg/ml	PAN, Aidenbach
Penicillin/Streptomycin	GIBCO, Karlsruhe
Vitamin Solution	PAN, Aidenbach
L-Glutamin	PAN, Aidenbach
Natriumpyruvat	PAN, Aidenbach
Phosphate buffered saline	GIBCO, Karlsruhe
Ficoll	BIOCHROM, Berlin
Trypanblau 0,4%	GIBCO, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	PAN, Aidenbach
FACS- Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
DMSO	Sigma, München
Interleukin-2	Promocell, Heidelberg
nicht essentielle Aminosäuren in MEM	PAA, Aidenbach
Sodumpyruvat	GIBCO, Karlsruhe
Superscript II	Boehringer, Mannheim
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
Peroxidase	Dako, Hamburg
Hämatoxinilin	Sigma, München
Substrat-chromogen-Lösung	Chemmate
Labeled Polymer, HRP	Dako, Hamburg

## 2.1.2 Medien

Tumorkulturmedium B`	500ml	RPMI 1640
	2ml	Vitamin (100x)
	5ml	L-Glutamin (200mM)
	5ml	MEM
	5ml	Sodiumpyruvat (100mM)
	0,5ml	Mercaptoethanol ( $5 \times 10^{-5}$ M)
	2ml	PenStrep(40 IU/ml Penicillin; 40µg/ml Streptomycin)
	50ml	inaktiviertes fötales Kälberserum
Tumorkulturmedium A`	500ml	RPMI 1640
	2ml	Vitamin (100x)
	5ml	L-Glutamin (200mM)
	5ml	MEM
	5ml	Sodiumpyruvat (100mM)
	0,5ml	Mercaptoethanol ( $5 \times 10^{-5}$ M)
	2ml	PenStrep(40 IU/ml Penicillin; 40µg/ml Streptomycin)
	50ml	humanes AB-Serum
Lymphozytenmedium I` IL-2 TF	500ml	Isocove Basis Medium
	50ml	Humanes AB-Serum
	150IU/ml	Interleukin-2
		TF nach Konzentration
Einfriermedium	90%	FCS
	10%	DMSO

### 2.1.3 Antikörper für durchflußzytometrische Messungen

<u>Antigen</u>	<u>Klon</u>	<u>Isotyp</u>	<u>Produzent</u>
CD-3 FITC	SK7	IgG1	Becton Dickinson
CD16 FITC	368	IgG1	Pharmingen
CD19 FITC	467	IgG1	Becton Dickinson
CD27 FITC	CLB27/1	IgG2a	Caltag
CD45RA FITC	L48	IgG1	Becton Dickinson
CD69 FITC	L78	IgG1	Becton Dickinson
TCR- $\alpha\beta$ FITC	T10B9.1A31	IgM	Pharmingen
Lineage-1 FITC	SK7(CD3);368(CD16);SJ25C1(CD19);L27(CD20);M $\Phi$ P9(CD14)NCAM162(CD56)	IgG1	Becton Dickinson
HLA-A2 FITC	BB7.2	IgG2b	Pharmingen
DaH FITC			Dianova
GaM FITC			Dianova
CD3 PE	SK7	IgG1	Becton Dickinson
CD45 PE	HI30	IgG1	Caltag
HLA-A2 PE	BB7.2	IgG2b	Serotec
CD123 PE	9F5	IgG1	Becton Dickinson
CD4 PerCP	SK3	IgG1	Becton Dickinson
CD14 PerCP	M $\Phi$ P9	IgG2b	Becton Dickinson
CD45 PerCP	2D1	IgG1	Becton Dickinson
HLA-DR PerCP	L243	IgG2a	Becton Dickinson
CD3 APC	UCHT1	IgG1	Pharmingen
CD8 APC	RPA-T8	IgG1	Pharmingen
CD11c APC			
CD25 APC	M-A251	IgG1	Becton Dickinson
CD45 APC	HI30	IgG1	Caltag
CD45RA APC	MEM56	IgG2b	Caltag
CD56 APC	B159	IgG1	Pharmingen
CCR7 APC	150-503	IgG2a	R and D

#### 2.1.4 Antikörper für immunhistochemische Färbungen.

<u>Name</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Vorbehandlung</u>	<u>Hersteller</u>
CD3	1.200	Mikrowelle	Dako Cytomation
CD4	1:5	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , anschl. Mikrowelle	Ventana
CD8	Unverdünnt	Mikrowelle	Ventana
CD56	1:10	Mikrowelle	Novocastra
CD1a	1:2	Mikrowelle	Ventana
CD45RO	1:100	Mikrowelle	Dako Cytomation

#### 2.1.5 Primer

Vβ1	5'-CCG CAC AAC AGT TCC CTG ACT TGC-3'
Vβ2	5'-CAC AAC TAT GTT TTG GTA TCG TC-3'
Vβ3	5'-CGC TTC TCC CTG ATT CTG GAG TCC-3'
Vβ4	5'-TTC CCA TCA GCC GCC CAA ACC TAA-3'
Vβ5	5'-GAT CAA AAC GAG AGG ACA GC-3'
Vβ6a	5'-GAT CCA ATT TCA GGT CAT ACT G-3'
Vβ6b	5'-CAG GG(C/G) CCA GAG TTT CTG AC-3'
Vβ7	5'-CCT GAA TGC CCC AAC AGC TCT-3'
Vβ8	5'-GGT ACA GAC AGA CCA TGA TGC-3'
Vβ9	5'-TTC CCT GGA GCT TGG TGA CTC TGC-3'
Vβ11	5'-GTC AAC AGT CTC CAG AAT AAG G-3'
Vβ12	5'-TCC (C/T)CC TCA CTC TGG AGT C-3'
Vβ13a	5'-GGT ATC GAC AAG ACC CAG GCA-3'
Vβ13b	5'-AGG CTC ATC CAT TAT TCA AAT AC-3'
Vβ14	5'-GGG CTG GGC TTA AGG CAG ATC TAC-3'
Vβ15	5'-CAG GCA CAG GCT AAA TTC TCC CTG-3'
Vβ16	5'-GCC TGC AGA ACT GGA GGA TTC TGG-3'
Vβ17	5'-TCC TCT CAC TGT GAC ATC GGC CCA-3'
Vβ18	5'-CTG CTG AAT TTC CCA AAG AGG GCC-3'
Vβ20	5'-TGC CCC AGA ATC TCT CAG CCT CCA-3'

Vβ21 5'-GGA GTA GAC TCC ACT CTC AAG-3'

Vβ22 5'-GAT CCG GTC CAC AAA GCT GG-3'

Vβ23 5'-ATT CTG AAC TGA ACA TGA GCT CCT-3'

Vβ24 5'-GAC ATC CGC TCA CCA GGC CTG-3'

BC1 5'-GGG TGT GGG AGA TCT CTG-3'

BC2 5'-Fluoreszenzmarker-ACA CAG CGA CCT CGG CTG GG-3'

### 2.1.6 Laborgeräte

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Einfrierbox	Nalgene, Rochester, NY, USA
Einfrierröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Einmalskalpell	Feather, Japan
Eppendorfgefäße (0,1;0,5;1,5;2ml)	Eppendorf, Hamburg
NH <sub>4</sub> -Heparin-Monovette	Sarstedt, Nürnberg
Serum-Monovette	Sarstedt, Nürnberg
Stripetten ( 2/5/10/25/50ml )	Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen ( 15/50 ml )	Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg
96- Well- U-Boden- Platten	Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg
6,12- Well- Platten	COSTAR, Wiesbaden
Zellkulturflaschen (25, 75, 162 cm <sup>2</sup> )	COSTAR, Wiesbaden
Petrishalen, Durchmesser 10 cm	Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalfilter (100µm Porengröße)	Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg
Objektträger	
Deckgläschen	

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Patientenselektion und Gewebegewinnung

Im Rahmen dieser Studie wurden Gewebeproben von Patienten verarbeitet, die aufgrund eines primären Nierenzellkarzinoms in der Urologischen Klinik St.-Josef Regensburg oder in der Urologischen Klinik des Krankenhauses München-Harlaching operiert wurden. Am Tag vor der Operation wurde, nach Aufklärung der Patienten und Vorliegen der unterschriebenen Einverständniserklärung, von jedem Patienten 18ml Blut entnommen und in ein Heparinröhrchen gefüllt. Da sowohl Gewebe vom gesunden, als auch vom Tumorpole der Niere untersucht werden sollte, konnten nur Patienten eingeschlossen werden, bei denen aufgrund der Tumorausdehnung oder anderer Faktoren eine radikale Nephrektomie durchgeführt wurde. Nach Organentnahme wurde die Niere longitudinal gespalten und unter Belassung der Tumorränder ein möglichst großes Gewebestück aus dem Tumorbereich und eines aus einem möglichst weit entfernt gelegenen normalen Bereich der Niere gewonnen. Die Gewebeproben wurden steril in vorbereitete, mit A' befüllte 50ml Falcon-Zentrifugenröhrchen überführt und dann gemeinsam mit den Blutproben schnellstmöglich zur Aufarbeitung in unser Labor transportiert.

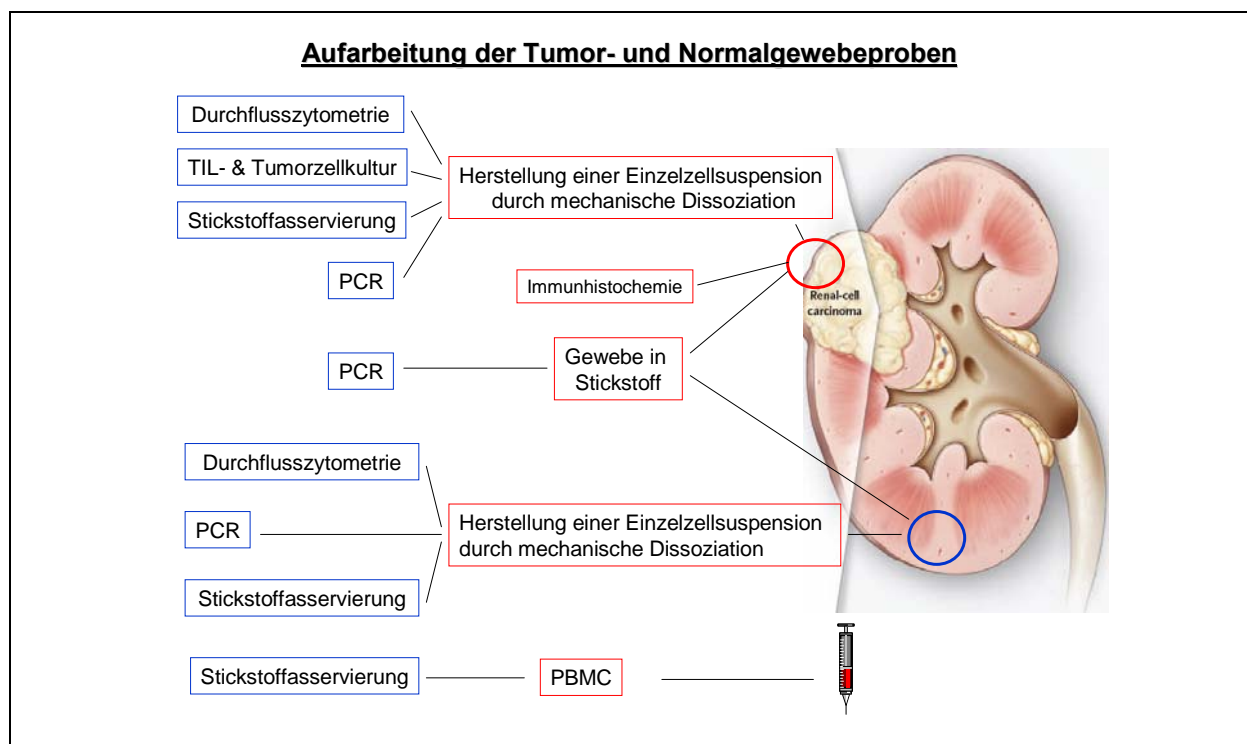


Abb. 2-1: Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen.

Im Labor wurden die Gewebeproben unter der Sterilbank ausgemessen, es wurden einzelne Gewebestücke zur Stickstoffasservierung abgetrennt und im Anschluss wurde das restliche Gewebe zur weiteren Verarbeitung zu einer Einzelzellsuspension aufgearbeitet (vgl. Abb. 2-1).

## 2.2.2 Aufarbeitung der Gewebeproben

### 2.2.2.1 Aufarbeitung der Tumorproben

Das Primärmaterial wurde mit einer Pinzette auf eine sterile Petrischale überführt. Die Größe wurde gemessen und dokumentiert. Zunächst wurden dann zwei etwa 2mm x 2mm große Tumorstücke abgetrennt und zur Stickstoffasservierung in Einfrierröhrchen gegeben. Drei weitere 1mm x 1mm große Tumorstücke wurden zur Kultur von tumorinfiltrierenden Lymphozyten in 6 Well-Platten vorgelegt, mit je 2 ml  $\Gamma$ IL-2 TF bedeckt und dann im Brutschrank inkubiert (vgl. 2.2.3.1). Das übrige Gewebe wurde mit zwei Skalpellensolange zerkleinert, bis keine größeren Stücke mehr vorhanden waren und dann, nach Zugabe von 50 ml B', mit einer Pipette in ein Falcon-Röhrchen gegeben und bei 1200U/min für 10min zentrifugiert. Auf einen enzymatischen Verdau wurde zur Schonung von Oberflächenproteinen bewusst verzichtet. Nach Abpipettieren des Überstandes wurde das Pellet mit 50ml B' resuspendiert und über einen 100 $\mu$ m Einmalfilter in ein 50ml Falcon-Röhrchen filtriert. 50 $\mu$ l der entstandenen Tumorzellsuspension wurden abgenommen, um, nach Anfärbung der toten Zellen mittels Trypanblau, in einer Neubauer Zählkammer die lebenden Zellen zu zählen. Von der Suspension wurden dann möglichst  $5 \times 10^6$  Zellen zur PCR-Analyse lysiert,  $3 \times 10^6$  zur Züchtung von Tumorzellkulturen in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen überführt und  $10 \times 10^6$  zur FACS-Analyse mit Antikörpern gefärbt. Die übrigen Zellen wurden eingefroren (vgl. 2.2.3.5).

### 2.2.2.2 Aufarbeitung der Normalgewebeproben

Die Aufarbeitung des Normalgewebes verlief prinzipiell analog der Aufarbeitung des Tumorgewebes (vgl. 2.2.2.1). Auf eine Kultivierung gewebeinfiltrierender Lymphozyten und eine immunhistochemische Untersuchung des Normalgewebes wurde verzichtet.



## 2.2.3 Zellkulturarbeiten

### 2.2.3.1 Kultur von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs)

Zur Kultur von tumorinfiltrierenden Lymphozyten wurde ein 1mm x 1mm großes Tumorstück mit 2ml IL-2 TF in ein Well einer 6-Well-Platte gegeben. Das Wachstum der Lymphozyten soll dabei durch den Überstand TCGF und das Zytokin IL-2 stimuliert werden (vgl. 2.2.3.2).<sup>126-128</sup> Die Zellen wurden alle zwei Tage beobachtet und gegebenenfalls etwas Medium zugegeben. Nach ausreichendem Wachstum wurden die Zellen geerntet. Etwa ein Viertel der geernteten Zellen wurde zur durchflußzytometrischen Charakterisierung gefärbt, ein Viertel wieder ausgesät und der Rest eingefroren. (vgl.2.2.3.5)

### 2.2.3.2 Herstellung des T-cell-growth-factor (TCGF)

Zur Stimulation des Wachstums von tumorinfiltrierenden Lymphozyten wurde der zytokinhaltige Überstand von bestrahlten Lymphomzellen der Linie LAZ 388 und mononukleären Zellen eines Spenders verwendet.<sup>128</sup> Die genaue Komposition des Überstandes ist nicht bekannt. In vorherigen Arbeiten konnte jedoch gezeigt werden, dass er ein polyklonales, spezifisches Wachstum bewirkt.

Zur Herstellung von einem Liter TCGF wurden zunächst  $400 \times 10^6$  Zellen der Linie LAZ 388 mit 60 Gy bestrahlt.  $2 \times 10^9$  mononukleäre Zellen wurden entweder mittels Ficoll (vgl.2.2.3.4) oder mittels Leukapherese gewonnen und auf sechs 170ml Flaschen verteilt,  $333 \times 10^6$  je Flasche. 18ml A' wurden mit 5µg PMA und 4mg PHA gemischt und dann durch ein 0,2µm Sieb sterilfiltriert. 3ml der Suspension wurden jeder Flasche zugegeben. Die bestrahlten LAZ 388 wurden bei 1200 U/min für 10min zentrifugiert, der Überstand verworfen und dann das Pellet mit 18ml A' resuspendiert. Davon wurden 3ml ( $66,7 \times 10^6$  LAZ 388 bestrahlt) in jede Flasche gegeben und die Flaschen für 3 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach drei Stunden waren adhärenente Zellen am Boden zu sehen und der Überstand konnte vorsichtig abpipettiert werden. Alle Flaschen wurden dreimal vorsichtig mit 50ml A' gespült. Nach Zugabe von 170ml A' wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 36 Stunden Inkubation wurde der Überstand abgenommen, durch ein 0,45µm Sieb sterilfiltriert und in 40ml Portionen eingefroren.

Konzentration	TCGF	Zellsuspension	A'
0	0µl	200µl	200,0µl
1	2,67µl	200µl	197,3µl
2	5,33µl	200µl	194,7µl
3	8,00µl	200µl	192,0µl
4	10,6µl	200µl	189,4µl
5	13,3µl	200µl	186,7µl
6	16,0µl	200µl	184,0µl
7	18,7µl	200µl	181,3µl
8	21,3µl	200µl	178,7µl
9	24,0µl	200µl	176,0µl

**Tab. 6: Verdünnungsreihe zur Konzentrationsbestimmung des TCGF.**

Um eine möglichst spezifische und mit vorherigen Stimulationen vergleichbare Proliferation zu erreichen, muss die Konzentration des TCGF durch einen Stimulationstest bestimmt werden. Wobei empirisch als einfache Konzentration diejenige Konzentration gewählt wurde, welche ein spezifisches und ausreichendes Wachstum bewirkt. Dazu wurden  $8 \times 10^6$  Spenderlymphozyten in 4ml A' aufgenommen und auf 40 Wells einer 96-Well-Platte verteilt. In diesen 40 Wells wurde dann jeweils zwei Reihen vom aktuellen und vom vorherigen TCGF in aufsteigender Konzentration (vgl. Tab. 6) angesetzt und für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Dann wurde  $1\mu\text{Ci } ^3\text{H-Thymidin}$  in jedes Well gegeben. Nach einer weiteren Inkubation für 18 Stunden wurde die Konzentration an eingebautem  $^3\text{H-Thymidin}$  gemessen. Die Konzentration des neu produzierten TCGF, die ein dem vorherigen 1-fach konzentrierten TCGF analoges Wachstum bewirkte, wurde als neue 1-fache Konzentration definiert.

#### *2.2.3.3 Kultur von Tumorzelllinien*

Zur Kultur von Tumorzelllinien wurden ca.  $10^3$  Zellen der nach Aufarbeitung entstandenen Tumorzellsuspension (vgl. 2.2.2.1) mit 15ml B' in einer 75cm<sup>2</sup> Kulturflasche im Brutschrank inkubiert. Bei geringeren Zellzahlen wurde zunächst eine 25cm<sup>2</sup> Kulturflasche mit 7,5ml B' verwendet. Das Wachstum der Kulturen wurde alle zwei Tage beobachtet. Das Medium wurde in etwa viertägigem Abstand gewechselt. Nach Bildung eines geschlossenen Zellrasens wurden die Zellen geerntet und in eine 162cm<sup>2</sup> Kulturflasche mit 20ml B' erneut ausgesät und kultiviert, bis ein geschlossener Zellrasen gewachsen ist. Zum Abernten der Zellen wurde

zunächst das Medium vorsichtig abpipettiert und verworfen. Nach Spülung mit 10-20ml PBS wurden die adhärennten Zellen durch Zugabe von 1-3ml Trypsin/EDTA abgelöst. Nachdem sich unter mikroskopischer Kontrolle alle Zellen abgerundet hatten und in Lösung gegangen waren, wurden sie mit 50ml B' aufgenommen und bei 1300U/min für 7 Minuten zentrifugiert. Die FCS- Komponente des B' inaktiviert das Trypsin. Nach Zentrifugation wurden die Zellen mit B' resuspendiert und gezählt. Ein Drittel der in einer 162cm<sup>2</sup>-Kulturflasche gewachsenen Zellen wurde eingefroren(vgl.2.2.3.5), ein Drittel zur Durchflußzytometrie gefärbt und ein Drittel mit 20ml B', zur weiteren Kultur, in einer 162cm<sup>2</sup> Kulturflasche ausgesät.

#### *2.2.3.4 Isolation mononukleärer Zellen mittels Ficoll*

Aus dem heparinisierten Vollblut wurden mononukleäre Zellen nach dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Dazu wurden 15ml Ficoll Seperating Solution mit maximal 30ml 1:2 mit PBS verdünntem Blut überschichtet. Dann wurde für 30 min bei 1900U/min und 18°C ohne Bremse zentrifugiert. Dabei bildeten sich vier Phasen. In der obersten Schicht sammelten sich Thrombozyten und verdünntes Plasma, in der folgenden Interphase die mononukleären Zellen, unterhalb der Interphase folgte die Ficoll Seperating Solution und am Boden des Röhrchens sedimentieren Erythrozyten und Granulozyten. Die Interphase wurde mit einer 5ml Pipette abgenommen, in einem weiteren Röhrchen mit PBS auf 50ml aufgefüllt und bei 1800 U/min und 4°C für 10min zentrifugiert, der Überstand verworfen und anschließend erneut mit 50ml PBS resuspendiert. Nach Zählung der Zellen wurde bei 1400 U/min und 4°C für 7min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen eingefroren. (vgl.2.2.3.5)

#### *2.2.3.5 Einfrieren und Auftauen von Zellsuspensionen*

Zum Einfrieren von Zellen wurde nach Zählung zunächst bei 1400 U/min und 4°C für 7min zentrifugiert und dann der Überstand verworfen. Je  $7-10 \times 10^6$  Zellen und 1,5ml Einfriermedium wurden in ein Vial gegeben. Die Vials wurden in eine bei 4°C vorgekühlte Einfrierbox gestellt und für mindestens 24 Stunden bei -80°C eingefroren. Dann wurden sie innerhalb einer Woche in einen Stickstofftank eingelagert.

Zum Auftauen wurden 15-20ml Medium in einem 50ml-Falcon-Röhrchen auf 37°C vorgewärmt. Die Vials wurden aus dem Stickstofftank geholt, von außen desinfiziert und

unter der Sterilbank aufgeschraubt. Dann wurde mit je 1ml vorgewärmtem Medium ein Teil der Zellen aufgetaut und in das 50ml-Röhrchen überführt. Diese Prozedur wurde wiederholt, bis alle Zellen gelöst waren. Dann wurde auf 50ml aufgefüllt, bei 1400 U/min und 4°C für 7min zentrifugiert und erneut mit 50ml resuspendiert. Die aufgetauten Zellen konnten nun verwendet werden.

#### *2.2.3.6 Bestimmung der Zellzahlen*

Zur Bestimmung von Zellzahlen in Zellsuspensionen wurde mit 0,1% Trypanblau 1:2 verdünnt und dann in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Durch eine Trypanblaufärbung wurden tote Zellen angefärbt, so dass nur lebende Zellen gezählt wurden. Die Zellzahl wurde dann nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Gezählte Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen der Zellsuspension(ml)} \times 0,01 = \text{Zellzahl} \times 10^6$$

#### *2.2.4 Durchflußzytometrie*

##### *2.2.4.1 Aufbau und Funktionsweise des FACSCalibur<sup>TM</sup>-Durchflußzytometers*

Ein Durchflußzytometer misst die Lichtemission (Fluoreszenz) von Zellen, die in einer laminaren Strömung eingebettet einzeln an einem fokussierten Lichtstrahl vorbeigeführt werden. Für jedes Ereignis werden mehrere Parameter parallel gemessen: die Seitwärtsstreuung, die Vorwärtsstreuung, sowie die Fluoreszenz in verschiedenen Wellenlängen. Das FACSCalibur verfügt über einen luftgeköhlten Argonionenlaser mit einer Anregungswellenlänge von 488nm und einer Leistung von 15mW. Die erzeugte Strahlung wird erst prismatisch aufgeweitet und dann auf das Zentrum des Flüssigkeitsstroms der Messküvette fokussiert.

Für die Bestimmung der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung wird Licht der Anregungswellenlänge gemessen. Die Vorwärtsstreuung (FSC) wird von einem Detektor entlang der Achse des einfallenden Lichts aufgenommen und verhält sich proportional zur Größe der Zelle im Fokus. Die Seitwärtsstreuung verhält sich proportional zur Granularität der Zelle und

wird im 90°-Winkel zum einfallenden Licht gemessen (SSC).<sup>129</sup> Mittels dieser beiden Parameter ist bereits eine grobe Identifizierung von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten möglich (vgl. 2.2.4.2).

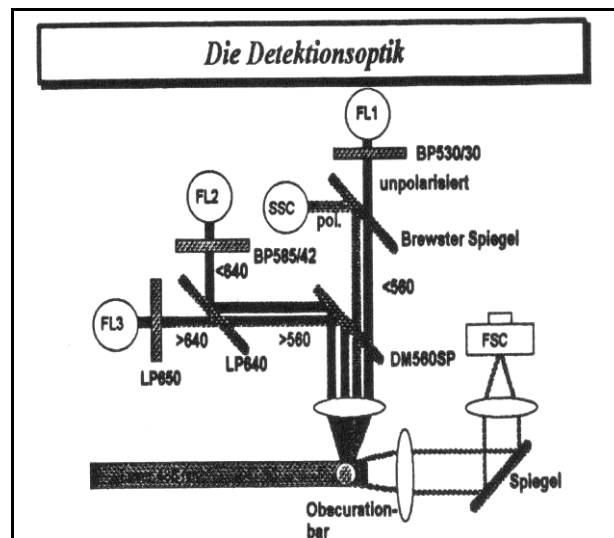


Abb. 2-2: Detektionsoptik des FACScan.<sup>129</sup>

Neben diesen rein morphologischen Parametern ermöglicht die Messung von Fluoreszenzen eine spezifische Anfärbung von bestimmten Oberflächenmolekülen und damit eine genauere Charakterisierung der einzelnen zellulären Subpopulationen in einer Probe. So zeichnen sich beispielsweise T-Helferzellen durch eine, aufgrund der geringen Zellgröße und Granularität, geringe Seitwärts- und Vorwärtsstreuung verbunden mit einer Positivität für CD4 und CD8 aus. Die Färbung der Oberflächenmoleküle erfolgt mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper, die entweder bereits konjugiert bezogen werden können, oder noch im Rahmen der Färbung konjugiert werden müssen. Das Fluoreszenzlicht wird über spezielle Spiegel, die nur Licht ab bzw. bis zu einer bestimmten Wellenlänge passieren lassen, zu den entsprechenden Detektoren geleitet und dort in einen zur Stärke des einfallenden Lichts proportionalen elektrischen Impuls umgewandelt (vgl. Abb. 2-2). Die Empfindlichkeit der Detektoren ist über eine Veränderung ihrer Spannung regulierbar.<sup>65</sup>

Die zur Fluoreszenzmessung verwendeten Fluorochrome verfügen über die Eigenschaft auf einen Lichtreiz einer Wellenlänge innerhalb ihrer Absorptionsspektren Licht einer spezifischen Wellenlänge, der sogenannten Emissionsspektren, zu emittieren. Die Emissionsspektren von parallel verwendeten Fluorochromen müssen so verschieden sein, dass sie mittels des FACScalibur einzeln gemessen werden können. Gleichzeitig müssen sie durch das vom Argonionenlaser erzeugte 488nm Licht angeregt werden. Eine geeignete Kombination

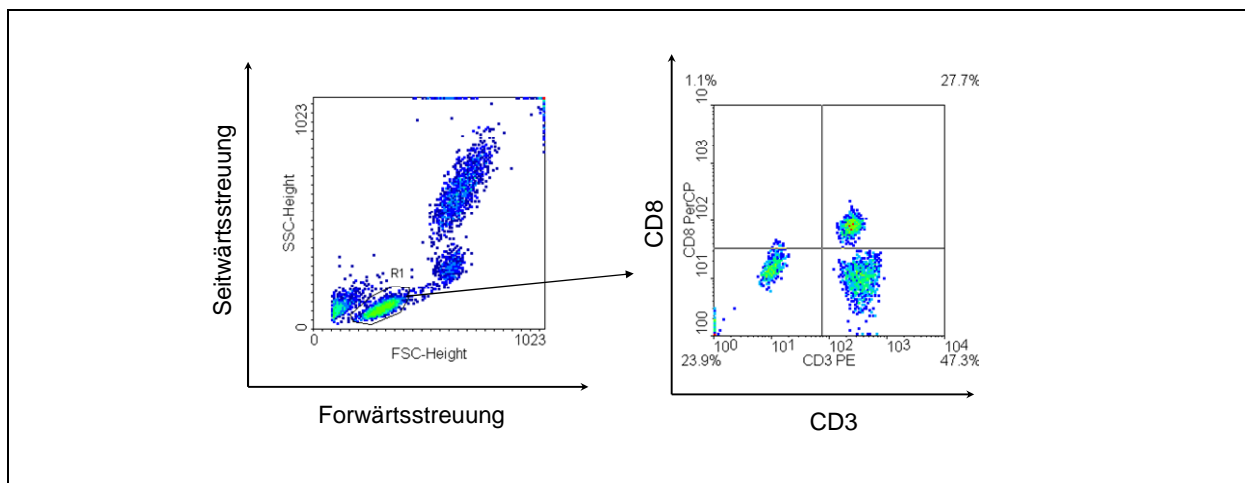
von vier Farbstoffen, die diese Eigenschaften verbinden, ist die von FITC, PE, PerCP und APC. Dennoch überschneiden sich die Emissionsspektren von Farbstoffen ähnlicher Wellenlängen in einer spektralen Überstrahlung. Um eine daraus resultierende Verfälschung der akquirierten Daten zu verhindern, müssen vor Beginn der Messung die spektralen Überstrahlungen durch die geeignete Einstellung von gegenseitigen Rückkopplungen im Messgerät subtrahiert werden - dies bezeichnet man als Kompensation. Dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit Einfachfärbungen angefertigt, deren Fluoreszenz dann so eingestellt werden musste, dass sie im anderen Fluoreszenzkanal unterhalb der durch die Autofluoreszenz der ungefärbten Isotypenkontrolle definierten Positivitätsgrenze liegt.<sup>129</sup>

#### *2.2.4.2 Auswertung der im FACScalibur akquirierten Daten mittels WinMDI*

Die Auswertung der mittels des FACScalibur akquirierten Daten erfolgte mit der Software WinMDI. Diese Software ermöglicht die Darstellung der Ergebnisse in Diagrammen und die Erhebung der durch die Messung identifizierten Zellpopulationen zur statistischen Auswertung. Die mit dem FACScalibur erhobenen Daten sind zunächst eine Ansammlung von mehreren Tausend Einzelereignissen, denen jeweils Werte der messbaren Parameter zugeordnet sind. Die Identifikation der einzelnen Populationen erfolgt dann mittels einer graphischen Darstellung der Messwerte in Diagrammen mit einer logarithmischen Skalierung. Das Programm beinhaltet vier Möglichkeiten der graphischen Darstellung: Konturdiagramm, Histogramm, Dichtediagramm und Punktwolkendiagramm. Im Rahmen dieser Arbeit wurden überwiegend Dichtediagramme verwendet.

Zunächst kann in einem Diagramm mit dem FSC-Wert auf der Ordinate und dem SSC-Wert auf der Abszisse die gewünschte Population anhand morphologischer Kriterien eingegrenzt werden. Das Programm verfügt über eine Gatter-Funktion, mit der man bestimmte Zellgruppen innerhalb eines Diagramms definieren kann (z.B. R1 in Abb. 2-3). Nun ist es möglich in einem weiteren Diagramm zwei andere Parameter der im ersten Diagramm anhand morphologischer Kriterien ausgewählten Ereignisse anzuzeigen. Anhand der durch die Darstellung der Autofluoreszenz der ungefärbten Kontrolle ermittelten Positivitätsgrenzen kann man nun die für einen bestimmten Farbstoff positiven Zellen identifizieren, indem man das Diagramm in vier Bereiche einteilt: links unten für Negativität in beiden Parametern, links oben für Positivität im Parameter der vertikalen Achse, rechts unten für Positivität im

Parameter der horizontalen Achse und den rechten oberen Quadranten für zweifach positive Ereignisse. Dies ermöglicht zum Beispiel die Identifikation von zytotoxischen T-Zellen anhand ihrer morphologischen Kriterien und ihrer Positivität für CD3 und CD8 (vgl. Abb. 2-3). In einer statistischen Auswertung besteht die Möglichkeit einer genauen Beschreibung der einzelnen Quadranten mittels Angabe des prozentualen Anteils der eingeschlossenen Ereignisse an der ganzen Probe und an der ausgewählten Population, sowie Angabe ihrer mittleren Fluoreszenz. Auch eine Kombination von mehreren Gates ist möglich, z.B. zur Darstellung der CD25 und CD69 Expression von Zellen, die sowohl im Lymphozytengatter liegen, als auch eine Positivität für CD3 und CD4 aufweisen.



**Abb. 2-3: Identifikation CD3- und CD8-positiver, zytotoxischer T-Zellen aus einer peripheren Blutprobe mittels Darstellung in Dichtediagrammen.**

#### *2.2.4.3 Antikörperfärbung zur Messung mittels FACScalibur*

Die für die durchflußzytometrische Analyse abgenommenen Zellen werden zunächst für 10min bei 1300U/min abzentrifugiert, dann mit FACS-Waschpuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Währenddessen werden die konjugierten Antikörper gemäß der Pipettiervorlage in Falcon-Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Die abzentrifugierten Zellen werden mit 50µl PBS pro zu messendem Röhrchen resuspendiert. Dann werden 50µl der Zellsuspension in jedes der Röhrchen mit den Antikörpern gegeben. Nachdem die Röhrchen auf dem Vortex gut gemischt wurden, wird für 30min bei 4°C inkubiert. Nach Inkubation muss zur Entfernung der nicht gebundenen Antikörper zweimal mit PBS gespült und abzentrifugiert werden. Abschließend fixiert man die Färbungen durch Zugabe von 200µl PFA. Die Proben müssen bis zur Messung bei 4°C gelagert werden.

## 2.2.5 Polymerasekettenreaktionen

### *2.2.5.1 Isolation von mRNA aus Einzelsuspensionen des Tumor- und Normalgewebes mittels einer Quiagen- Säule.*

Die Isolation von RNA aus den nach 2.2.2.1 und 2.2.2.2 zu Einzelsuspensionen aufgearbeiteten Tumor- und Normalgewebeproben erfolgt mittels einer Quiagen Säule. Zunächst werden  $3 \times 10^6$  der in PBS suspendierten Zellen in ein 1,5ml Eppendorf-Zentrifugenröhrchen gegeben und für zwei Minuten bei 13000 U/min abzentrifugiert. Der so entstandene Pellet wird mit 350µl RLT- Puffer, dem unmittelbar zuvor 3,5µl Mercaptoethanol hinzugegeben wurden, resuspendiert. Dann wird die DNA mittels einer 23er Kanüle geschert. Die so präparierte Probe kann bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C aufbewahrt werden.

Zur Weiterverarbeitung werden 350µl Ethanol auf die gefrorene Probe gegeben und vorsichtig mit einer Pipette vermischt. Die 700µl Probe wird daraufhin auf eine Quiagen- Säule gegeben. Nach Zentrifugation für 15s bei 13000 U/min wird der Durchfluss verworfen und die Säule in ein neues 2ml-Röhrchen gegeben, um Verunreinigungen zu vermeiden. Nach Zugabe von 350µl RW1- Puffer wird erneut abzentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nun erfolgt der DNA-Verdau durch Auftragen von 80µl DNase- Lösung auf die Säulenmembran. Nach fünfzehn Minuten Inkubation bei Raumtemperatur werden 350µl RW1-Puffer hinzugegeben und erneut zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die Säule in ein neues 2ml Röhrchen gegeben. Nach zweimaliger Wiederholung des Waschvorganges mit 500µl RPE-Puffer wurde einmalig für 1min bei 13000 U/min trocken zentrifugiert. Nun kann die RNA durch Zugabe von 50µl RNase- freien Wassers eluiert und daraufhin durch Zentrifugation (1min, 13000 U/min) gewonnen werden.

### *2.2.5.2 Reverse-Transkription*

Um aus der anhand des im vorherigen Abschnitt beschriebenen Verfahrens gewonnenen RNA die für Proteine kodierende Messenger-RNA (mRNA) zur weiteren Analyse zu gewinnen, bedient man sich der Reversen Transkriptase, einer DNA-Polymerase, die RNA in DNA übersetzt. Durch Einsatz von Oligo-(dt)-Primern gelingt eine spezifische Amplifikation von mRNA, da sich das Thymin des Primers an die Poly-A-Region am 3'-Ende der mRNA anlagert. Andere Formen von RNA haben keine Poly-A-Region und werden nicht in



komplementäre DNA (cDNA) übersetzt. cDNA, das Produkt der Reversen-Transkriptase ist zudem stabiler als RNA.

Die Durchführung der reversen Transkription erfolgte nach folgendem Protokoll: Als erstes werden zu 5µl Gesamt-RNA in einem 0,2ml Mikrozentrifugenröhrchen 1µl Oligo-(dt)-Primer gegeben und mit RNase freiem Wasser auf 12µl aufgefüllt (die Mengen von Wasser und Gesamt RNA können bei Bedarf variiert werden, man sollte aber immer auf 12µl Gesamtvolumen kommen). Danach für zehn Minuten bei 65°C denaturiert. Nach der Denaturierung wird die Probe auf Eis heruntergekühlt und dann nach Zugabe von 4µl „First Strand“ Puffer, 2µl 0,1M DTT, 10mM dNTP und 1µl RNase-Inhibitor für 2 Minuten bei 42°C gemischt. Anschließend wird 1µl Superscript-II-RT hinzugegeben und für 50 Minuten bei 42°C die Reverse Transkription durchgeführt. Zuletzt wird die Reaktion durch fünfzehnminütige Erhitzung auf 70°C terminiert. Die auf diese Weise gewonnen 20µl cDNA können entweder direkt weiterverwendet oder auch bei -20°C eingelagert werden.

#### *2.2.5.3 Quantitative PCR*

Das Ausmaß der Expression eines Proteins lässt sich indirekt durch quantitative Bestimmung der mRNA, aus der es translatiert wird, bestimmen. Kennt man den Primer des gesuchten Proteins, kann man mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen seine Expression relativ zu der eines konstanten Vergleichsproteins, des „Housekeepers“, messen. Quantitative PCR-Analysen wurden unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffkits „QuantiTect SYBR-Green“ in einem Light-Cycler durchgeführt. SYBR Green hat die Eigenschaft doppelsträngige DNA zu binden und dabei ein Fluoreszenzsignal auszusenden. Durch Vergleich der benötigten Zyklen bis zum Erreichen einer bestimmten Fluoreszenzintensität kann man die Konzentration der durch den Primer amplifizierten Sequenz mit der des „Housekeepers“ vergleichen.

Ausgangsprodukt der quantitativen PCR ist die durch Reverse Transkription (vgl. 2.2.5.2) gewonnene cDNA. Im ersten Schritt wird gemäß den Herstellerangaben ein Master Mix angesetzt, gemischt und auf die benötigte Anzahl von Kapillaren verteilt. Nach Zugabe des Primers und 1µl der zu untersuchenden Probe wurde die PCR gestartet (15min 95°C, 35mal (15sec 94°C, 20sec 50-60°C, 10-30sec 72°C)). In jedem Versuchsdurchlauf wurde eine Negativkontrolle mit RNase-freiem Wasser durchgeführt.

#### 2.2.5.4 Spektrumtypisierung des T-Zell-Repertoires

Die Antigenspezifität von T-Zellen wird durch ein als T-Zell-Rezeptor(TCR) bezeichnetes Membranprotein bestimmt. Der überwiegende Teil der T-Zellen exprimiert den T-Zell-Rezeptor als Heterodimer aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette (TCR $\alpha\beta$ ), die jeweils eine variable und eine konstante Domäne aufweisen, ähnlich der von Antikörpern bekannten Struktur. Die Antigenerkennung erfolgt durch bestimmte Abschnitte der variablen Region, die als CDR-Regionen (complementarity determining regions) bezeichnet werden. Durch somatische Rekombination bildet sich für jede T-Zelle ein spezifischer T-Zellrezeptor. Dabei entsteht durch Einschub von Nukleotiden und Verschieben der Verknüpfungsstelle der Genabschnitte eine CDR3-Region (complementarity determining region 3) mit einer für die jeweilige T-Zelle spezifischen Länge. Die Länge dieses Genabschnittes lässt sich durch Polymerasekettenreaktion nachweisen, indem man mit Primern der 24 V $\beta$ -Familien und der konstanten Region amplifiziert. Da die Rekombination stochastisch erfolgt, entspricht die Längenverteilung der T-Zell-Rezeptoren im Normalfall einer Gauß-Verteilung. Zeigt sich im PCR-Produkt keine Gauß-Verteilung, sondern ein deutliches Vorherrschen einer oder mehrerer bestimmter Längen, ist dies ein Hinweis auf eine Klonalität innerhalb der untersuchten T-Zell-Population.<sup>65</sup>

Die Gensequenz des T-Zell-Rezeptors liegt als mRNA vor und muss im ersten Schritt durch Reverse Transkription in cDNA überführt werden (vgl.2.2.5.2). Mit dem Produkt dieser ersten Amplifikation erfolgt eine zweite Polymerasekettenreaktion mit einem Primer der konstanten Region, BC1, und jeweils einem V $\beta$ -Primer nach folgendem Protokoll:

##### 1) Erstellung des Master Mix I:

25,8µl	USB-Wasser
5 µl	Taq-Puffer
3 µl	MgCl <sub>2</sub> , 25mM
5 µl	d-NTP, 2mM
5 µl	Primer BC1, 5µM
0,2 µl	AmpliTaq
1 µl	Produkt aus reverser Transkription

- 2) Jeweils 45µl Master Mix I in 24 100µl-Eppendorfgefäße pipettieren.
- 3) In jedes der 24 Eppendorfgefäße 5µl eines Vβ-Primers geben.
- 4) Polymerasekettenreaktion nach folgendem Programm: 5 Min 94°C, 30 Zyklen (30 Sek. 94°C, 30 Sek. 60°C, 60 Sek. 72°C)

Die so gewonnenen 24 Vβ-spezifischen PCR-Produkte werden in einer weiteren Polymerasekettenreaktion fluoreszenzmarkiert:

- 1) Erstellung des Master Mix II:

4,9µl	USB-Wasser
1µl	Taq-Puffer
0,6µl	MgCl <sub>2</sub>
1µl	d-NTP
0,4µl	Primer BC2 (5'-fluoreszenzmarkiert)
0,1µl	Taq-Enzym

- 2) Jeweils 8µl Master Mix II in 100µl- Eppendorfgefäße pipettieren.
- 3) Jeweils 2µl des Produktes der vorherigen Polymerasekettenreaktion.
- 4) Polymerasekettenreaktion nach folgendem Programm: 5 Min 94°C, 3 Zyklen (30 Sek. 94°C, 30 Sek. 60°C, 60 Sek. 72°C)
- 5) Jeweils 2µl des fluoreszenzmarkierten PCR-Produktes mit 11µl Formamid und 0,5µl Interner-Standard versetzen und im Sequenzer messen.

Zur Auswertung der Daten wurde die Software GeneScan (AppliedBiosystems, Darmstadt) verwendet. Durch graphische Darstellung der Fluoreszenzintensität auf der Abszisse und der Anzahl der Nukleotide auf der Ordinate erhält man das Längenspektrum einer Vβ-Familie, das bei Polyklonalität der untersuchten Lymphozytenpopulation einer Gauß-Verteilung entspricht, während eine Mono- oder Oligoklonalität zu einem Überschuss einer bestimmten DNA-Länge führt.

### 2.2.6 Immunhistochemie

Die Anfertigung immunhistochemischer Färbungen erfolgte nach folgendem Protokoll (falls nicht anders angegeben bei Raumtemperatur):

- 1) Paraffin für 30 Minuten bei 72°C abschmelzen.
- 2) Für fünf Minuten mit Xylol versetzen.
- 3) Xylol austauschen und erneut 5 Minuten inkubieren.
- 4) In absteigender Ethanolreihe waschen.
- 5) Spülen mit destilliertem Wasser.
- 6) Zur Demaskierung der Antigene für 30 Minuten bei 95°C mit Tris-EDTA-Puffer inkubieren.
- 7) Spülen mit destilliertem Wasser.
- 8) 5 Minuten mit Peroxidase inkubieren.
- 9) 5 Minuten mit Waschpuffer (1:10) inkubieren.
- 10) 30 Minuten mit verdünntem Antikörper inkubieren.
- 11) 30 Minuten mit „Labeled Polymer“ inkubieren.
- 12) 5 Minuten in Waschpuffer (1:10) legen.
- 13) 10 Minuten DAB + Substrat-Chromogen-Lösung (1:50)
- 14) 1 Minute mit Hämatoxin versetzen.
- 15) Mit Leitungswasser spülen und anschließend mit Deckgläschen abdecken.

### 2.2.7 Statistische Auswertungen

Zu Berechnung von Mittelwerten, Standardabweichungen und Varianzen, sowie zur Erstellung von F- und T-Testen wurde die Software Microsoft Excel verwendet. Der T-Test wurde als zweiseitiger Test angewendet. Beim Vergleich von Mittelwerten wurden Ergebnisse des T-Testes von  $p < 0,05$  als signifikant gewertet. Um die für die Durchführung eines T-Testes vorausgesetzte Normalverteilung zu belegen, wurde ein Kolmogoroff-Smirnov-Anpassungstest durchgeführt.<sup>130</sup>

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Patientencharakteristik**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Tumor- und Normalgewebe von insgesamt 29 Patienten verarbeitet, die sich in der Zeit vom 29.03.2005 bis zum 29.08.2005 einer totalen Nephrektomie unterzogen. Ein positives Ethikvotum Nr.99/168 der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg vom 14.12.1999 lag vor Beginn der Untersuchungen vor. Alle Patienten wurden ausführlich über die geplante Untersuchung aufgeklärt und gaben im Anschluss ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme. Vier der Patienten wurden in der Urologischen Klinik des Krankenhauses München-Harlaching und 25 Patienten in der Urologischen Klinik des Krankenhauses St. Josef Regensburg operiert. Für die 29 Patienten ergibt sich für den Zeitpunkt der Operation ein Durchschnittsalter von 70,6 Jahren (41-88). Die pathologische Aufarbeitung wurde für in Regensburg operierte Patienten vom Institut für Pathologie der Universität Regensburg und für in München behandelte Patienten vom Institut für Pathologie des Städtischen Klinikums München durchgeführt. Die pathologische Untersuchung ergab für 26 der 29 Patienten die Diagnose eines Nierenzellkarzinoms, ein Patient litt an einem Angiosarkom, einer an einem Nierenbeckenkarzinom und bei einem ergab die Untersuchung keinen Tumornachweis. Die histologische Beurteilung der Nierenzellkarzinome ergab in 19 Fällen einen klarzelligen, in sechs einen papillären und in einem Fall einen chromophil-papillären Typ. Für die 26 Patienten, bei denen ein Nierenzellkarzinom diagnostiziert wurde, erfolgte die Stadieneinteilung nach der WHO-Klassifikation (vgl.1.1.1) anhand der klinischen, radiologischen und pathologischen Befunde. Nach der WHO-Einteilung ergab sich in elf Fällen ein Stadium I, in vier ein Stadium II, in sieben ein Stadium III und in vier ein Stadium IV. Nach der TNM-Klassifikation ergab sich bei fünf Patienten ein Stadium T1a, bei sechs ein Stadium T1b, bei vier ein Stadium T2, bei sechs ein Stadium T3a, bei vier ein Stadium T3b und einmal ein Stadium T4.

<b><u>Pat. No.</u></b>	<b><u>Alter</u></b>	<b><u>Geschlecht</u></b>	<b><u>Histologie</u></b>	<b><u>TNM-Klassifikation</u></b>	<b><u>WHO-Stadium</u></b>
RH#518	77	w	klarzelliges RCC	pT1b, G2, L0, V1, R0	I
RK#519	41	m	klarzelliges RCC	pT2, G2, L0, V0, R0	II
RB#520	57	m	papilläres RCC	pT3, G2, L1, V1, pN1(2/2), R0	IV
RS#523	58	m	klarzelliges RCC	pT2, pN0(0/6), G2, L0, V0, R0	II
RT#525	72	m	papilläres RCC	pT1a, G2, N0, V0, R0	I
RP#526	64	w	papilläres RCC	pT1a,G1,R0,L0,V0	I
RR#528	72	w	klarzelliges RCC	pT1a, G1, L0, V0, R0	I
RM#529	69	m	klarzelliges RCC	pT1a, G1, L0, V1, R0	I
RS#530	85	w	klarzelliges RCC	pT3b, G2, L0, V2, R0	III
RF#532	69	w	papilläres RCC	pT3a, G2, L1, V1, R0	III
RE#542	74	w	klarzelliges RCC	pT1a, G1-2, R0	I
RA#543	71	m	klarzelliges RCC	pT1b, G2, L0, V0, R0	I
RF#544	60	w	klarzelliges RCC	pT2, G2, R0	II
RS#545	67	m	klarzelliges RCC	pT1a, G1, L0, V0, R0	I
RL#546	78	w	klarzelliges RCC	pT3a, G2, L0, V0, R0	III
RS#547	75	m	papilläres RCC	pT3b, pN0, G3, V1, R1	III
RT#551	54	m	papilläres RCC	pT1b, N0, G1, L0, V0, R0	I
RS#552	78	w	kein Tumornachweis		-
RK#553	80	m	multinod. Angiosarkom		-
RP#554	77	m	klarzelliges RCC	pT3b, pN1,G2,V1, L1, R0	III
RL#555	73	m	gering diff. Nierenbeckencarcinom	pT4, G3, L1, V1, R1	IV
RH#556	81	w	papilläres RCC	pT3b, G3, L1, V1, R1	IV
RS#557	68	m	klarzelliges RCC	pT1b, G1, L0, V0, R0	I
RO#559	73	m	klarzelliges RCC	pT2, pN0, G2, R0, V0, L0	II
RR#561	60	m	klarzelliges RCC	pT3a, pN2, G2, L0, V0, R0	IV
RS#563	88	w	klarzelliges RCC	pT3a,G2,L0,V0,R0	III
RM#564	70	m	klarzelliges RCC	pT1b, G2, L0, V0, R0	I
RS#565	76	m	klarzelliges RCC	pT3a, G2, L0, V0, R0	III
RR#566	82	m	klarzelliges RCC	pT1b,G2,cM1,L1,V1,R0	IV

**Tab. 7: Alter, Histologie und Krankheitsstadium der untersuchten Patienten.**

### **3.2 Charakterisierung des Primärmaterials und dessen Aufarbeitung**

Tab. 8 gibt einen Überblick über Größe der aufgearbeiteten Tumor- und Normalgewebepbiopsien, sowie die erreichte Gesamtzellzahl nach deren Aufarbeitung zu Einzelzellsuspensionen. Das mittlere Volumen der Tumorgewebepproben betrug  $2,68\text{cm}^3$ , das der Normalgewebepproben  $1,5\text{cm}^3$ . Die für eine vergleichende Untersuchung von Tumor- und Normalgewebe in Frage kommenden Patienten sind in Tab. 8 grau unterlegt. Zur FACS-Analyse wurde eine Mindestzahl von sieben Millionen Zellen nach Aufarbeitung vorausgesetzt, die bei den Patienten RT#525, RP#526, RR#528, RM#529, RS#530, RF#532, RA#543, RS#545, RL#555 und RS#557 für eine, oder beide Biopsien nicht erreicht wurden. Die Gewebepproben von Patient RH#518 wurden zur Einstellung des FACScalibur verwendet und es wurde keine Normalgewebefärbung angefertigt, sowie auf eine Lyse der enthaltenen Erythrozyten verzichtet. Bei Patient R0#559 wurde die Normalgewebesuspension bei der Aufarbeitung verunreinigt und die Probe RS#552 wurde ausgeschlossen, da die Histologie keinen Tumornachweis ergab. Bei fünfzehn Patienten gelang eine protokollgemäße Färbung von Tumor- und Normalgewebe zur durchflußzytometrischen Analyse (vgl. Tab. 8), wobei der Mittelwert der zur Färbung verwendeten Zellen aus Einzellsuspension des Tumorgewebes  $1,27 \times 10^7$  betrug. Die meisten der im Folgenden beschriebenen Ergebnisse werden sich auf Daten dieser fünfzehn Patienten beziehen, um die Infiltrate von Tumor- und Normalgewebe vergleichend beschreiben zu können. Es handelt sich um elf klarzellige und vier papilläre Karzinome, drei im Stadium I, drei im Stadium II, fünf im Stadium III und vier im Stadium IV. Für zehn dieser fünfzehn Patienten wurden zudem Immunhistochemische Analysen von Tumorschnitten mit Antikörpern gegen CD1a, CD3, CD4, CD8, CD45RO und CD56 angefertigt (vgl. Tab. 8).

<u>Pat. No.</u>	<u>Probengröße des Tumorgewebes in cm</u>	<u>Gesamtzellzahl im Tumorgewebe (x 10<sup>6</sup>)</u>	<u>Probengröße des Normalgewebes in cm</u>	<u>Gesamtzahl im Normalgewebe (x 10<sup>6</sup>)</u>
RH#518	3x1x1	96	2x1x1	33
RK#519	2x0,7x0,5	37	2x1x0,5	100
RB#520	2x2x1	127	1,5x0,3x0,7	44
RS#523	1,7x2x0,5	30	2x1x0,8	24
RT#525	1x1x0,7	7,4	n.d.	6
RP#526	1,0x0,3x0,4	14,2	0,6x0,2x0,4	5,4
RR#528	1,2x0,8x0,7	5,4	1,5x0,5x0,6	15,2
RM#529	1,6x0,4x0,8	45	0,3x1,2x0,6	5
RS#530	0,5x0,3x0,5	9,4	0,8x0,5x0,3	11,6
RF#532	0,4x1,2x0,6	7	0,4x0,2x0,4	0
RE#542	0,8x0,6x1,3	11,2	2,5x1,0x1,0	32
RA#543	1,0x0,3x2,0	1	n.d.	25
RF#544	3,0x2,0x2,2	17,1	2,5x1,0x1,0	65,4
RS#545	0,5x0,8x0,4	5,6	1,5x1,0x0,8	38
RL#546	2,0x3,0x1,0	60	3,0x1,5x1,0	24
RS#547	1,8x1,8x1,5	21,2	2,5x1,5x1	7,8
RT#551	0,4x0,5x0,6	8,4	0,5x0,5x0,7	13,2
RS#552	1,8x1,5x1,5	15,6	1,8x1,5x1,5	64
RK#553	1,4x1,2x1,0	14	1,5x1,2x0,5	17
RP#554	2X1,5X1,5	28,8	1,8x1,5x1,3	39,2
RL#555	1,5x1,0x0,5	11,2	0,8x1,0x0,8	6
RH#556	3,5x2,0x2,0	113,6	2,0x1,0x0,7	16,8
RS#557	2,0x1,0x1,0	2,6	n.d.	32
RO#559	2,5x0,5x1,5	15	verunreinigt	verunreinigt
RR#561	1,5x1,8x0,8	24,4	1,4x1,0x0,8	12,4
RS#563	0,8x0,6x0,5	13,2	1,0x0,7x1,0	9,4
RM#564	1,8x1,0x0,8	19,2	2,0x1,0x0,8	20,8
RS#565	2,0x1,8x1,5	30	2,0x1,3x0,8	34
RR#566	2,0x1,5x0,8	48,2	1,5x1,0x0,5	15,6

**Tab. 8: Probengröße und Zellzahl der Tumor- und Normalgewebebiopsien. Proben mit erfolgreicher Färbung von Tumor- und Normalgewebe zur durchflußzytometrischen Analyse sind hellgrau unterlegt. Bei dunkelgrau unterlegten Patienten wurden zusätzlich Immunhistochemien angefertigt. (n.d. = nicht durchgeführt)**



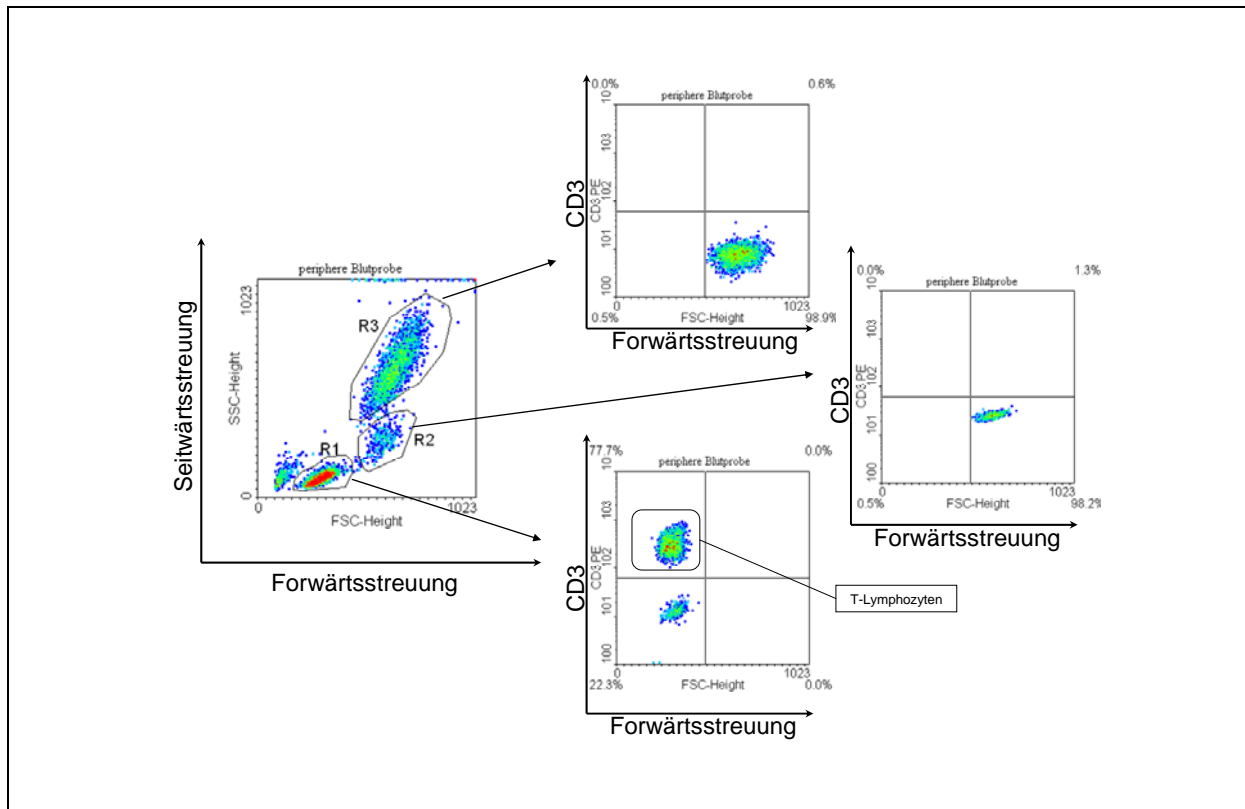
Bei allen Patienten erfolgte eine Isolation mononukleärer Zellen aus Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation (vgl.2.2.3.4), wobei der Mittelwert der Anzahl gewonnener mononukleärer Zellen  $1,87 \times 10^7$  pro Patient betrug. Nach Isolation erfolgte die Kryoasservierung zur späteren Verwendung.

Aus allen Einzelzellsuspensionen mit Ausnahme der Probe RF#532, bei der das gesamte Material zur durchflußzytometrischen Analyse gefärbt wurde, sowie der Proben RS#563, RM#564, RS#565 und RR#566, wurde ein Anteil zur Analyse mittels PCR lysiert. Bei den Patienten RF#532, RA#543, sowie RS#545 bis RR#566 wurde zusätzlich ein Gewebestück in RNA-Later Suspension eingefroren, da diese Methode der Konservierung größere RNA-Mengen lieferte.

Zur Kultivierung von Tumorzelllinien erfolgte die Aussaat von Zellen der Einzelzellsuspension in Kulturflaschen analog 2.2.3.3. Bei den Patienten RT#525, RR#528, RA#543, sowie RS#557 wurde aufgrund der geringen Zellzahl auf eine Tumorkultur verzichtet. Die Aussaat von mindestens zwei Tumorgewebestücken in I'IL-2 TF zur Kultivierung tumorinfiltrierender Lymphozyten erfolgte bei allen Patienten.

### 3.3 Vergleich der lymphozytären Infiltration in Tumor- und Normalgewebe

#### 3.3.1 Nachweis CD3 positiver Lymphozyten im Tumor- und Normalgewebe



**Abb. 3-1: T-Lymphozyten weisen eine niedrige Granularität auf. In der dargestellten CD3 Einzelfärbung einer peripheren Blutprobe befinden sich CD3 positive Lymphozyten nur im Bereich R1.**

Abb. 3-1 zeigt die zellulären Bestandteile einer peripheren Blutprobe, an der exemplarisch die Lokalisation von T-Lymphozyten in einem Diagramm mit Darstellung der Vorwärtsstreuung auf der Ordinate und der Seitwärtsstreuung auf der Abszisse gezeigt wird. Die Vorwärtsstreuung ist als Maß der Größe, die Seitwärtsstreuung als Maß der Granularität einer Zelle zu verstehen. Aufgrund der sehr heterogenen Zusammensetzung der aus Tumor- und Normalgewebeprobe gewonnenen Einzelzellsuspensionen mit vielen Zellen unterschiedlicher Größe, Struktur und unspezifischer Fluoreszenz, wurde die T-Zellfraktion anhand ihrer geringen Seitwärtsstreuung und ihrer CD3 Positivität in der PE-Färbung isoliert. Durch Kombination dieser zwei Parameter ließen sich gut abgrenzbare, CD3 positive Zellpopulationen definieren (vgl. Abb. 3-2).

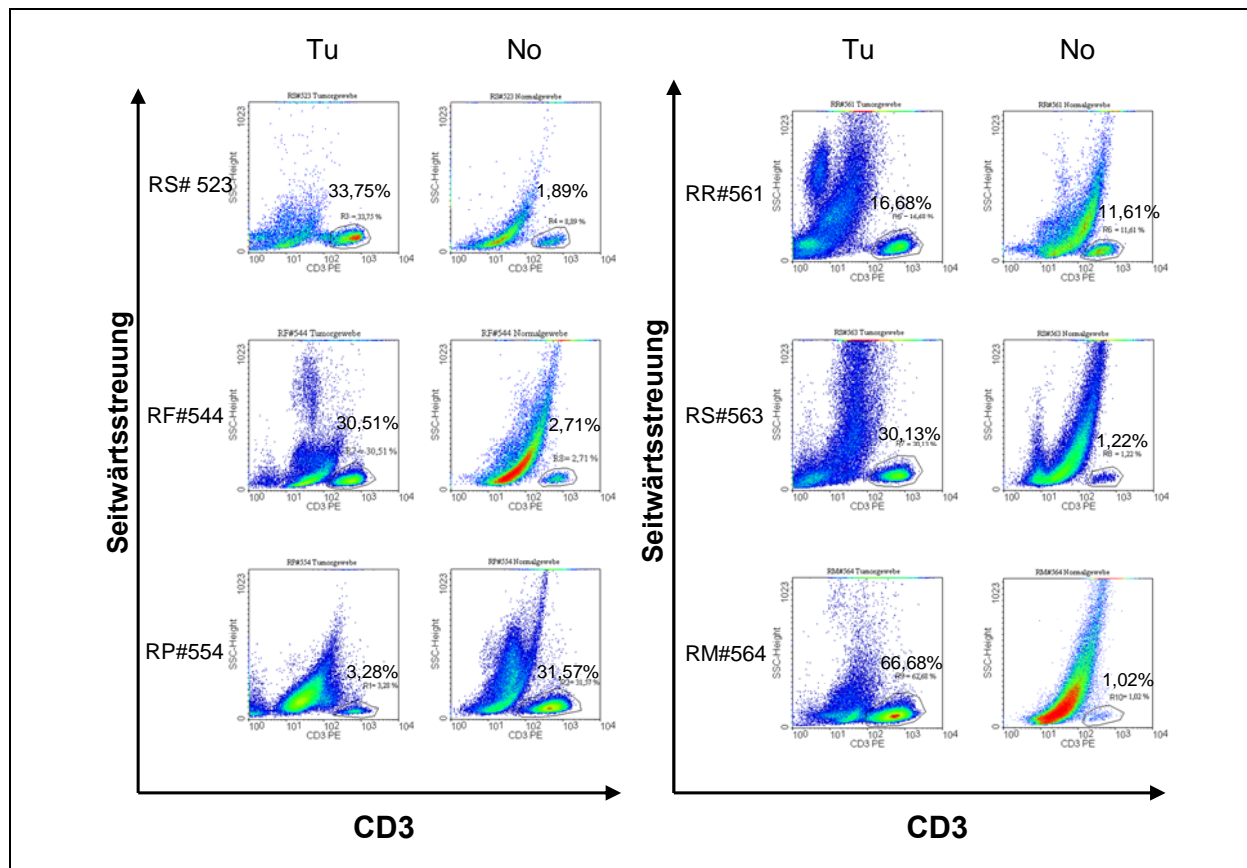


Abb. 3-2: Eingrenzung CD3 positiver Lymphozyten in Einzelzellsuspensionen aus sechs klarzelligen Nierenzellkarzinomen und den korrespondierenden Normalgeweben mittels CD3-PE-Färbung und Seitwärtsstreuung. Angegeben ist der Anteil an allen gemessenen Ereignissen in %.

Abb. 3-3 gibt eine graphische Übersicht über die Anteile CD3 positiver Lymphozyten an der Gesamtheit der gemessenen Ereignisse in Tumor- und Normalgewebesuspension. Bei sieben der fünfzehn Patienten zeigte sich im Tumorgewebe eine deutlich stärkere T-Zell-Infiltration, als im gesunden Gewebe. Bei zweien eine deutlich stärkere T-Zell-Infiltration des Normalgewebes und bei sechs Patienten eine nur wenig differierende T-Zell-Infiltration. Der Mittelwert des relativen Anteils CD3 positiver Zellen an der Gesamtzellzahl in Tumor- und Normalgewebe betrug  $15,3\%(\pm 17,2\%)$  vs.  $7,1(\pm 8,1\%)$ , der Vergleich erreichte jedoch im T-Test keine statistische Signifikanz ( $p=0,105$ ). Die Ergebnisse sprechen dennoch für eine im Tumor-relativ zum Normalgewebe stärkere T-Zell-Infiltration. Unterscheidet man papilläre von klarzelligen Nierenzellkarzinomen, ergibt sich ein mittlerer relativer Anteil CD3 positiver Zellen an der Gesamtzellzahl im Tumorgewebe von  $3,8\%(n=4)$  für das papilläre und  $19,8\%(n=11)$  für das klarzellige Nierenzellkarzinom. Neben der durchflußzytometrischen Analyse wurden immunhistochemische Färbungen CD3-positiver Zellen angefertigt, in denen sich ebenfalls T-Zellen nachweisen ließen. Die Schnitte wiesen sowohl am Tumorrand, als auch innerhalb der

Tumorgrenzen deutliche T-Zell-Infiltrate auf. Abb. 3-4 zeigt exemplarisch einen Tumorgewebeschnitt des Patienten RS#563 mit Infiltration von T-Zellen entlang des Tumorrandes im linken und oberen Teil der Abbildung. Auch innerhalb des Tumors zeigte sich eine erhebliche T-Zell-Infiltration.

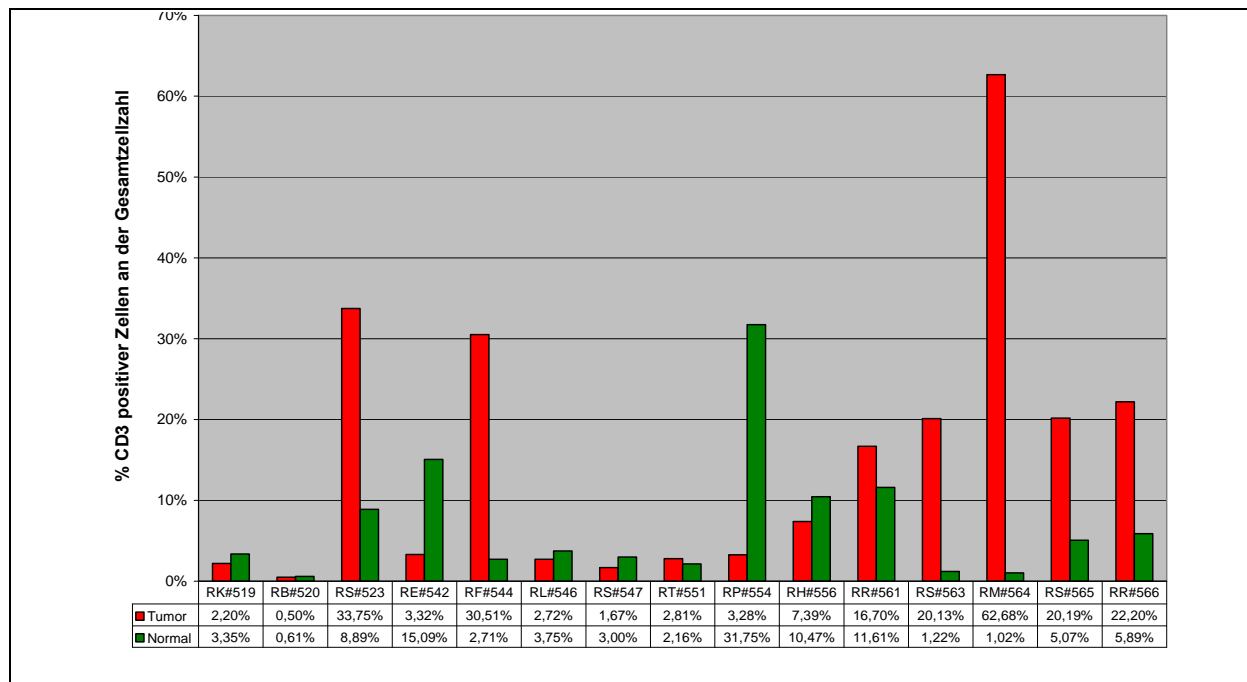


Abb. 3-3: Anteil CD3 positiver T-Lymphozyten im Tumor- (rote Balken) versus Normalgewebe (grüne Balken) bei 15 Nierenzellkarzinomen. Dargestellt ist der Anteil CD3<sup>+</sup>-T-Zellen an der Gesamtzellzahl in Prozent.

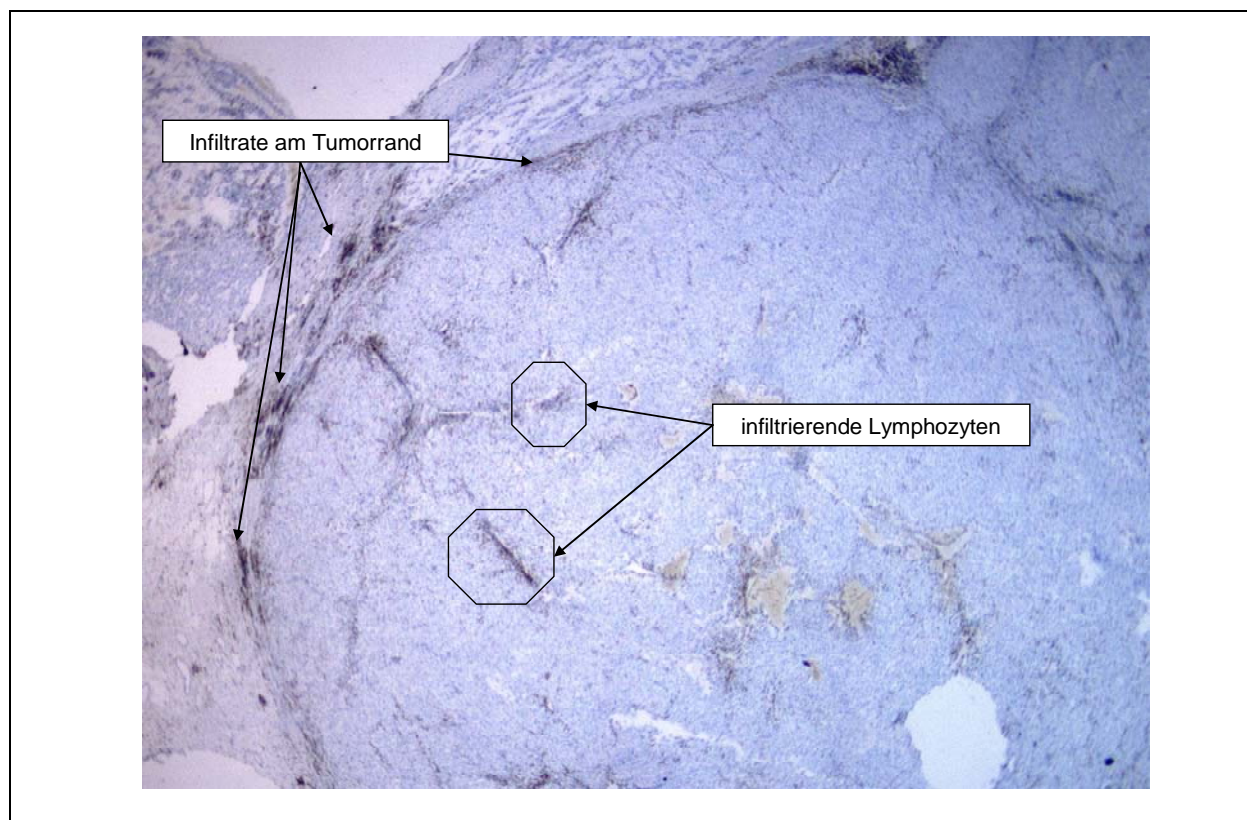
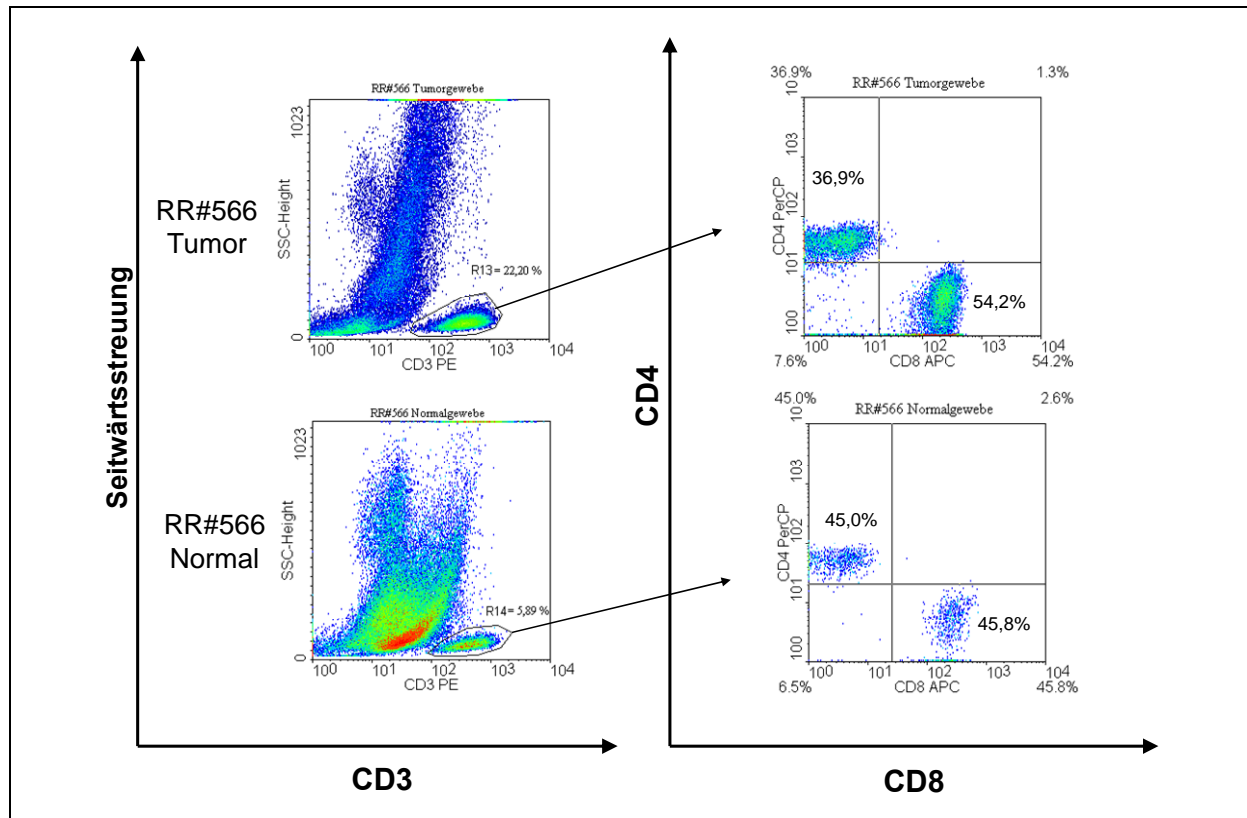


Abb. 3-4: Immunhistochemische CD3-Färbung eines Tumorschnittes des Patienten RS#563 in 16facher Vergrößerung mit deutlich zu erkennenden entzündlichen Infiltraten am Tumorrund im linken und oberen Teil der Abbildung, sowie Lymphozytenansammlungen innerhalb des Tumors.

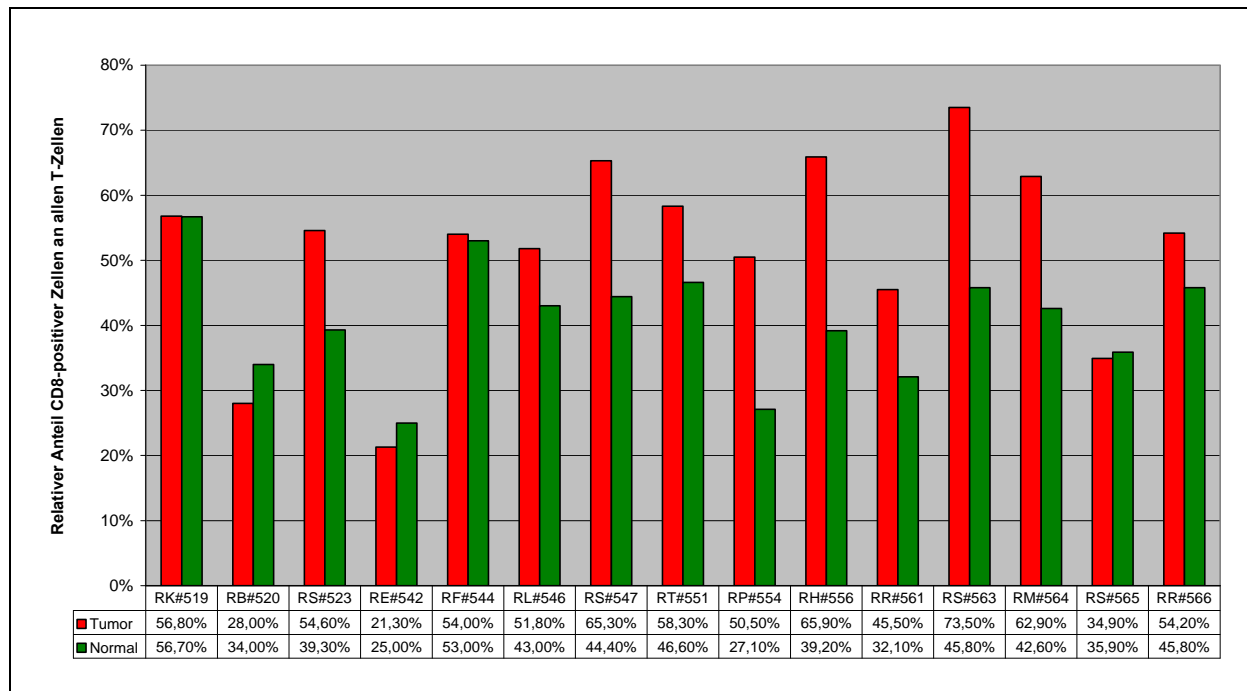
### 3.3.2 Vergleichende Phänotypische Charakterisierung der T-lymphozytären Infiltrate im Tumor- und Normalgewebe.



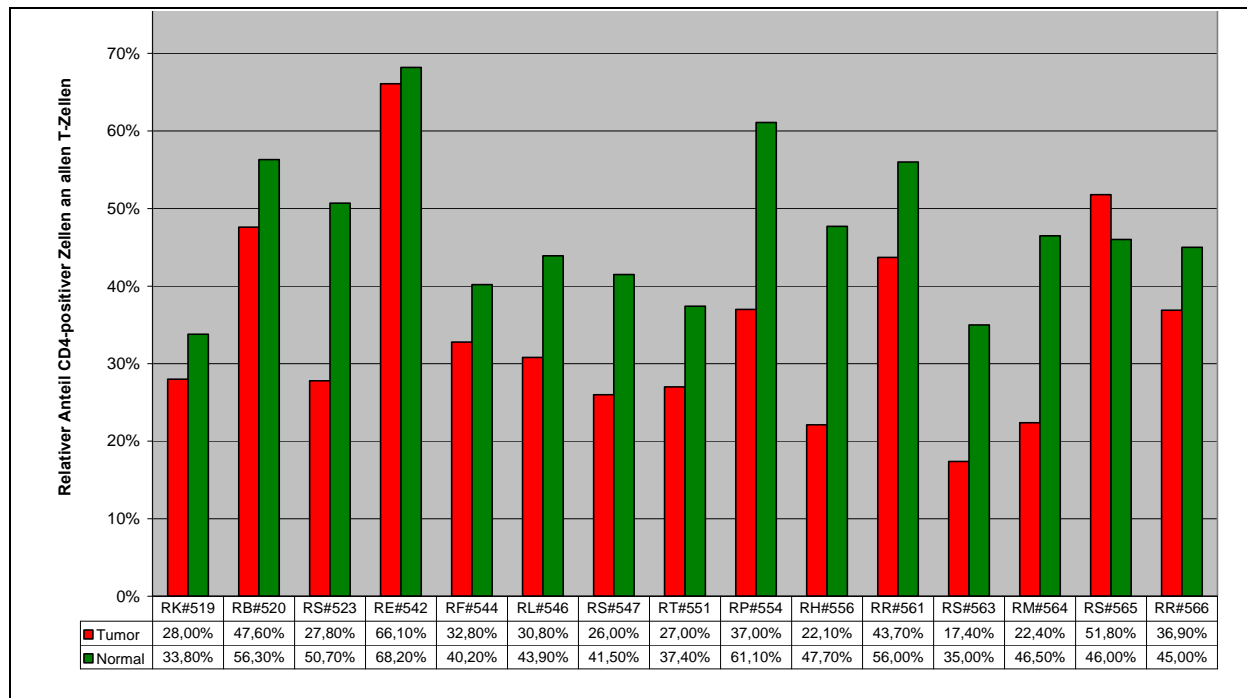
**Abb. 3-5:** Analyse des relativen Anteils CD4- und CD8-positiver T-Zellen an der CD3-positiven T-Zellfraktion in Tumor und Normalgewebe am Beispiel des Patienten RR#566.

Stellt man die, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, isolierten CD3 positiven T-Lymphozyten in einem weiteren Diagramm mit logarithmischer Darstellung der CD8-APC-Fluoreszenz auf der Abszisse und der CD4-PerCP-Fluoreszenz auf der Ordinate dar, lassen sich die prozentualen Anteile der CD4- und CD8-positiven T-Zellen an der CD3-positiven-Fraktion analysieren (vgl. Abb. 3-5). Die vergleichende Untersuchung der CD8-positiven T-Zellen im Tumor- versus Normalgewebe zeigte bei zehn von fünfzehn Patienten eine im Tumorgewebe um mindestens 5% stärkere Infiltration, bei drei eine etwa gleiche Infiltration und bei zwei Patienten eine um mindestens 5% schwächere Infiltration (vgl. Abb. 3-6). Der Mittelwert des relativen Anteils der CD8-positiven T-Zellen an der CD3-positiven Lymphozytenfraktion betrug im Tumorgewebe 51,8%(±14,35%) und im Normalgewebe 40,7%(±8,8%) ( $p=0,018$ ). Für CD4-positive T-Zellen zeigte sich in 13 von 15 Patienten eine um mehr als 5% stärkere Infiltration des Normalgewebes, in einem Fall eine um weniger als fünf Prozent differierende Infiltration und in einem eine um 5,8% höhere Infiltration des Tumorgewebes (vgl. Abb. 3-7). Der Mittelwert des relativen Anteils der CD4-positiven T-Lymphozyten an der CD3-positiven

Lymphozytenfraktion ist im Normalgewebe mit 47,3%(±9,8%) höher, als im Tumorgewebe, wo er 34,5%(±13%) beträgt (p=0,005).



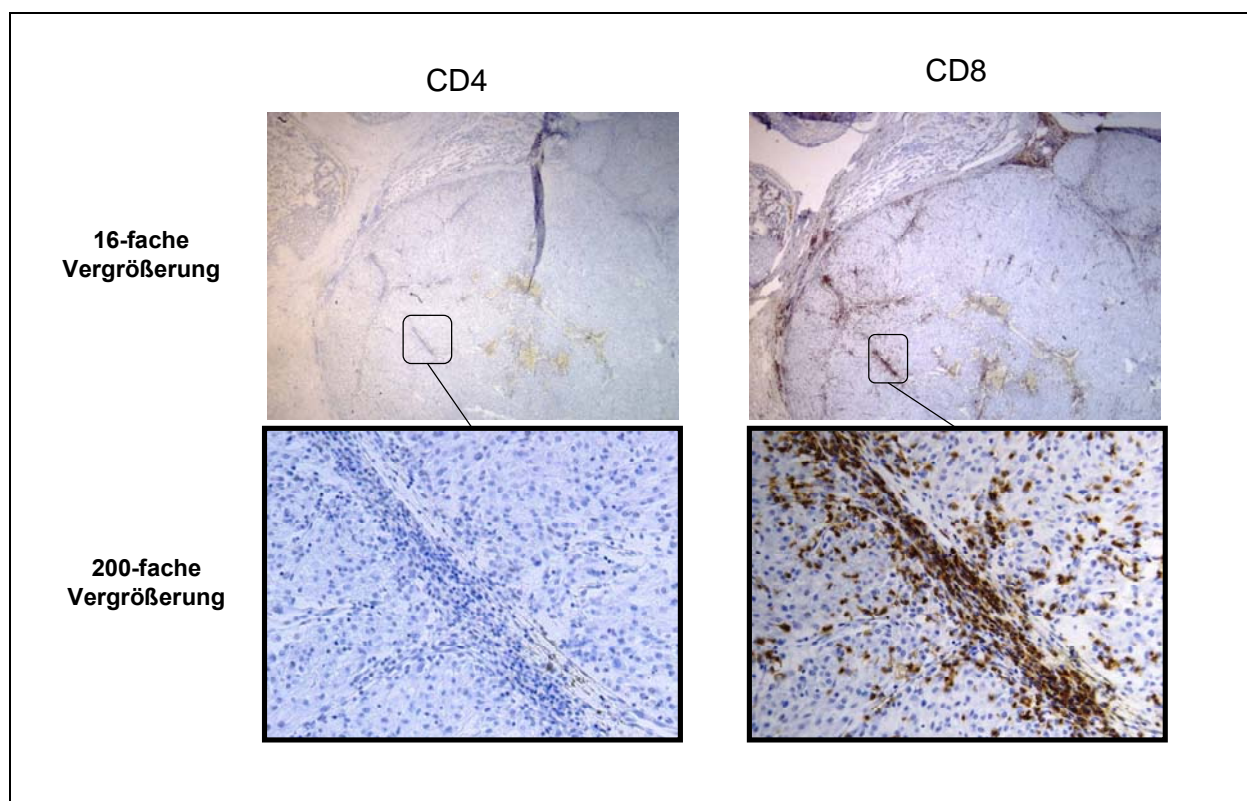
**Abb. 3-6: Vergleichende Analyse des prozentualen Anteils CD8-positiver T-Zellen im Tumor- (rote Balken) und Normalgewebe (grüne Balken). Dargestellt ist der Anteil CD8-positiver T-Zellen an der CD3-positiven T-Zellfraktion in Prozent.**



**Abb. 3-7: Vergleichende Analyse des prozentualen Anteils CD4-positiver T-Zellen im Tumor- (rote Balken) und Normalgewebe (grüne Balken). Dargestellt ist der Anteil CD8-positiver T-Zellen an der CD3-positiven T-Zellfraktion in Prozent.**



Die in Abb. 3-8 dargestellte immunhistochemische Färbung CD4 und CD8 positiver Zellen zeigt, korrelierend mit der durchflußzytometrischen Analyse (siehe Abb. 3-6 und Abb. 3-7), eine deutlich stärkere Infiltration des Tumors RS#563 durch CD8-positive T-Lymphozyten. Eine Quantifizierung der Lymphozyteninfiltrate in den durchgeführten immunhistochemischen Färbungen erwies sich als schwierig, da sich Bereiche starker Infiltration in nahezu allen Schnitten fanden und ein Auszählen dieser Bereiche nicht für den gesamten Schnitt repräsentativ ist, so dass die durchgeführten Immunhistochemien lediglich zur Visualisierung der Lokalisation tumorinfiltrierender Lymphozyten innerhalb des Tumors dienen. Eine Färbung des Normalgewebes zum Vergleich war nicht möglich, da aus dem gesunden Nierenanteil kein Gewebe asserviert wurde.

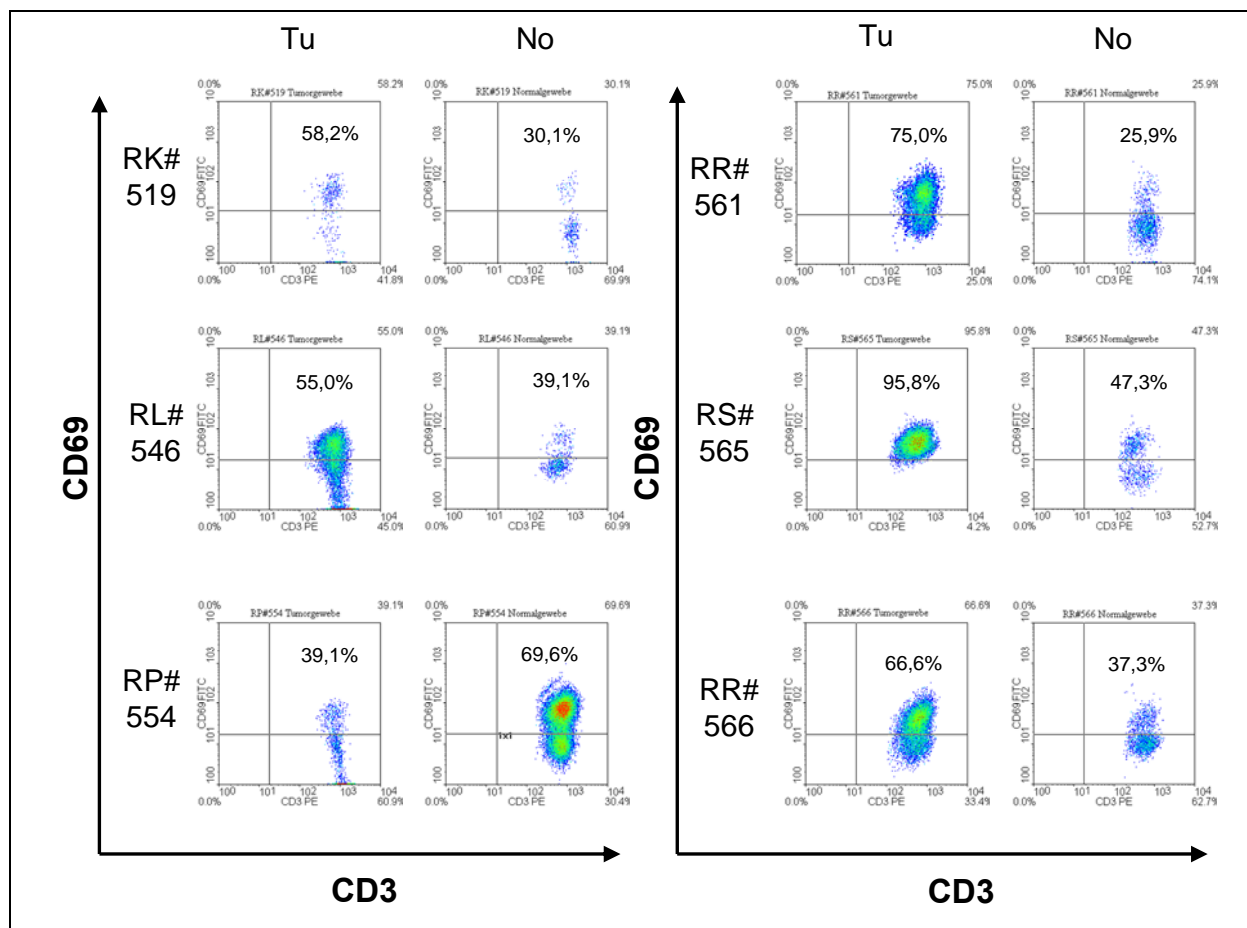


**Abb. 3-8: Immunhistochemische Färbungen CD4- und CD8-positiver Lymphozyten im Tumorgewebe des Patienten RS#563 in 16facher und 200facher Vergrößerung. Die Abbildungen zeigen, dass der Tumor vorwiegend durch CD8-positive T-Zellen infiltriert wird.**

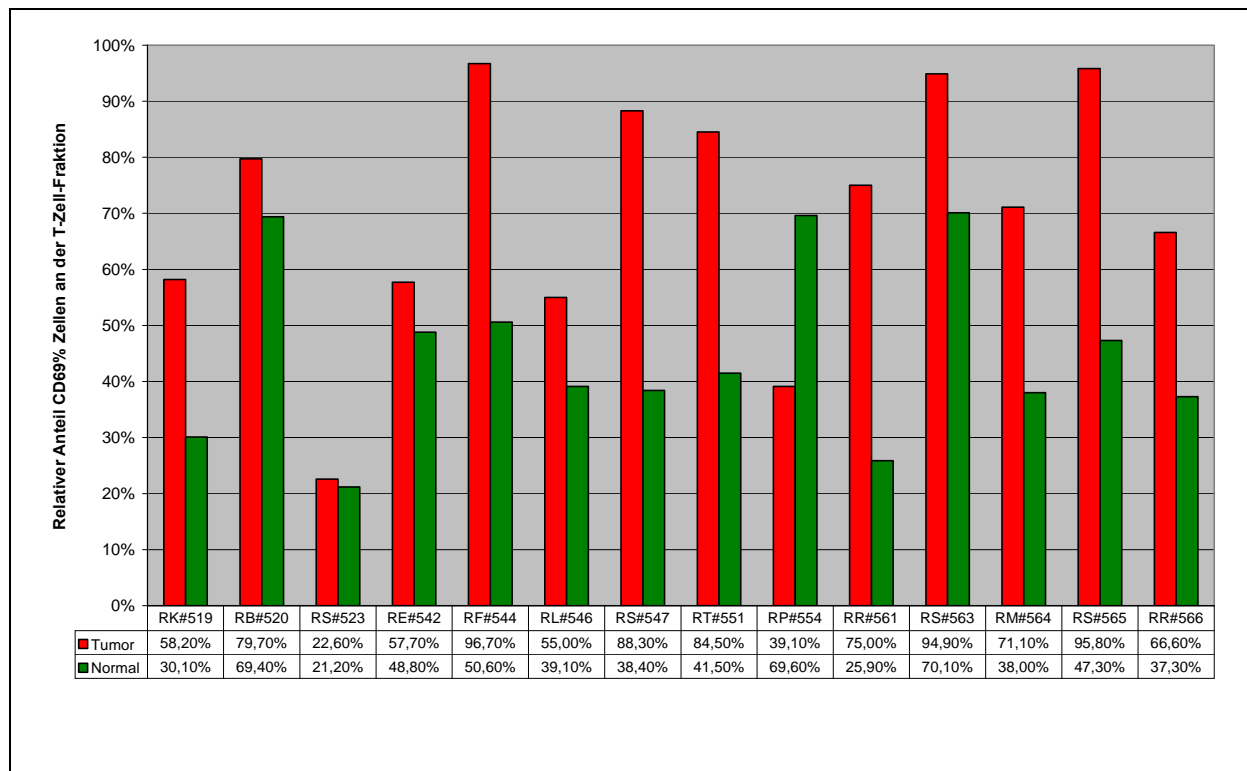
Um den Aktivierungszustand der den Tumor bzw. das Normalgewebe infiltrierenden T-Lymphozyten beurteilen zu können, wurden Färbungen der Oberflächenmarker CD25 und CD69 auf CD3-positiven T-Zellen durchgeführt. CD69 gilt als früher Aktivierungsmarker von T-Zellen, wobei seine genaue Struktur und Funktion unbekannt ist. Die  $\alpha$ -Kette des Interleukin-2-Rezeptors (CD25) ist ein weiterer Aktivierungsmarker, der jedoch erst im



späteren Verlauf der T-Zell-Aktivierung exprimiert wird. Die den Tumor infiltrierenden T-Zellen beinhalteten einen wesentlich höheren Anteil CD69 positiver aktivierter T-Zellen, als jene des Normalgewebes (vgl. Abb. 3-9). Nur in einem Fall (RP#554) waren die T-Lymphozyten im Normalgewebe stärker aktiviert, während sich in 12 von 14 Patienten eine deutlich stärkere CD69-Expression der T-Zellen im Tumorgewebe und in einem (RS#523) ein in etwa gleicher Anteil CD69-positiver T-Zellen im Tumor- und Normalgewebe zeigte (vgl. Abb. 3-10). Der Mittelwert des relativen Anteils CD69 positiver Lymphozyten an der T-Zell-Population des Tumorgewebes beträgt 70,4%(±22,1%) versus 44,8%(±15,8%) im Normalgewebe ( $p=0,002$ ). Die Färbungen mit CD25-APC zeigten allenfalls eine schwache Expression mit zumeist unter zehn Prozent CD25-positiven T-Zellen. Eine statistische Auswertung der Ergebnisse erwies sich aufgrund schwer abgrenzbarer Populationen als schwierig, so dass auf eine Darstellung verzichtet wird.



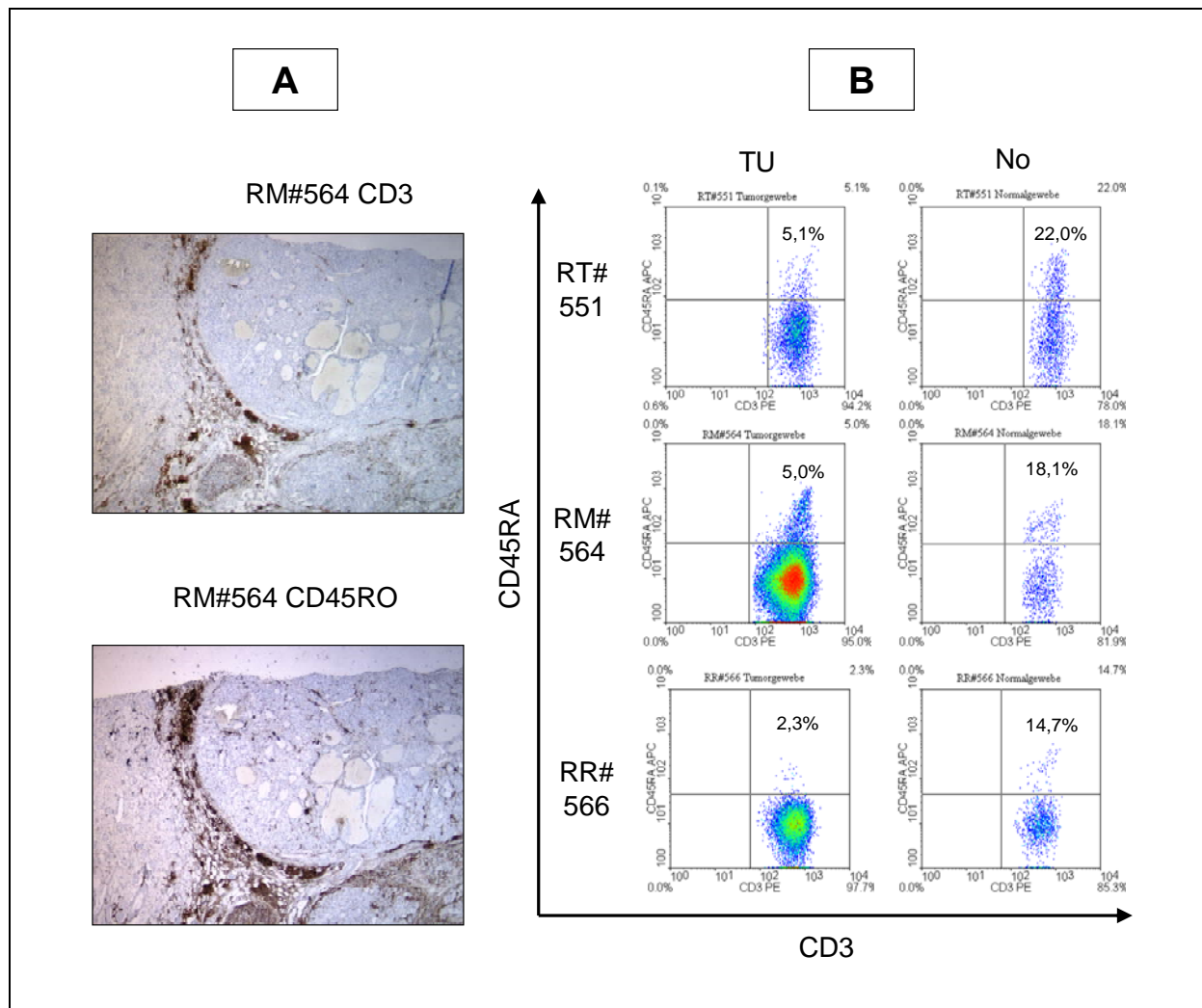
**Abb. 3-9:** Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf den Tumor bzw. das Normalgewebe infiltrierenden T-Zellen. Dargestellt ist das Dichtediagramm (density plot) der CD3-PE (Ordinate) und CD69-FITC (Abszisse) Färbung im Tumor- (linke plots) und Normalgewebe (rechte plots). Die im rechten oberen Quadranten dargestellte Prozentzahl stellt den Anteil CD3 und CD69-positiver T-Zellen dar.



**Abb. 3-10: Vergleichende Analyse des prozentualen Anteils CD69-positiver Lymphozyten an der CD3-positiven T-Zellfraktion in Tumor- (rote Balken) und Normalgewebe (grüne Balken).**

Um eine Unterscheidung der T-Zellen in naive bzw. antigenerfahrene Effektor/Memory T-Zellen zu ermöglichen, bietet sich die Analyse der CD45 Isoformen und der Expression von CCR7 an. CD45 ist eine membrangebundene Tyrosinphosphatase, von der es zwei Isoformen gibt, die durch alternatives Spleißen der mRNA entstehen. Naive T-Zellen exprimieren die Isoform CD45RA, aktivierte T-Zellen die Isoform CD45RO, die eine höhere Affinität zum T-Zell-Rezeptor aufweist und dessen Signalvermittlung verstärkt. CCR7 ist ein Oberflächensmolekül auf T-Zellen, das durch Interaktion mit dem sekundären lymphatischen Chemokin (SLC) die Adhäsion an Gefäßendothelzellen des lymphatischen Systems und an dendritische Zellen vermittelt. CCR7 wird nur von naiven T-Zellen exprimiert.<sup>65</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurden durchflußzytometrische Analysen von CD45RA und CCR7, sowie immunhistochemische Färbungen von CD45RO durchgeführt. In der Durchflußzytometrie zeigte sich, dass die Antikörperfärbung mit FITC-konjugiertem CD45RA keine ausreichende Färbung zur Abgrenzung klarer Populationen erreichte. CCR7 positive Zellen wurden nur vereinzelt mit einem Anteil von unter 1% an der CD3-positiven Population nachgewiesen. Bei zwölf Patienten wurde daher mit APC-konjugiertem CD45RA gefärbt, mit dem eine bessere Differenzierung von positiven und negativen Zellen gelang. Der Mittelwert des relativen Anteils CD45RA-positiver Zellen an der T-Zellpopulation betrug 15,9%(±16,2%) im Tumor-

und 22,3%(±14,0%) im Normalgewebe, wobei der Vergleich nicht signifikant ist ( $p=0,31$ ). In den durchgeführten immunhistochemischen Färbungen waren in allen Tumoren infiltrierende CD45RO positive Effektor/Memory T-Zellen nachweisbar (vgl. Abb. 3-11).

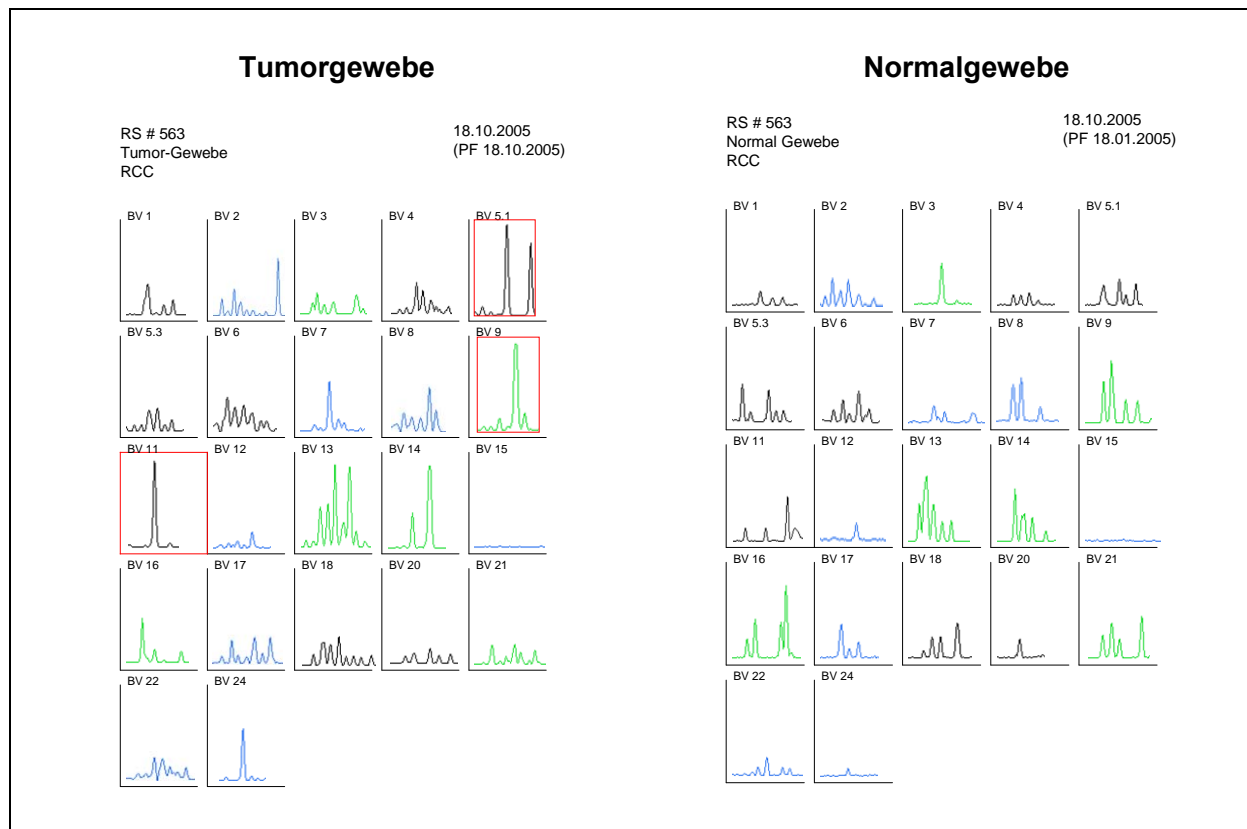


**Abb. 3-11: Infiltration von CD45RA<sup>low</sup>/CD45RO<sup>+</sup>-positiven Effektor/Memory T-Zellen im Tumorgewebe. (A) Immunhistochemische CD3- (obere Abbildung) und CD45RO- (untere Abbildung) Färbung im Tumorgewebe von Patient RM#564 bei 16-facher Vergrößerung. (B) CD45RA-Expression von den Tumor bzw. das Normalgewebe infiltrierenden T-Zellen. Dargestellt ist das Dichtediagramm (density plot) der CD3-PE- (Ordinate) und CD45RA-APC-Färbung (Abszisse) im Tumor- (linke plots) und Normalgewebe (rechte plots). Die im rechten oberen Quadranten dargestellte Prozentzahl stellt den Anteil CD3- und CD45RA-positiver T-Zellen dar.**

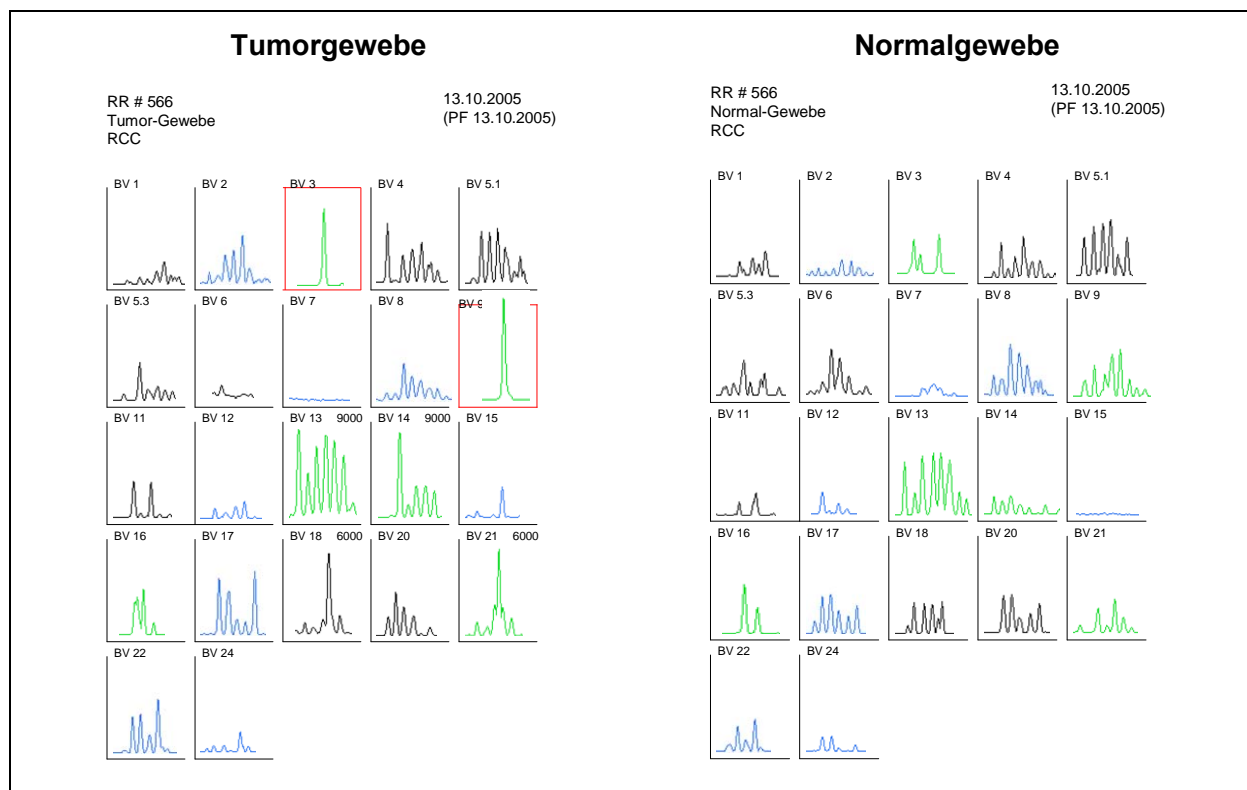
Die Messung des Anteils T-Zell-Rezeptor- $\alpha\beta$  (TCR- $\alpha\beta$ )-positiver T-Zellen an der CD3-positiven Fraktion zeigte nur geringe Unterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe. Der Mittelwert des relativen Anteils TCR- $\alpha\beta$ -positiver Zellen an der Lymphozytenfraktion beträgt 93%(±10,2%) im Tumorgewebe und 94%(±5,1%) im Normalgewebe. Eine Analyse der TCR-

$\gamma\delta$ -Kette wurde nicht durchgeführt. Anschließend haben wir uns der Frage gewidmet, ob es zu einer klonalen Expansion von T-Zellen gekommen ist. Hierfür wurden bei einem Teil der Patienten Spektrumtypisierungen von V $\beta$ -Genabschnitten der CDR3-Region des TCR- $\alpha\beta$  angefertigt. Da die somatische Rekombination der CDR3-Region stochastisch erfolgt, ist von einer Gaußschen Verteilung ihrer Länge bei verschiedenen, ein bestimmtes der 24 V $\beta$ -Segmente exprimierenden, T-Zell-Klonen auszugehen.<sup>65</sup> Die Spektrumtypisierung wurde für Tumor- und Normalgewebeproben von insgesamt zehn Patienten durchgeführt.

Insgesamt konnte in sieben Tumoren eine oligoklonale T-Zell-Expansion ohne Nachweis der korrespondierenden Klone im Normalgewebe gezeigt werden. Exemplarisch sind in Abb. 3-12 und Abb. 3-13 die Ergebnisse aus Tumor- und Normalgewebe der Patienten RS#566 und RS#563 dargestellt. Auch im Normalgewebe waren bei einigen Patienten Klone nachweisbar, die im Tumorgewebe der Patienten nicht gefunden wurden.

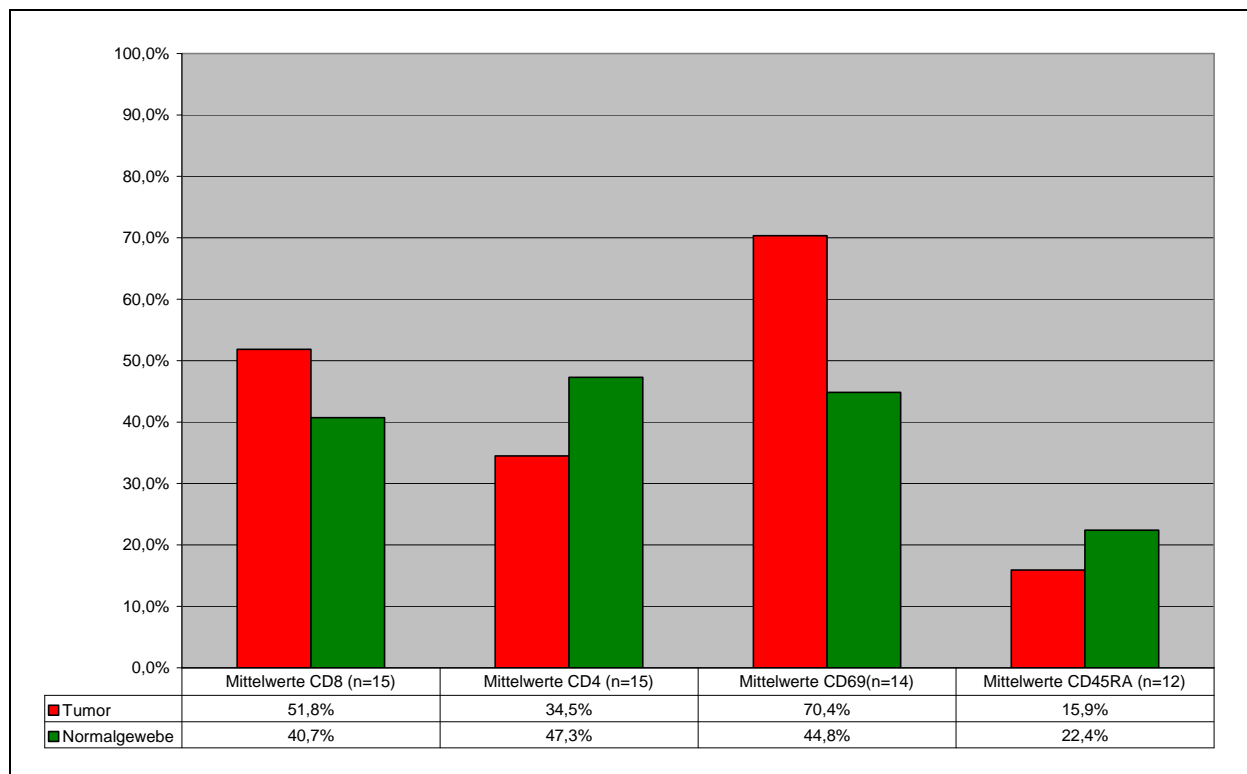


**Abb. 3-12: Vβ- Spektrumtypisierungen von Tumor – und Normalgewebe des Patienten RR#566. Die rot eingerahmten Klone in BV3, BV11 und BV9 des Tumorgewebes sind im Normalgewebe nicht nachweisbar.**



**Abb. 3-13: Spektrumtypisierung der Vβ- Regionen in Tumor- und Normalgewebe des Patienten RS#563. Die rot eingerahmten Klone in BV5.1, BV9 und BV11 sind im Normalgewebe nicht nachweisbar.**

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sich die lymphozytären Infiltrate in Tumor- und Normalgewebe deutlich unterscheiden. Im Tumor zeigte sich ein signifikant höherer Anteil CD8- und CD69-positiver und damit früh aktivierter zytotoxischer T-Zellen. Sowohl im Tumor-, als auch im Normalgewebe exprimierte nur ein geringer Teil der T-Zellen das CD25-Molekül. Die durchflußzytometrische Analyse des Differenzierungsgrades der infiltrierenden Lymphozyten zeigt sowohl im Tumor-, als auch im Normalgewebe überwiegend einen T-Effektor/Memory-Phänotyp mit niedriger Expression von CD45RA (vgl. Abb. 3-14). Diese Befunde konnten immunhistochemisch mit einer hohen Dichte CD45R0-positiver T-Zellen im Tumor bestätigt werden. Die TCR-Spektrumtypisierungen ergaben bei einigen Patienten eine Klonalität in unterschiedlichen V $\beta$ -Familien, die in den korrespondierenden Normalgewebeproben nicht nachweisbar waren.



**Abb. 3-14: Durchflußzytometrische Analyse der relativen Anteile CD4-, CD8-, CD69-, und CD45RA-positiver Lymphozyten an der T-Zell-Population im Tumor- (rote Balken) bzw. Normalgewebe (grüne Balken). Dargestellt sind die Mittelwerte von 12-15 ausgewerteten Patienten.**

### 3.3.3 Nachweis regulatorischer T-Lymphozyten in Tumor- und Normalgewebe beim primären Nierenzellkarzinom.

Einer der Mechanismen der Immunevasion von Neoplasien ist ihre Infiltration durch regulatorische T-Lymphozyten. Fischer et al beschrieben eine Population humaner  $\text{TCR}\alpha\beta^+$ - $\text{CD3}^+$ - $\text{CD4}^-$ - $\text{CD8}^-$  doppelt-negativer-T-Zellen (DN-T-Zellen), die antigenspezifisch  $\text{CD8}^+$ -positive zytotoxische T-Zellen hemmen können.<sup>131</sup> Abb. 3-15 zeigt die durchflußzytometrische Messung tumorinfiltrierender DN-T-Zellen am Beispiel des Patienten RR#561. Der Vergleich der Infiltration von DN-T-Zellen in Tumor- und Normalgewebe der fünfzehn vergleichbaren Patienten zeigte ein variables Bild: Beim Großteil der Patienten bestand in Tumor und Normalgewebe ein annähernd gleicher Anteil an DN-T-Zellen, bei zwei Patienten zeigte sich eine um mehr als 2% stärkere Infiltration des Tumorgewebes und bei zwei eine um mehr als 2% stärkere Infiltration des Normalgewebes (vgl. Abb. 3-16). Der Mittelwert des relativen Anteils der DN-T-Zellen an der T-Zell-Population in Tumor- und Normalgewebe beträgt  $4,0\%(\pm 4,5\%)$  bzw.  $3,2\%(\pm 1,2\%)$ , wobei der Unterschied statistisch nicht signifikant ist ( $p=0,53$ ).

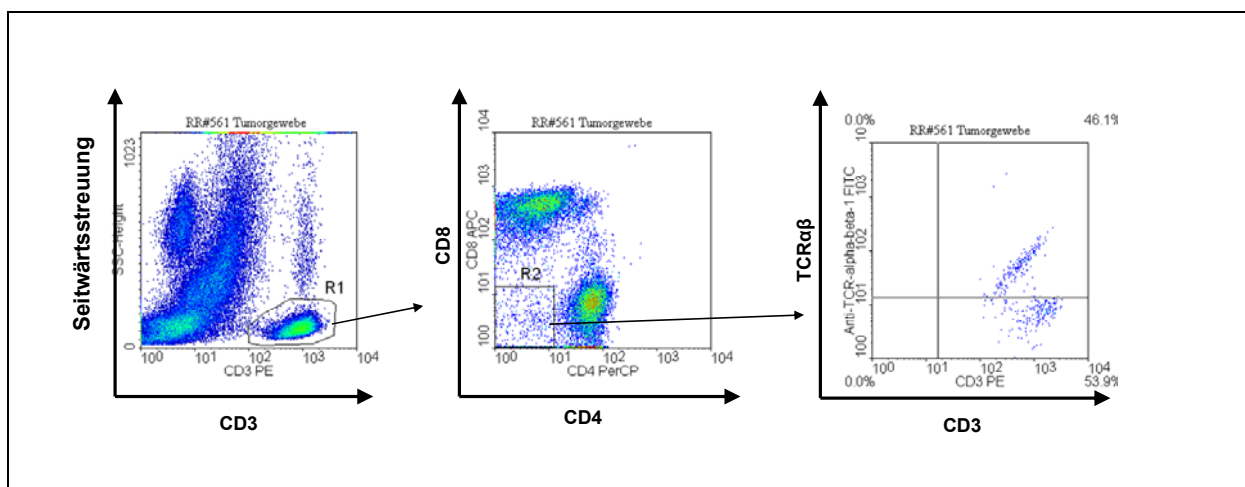
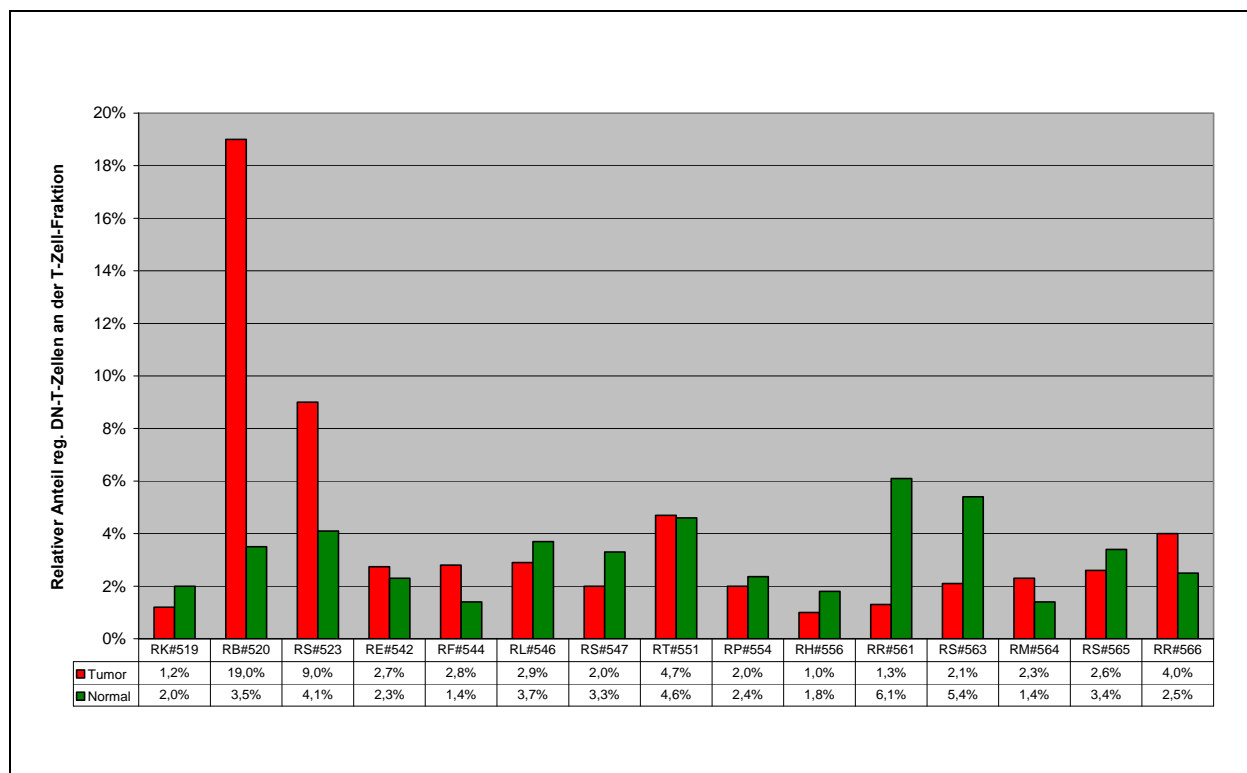


Abb. 3-15: Nachweis  $\text{CD3}^+$ ,  $\text{CD4}^-$ ,  $\text{CD8}^-$  doppelt negativer  $\text{TCR}\alpha\beta^+$ -T-Zellen im Tumorgewebe des Patienten RR#561. Im Bereich R2 befinden sich 2,84% der in R1 umgrenzten T-Lymphozyten. Davon sind 46,1%  $\text{TCR}\alpha\beta$  positiv und damit als DN-T-Zellen zu bezeichnen. Dies entspricht 1,3% der T-Lymphozyten.



**Abb. 3-16: Prozentualer Anteil von DN-T-Zellen an der T-Lymphozytenpopulation in Tumor- (rote Balken) und Normalgewebe (grüne Balken).**

Neben den DN-T-Zellen gibt es noch eine weitere immuninhibitorische Lymphozytenpopulation, die durch Positivität für CD4, eine starke Expression der  $\alpha$ -Kette des Interleukin-2-Rezeptors (CD25), sowie des Transkriptionsfaktors FoxP3 gekennzeichnet ist. Diese als  $CD3^+CD4^+CD25^{high}T_{reg}$ -Zellen bezeichneten Lymphozyten wurden durchflußzytometrisch durch Bestimmung des Anteils der  $CD3^+$ ,  $CD4^+$  und  $CD25$ -hoch exprimierenden T-Lymphozyten innerhalb der T-Zellpopulation gemessen. Der mittlere Anteil der so gemessenen Lymphozyten an der T-Zellpopulation beträgt 3,3% im Tumor- und 2,3% im Normalgewebe (n=14; p=0,31). Aufgrund der durch die geringe Spezifität des Aktivierungsmarkers CD25 bedingten eingeschränkten durchflußzytometrischen Nachweisbarkeit wurde ein quantitativer PCR-Nachweis des für  $T_{reg}$ -Zellen spezifischeren Transkriptionsfaktors FoxP3 in Tumor und Normalgewebe durchgeführt, der bei neun der zehn untersuchten klarzelligen Nierenzellkarzinome eine deutliche Mehrexpression im Tumorgewebe ergab (vgl. Abb. 3-18). Interessanterweise zeigte sich an den untersuchten papillären Nierenzellkarzinomen (RP#526 und RH#556) dieser Unterschied nicht. FoxP3 war im Tumorgewebe im Mittel elf Mal stärker exprimiert als im Normalgewebe.



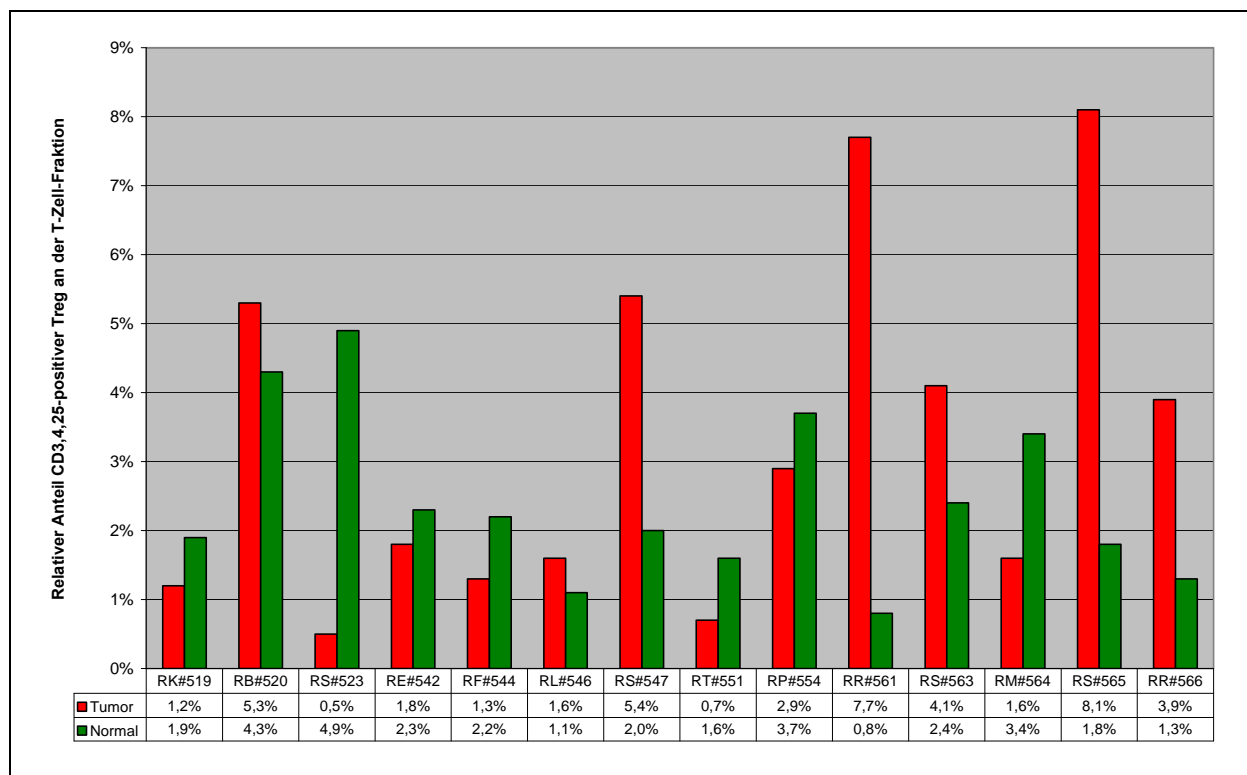


Abb. 3-17: Relativer Anteil der  $CD3^{+}CD4^{+}CD25^{high}T_{reg}$ -Zellen an der T-Zellfraktion in Tumor- (rote Balken) und Normalgewebe (grüne Balken).

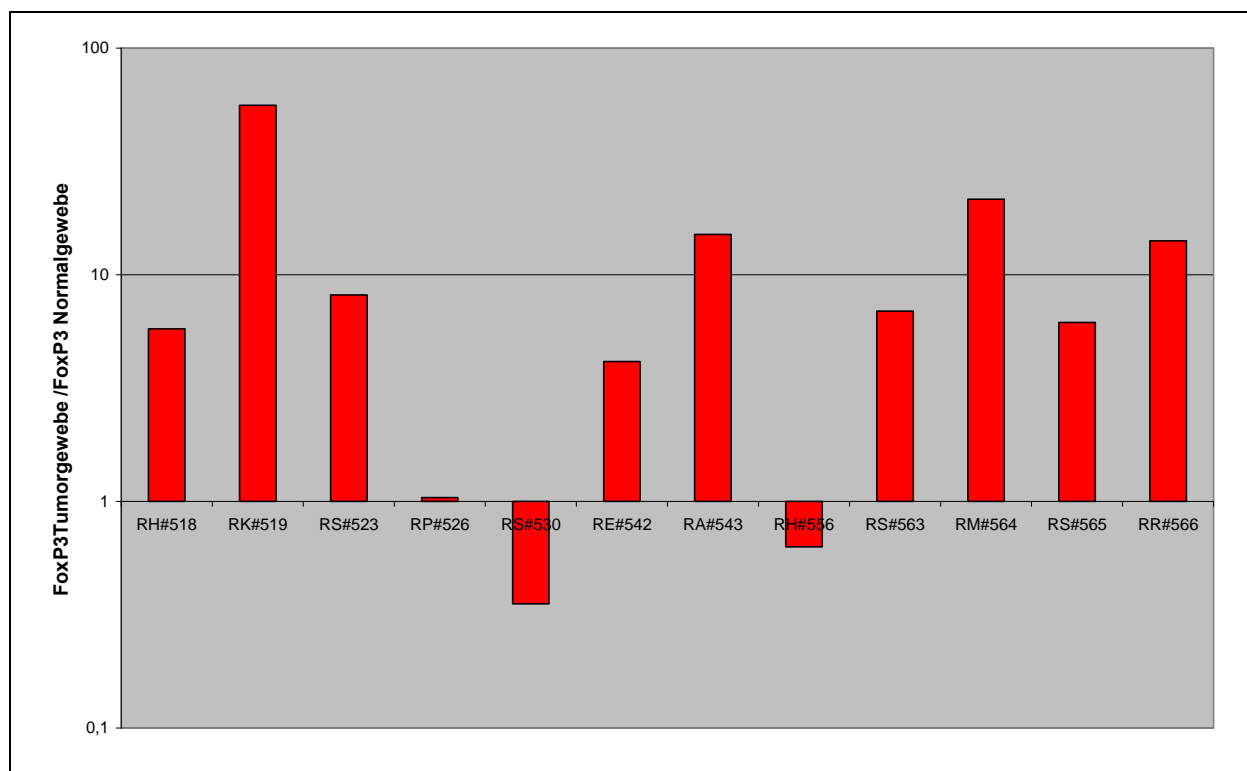


Abb. 3-18: Quantitative PCR des Transkriptionsfaktors FoxP3 in Tumor- und Normalgewebe. Die Expression wurde relativ zur Expression des Membrancoproteins (MCP) gemessen. Dargestellt ist die Expression im Tumorgewebe relativ zum Normalgewebe.

### 3.3.4 Nachweis antigenpräsentierender Zellen in Tumor- und Normalgewebe beim primären Nierenzellkarzinom.

Aufgrund ihrer zentralen Rolle bei der Induktion und Kontrolle von Immunreaktionen wurde der Versuch eines durchflußzytometrischen Nachweises von antigenpräsentierenden Zellen in Tumor- und Normalgewebe beim primären Nierenzellkarzinom unternommen.

Für plasmazytoide und myeloide dendritische Zellen konnte eine vermehrte Infiltration in Tonsillenkarzinomen gezeigt werden. Beide Populationen zeichnen sich durch Negativität für eine als Lineage-1 bezeichnete Antikörpermischung, sowie Positivität für HLA-II aus. Plasmazytoide dendritische Zellen exprimieren zudem CD123, die  $\alpha$ -Kette des IL-3-Rezeptors, während myeloide dendritische Zellen die als CD11c bezeichnete  $\alpha$ X-Untereinheit des Integrins CCR4 exprimieren. In Abb. 3-19 und Abb. 3-20 ist der Nachweis der beiden DC-Subpopulationen in Einzellzellsuspensionen aus Tumorgewebe und Normalgewebe dargestellt. Ein Nachweis dieser zwei Zellpopulationen gelang bei 9 Tumor- und 7 Normalgewebeprobe, wobei in drei Tumor- (RT#561, RM#564 und RR#566) und einer Normalgewebesuspension (RP#554) eine Identifikation klar abgrenzbarer Populationen möglich war, die zudem im korrespondierenden Normalgewebe der Patienten RM#564 und RR#566 bzw. im Tumorgewebe des Patienten RP#554 nicht, oder in deutlich geringerer Konzentration nachweisbar waren. Bei den weiteren Patienten zeigte sich keine Infiltration durch eine der beiden Zellgruppen (vgl. Abb. 3-20).

Ein Nachweis dendritischer Zellen mittels Messung der Oberflächenmoleküle B-7.1(CD80) und B-7.2(CD86), sowie ein Nachweis von B-Zellen mittels CD19 gelang nicht. Die durchgeführten Färbungen waren fast ausschließlich negativ und es gelang weder im Tumor-, noch im Normalgewebe eine Abgrenzung klarer Zellpopulationen. Die durchgeführten immunhistochemischen Färbungen des Tumorgewebes zeigten nur in einem Fall eine Anfärbung von CD1a positiven dendritischen Zellen (vgl. Abb. 3-21).

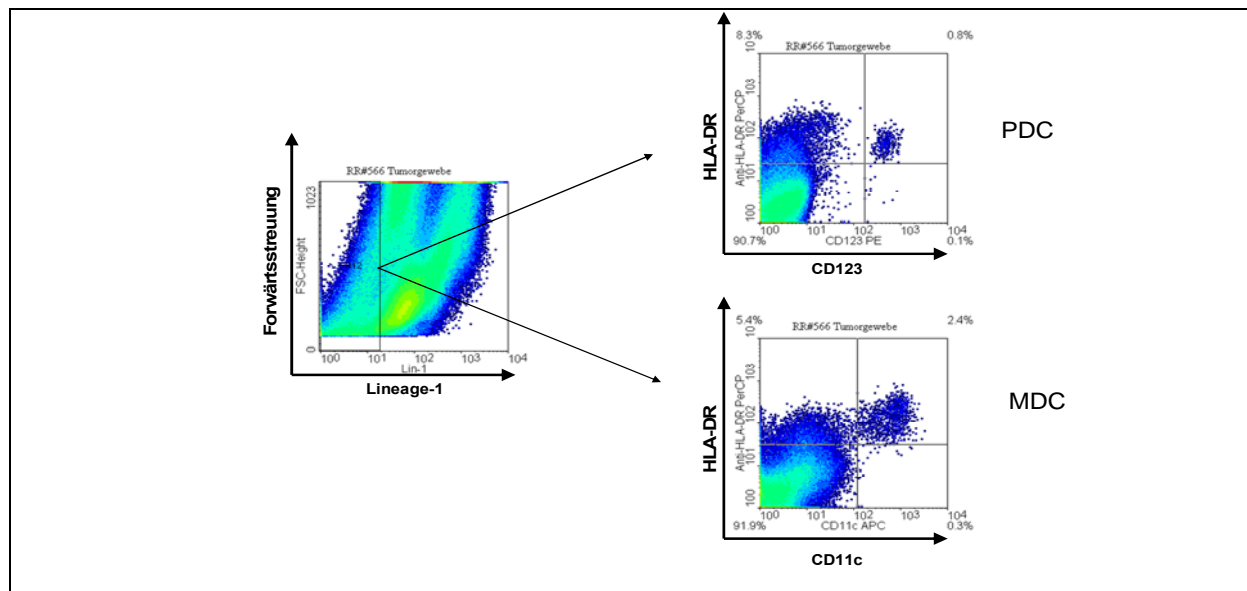


Abb. 3-19: Durchflußzytometrische Analyse plasmazytoider und myeloider dendritischer Zellen in Einzellsuspensionen aus Tumor- und Normalgewebe. Lineage-1-negative Zellen (linker density plot) werden gegatet und die Expression von HLA-DR (Abszisse) gegen CD123 (Ordinate obere Abb.) und CD11c (Ordinate untere Abb.) bestimmt.

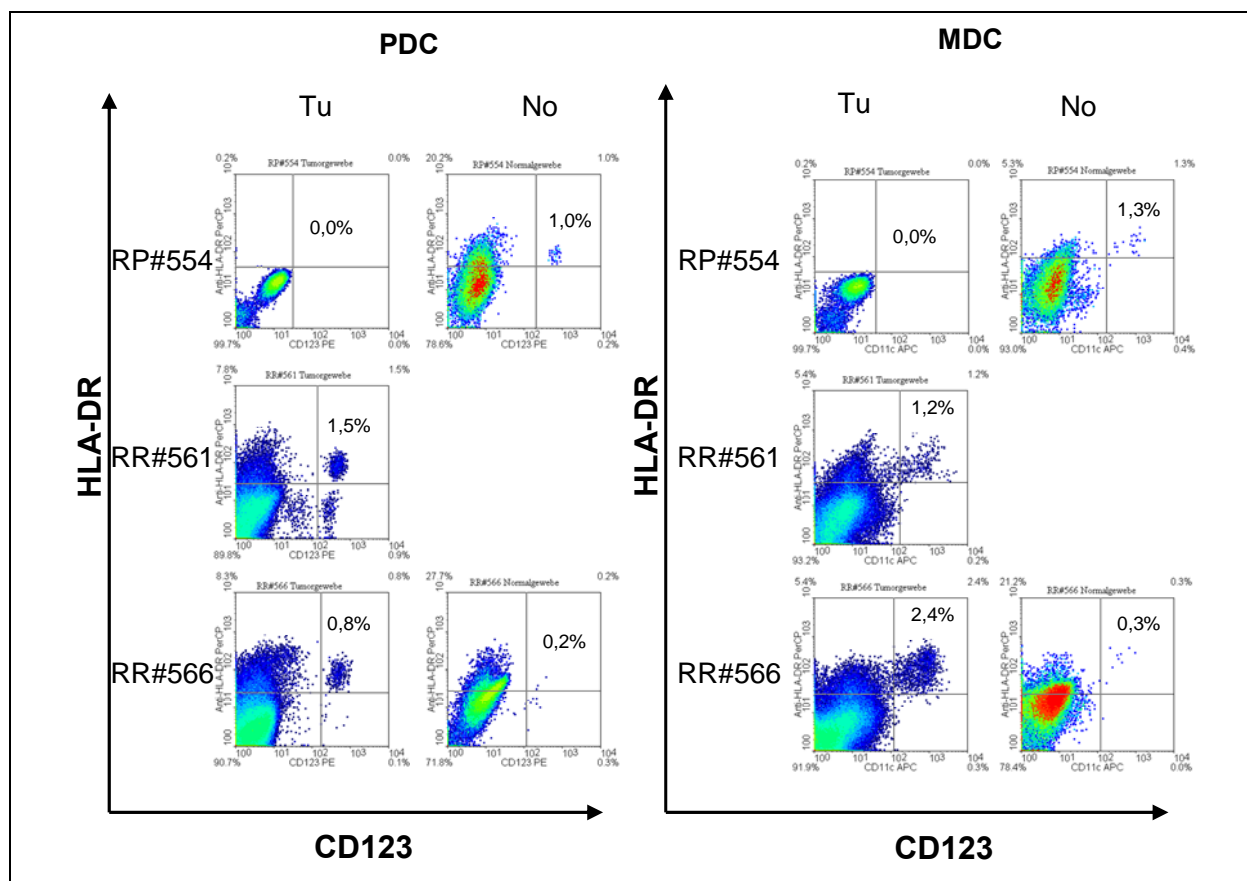
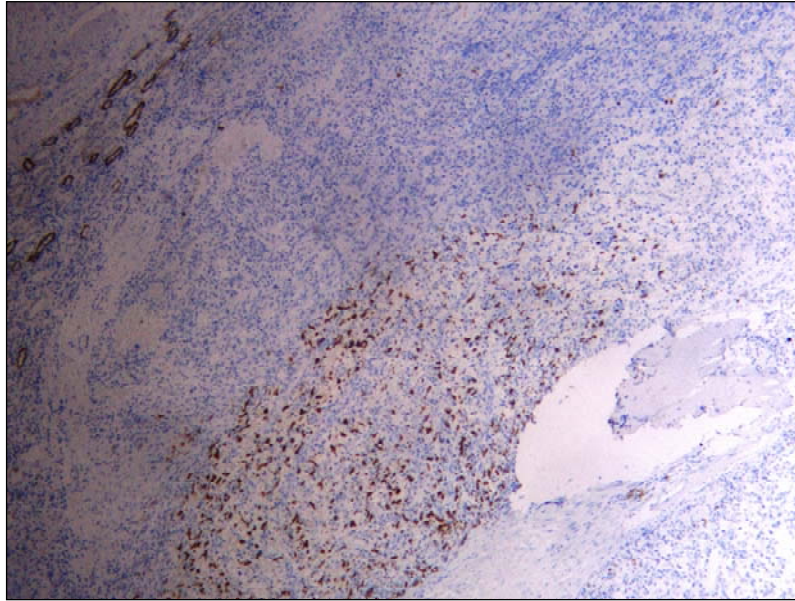


Abb. 3-20: Vergleichende Analyse der in den Tumor und das Normalgewebe infiltrierenden plasmacytoiden (linke Hälfte) und myeloischen (rechte Hälfte) dendritischen Zellen bei drei Nierenzellkarzinompatienten (RP#554, RR#561 und RR#566). Dargestellt ist der Anteil an allen events in Prozent.



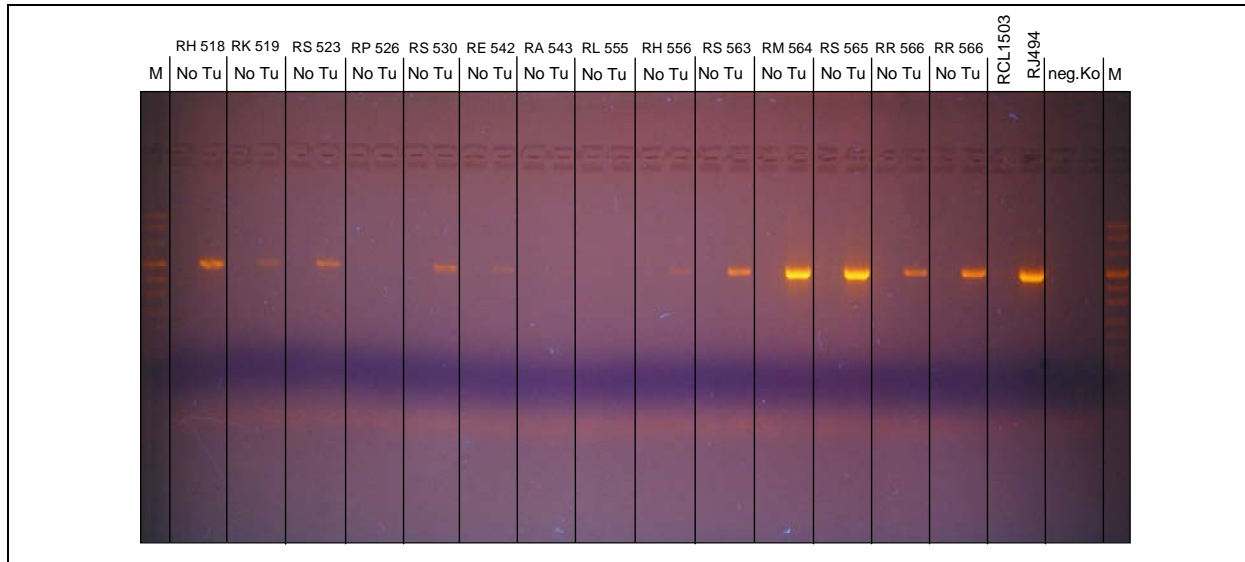
**Abb. 3-21: Immunhistochemische Färbung CD1a-positiver dendritischer Zellen am Tumorrand eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms (Patient RS#563, 100-fache Vergrößerung).**

### 3.3.5 Phänotypische Charakterisierung von Tumorzellen in Einzelzellsuspensionen aus primären Nierenzellkarzinomen.

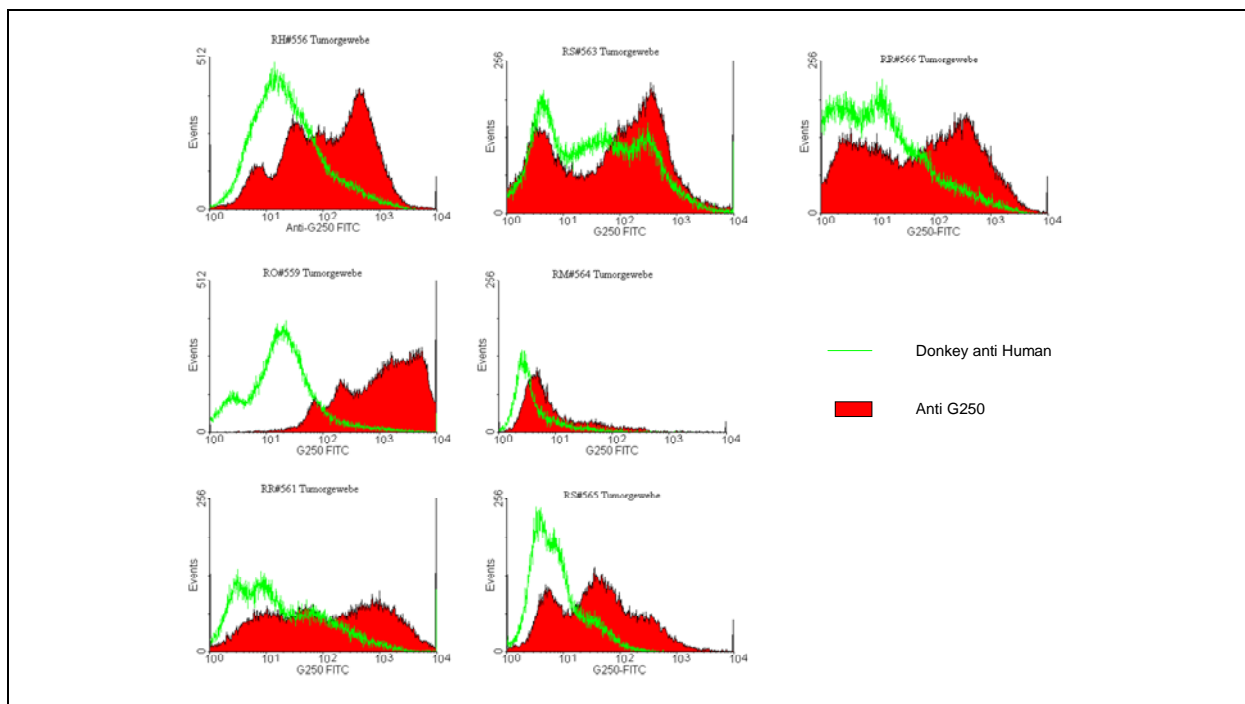
Neben der oben beschriebenen Analyse zellulärer Infiltrate in Nierenzellkarzinomgewebe erfolgte auch eine phänotypische Charakterisierung der Tumorzellen mittels Durchflußzytometrie und qualitativer, sowie quantitativer PCR. Von den für das Nierenzellkarzinom bekannten Tumorantigenen wurde die Expression der Carboanhydrase IX (G250) untersucht. Zudem wurden quantitative PCR- Analysen der immuninhibitorischen Oberflächenmoleküle CD70, PD-1 und PD-L1 durchgeführt.

Carboanhydrase IX ist ein nierenzellkarzinomspezifisches Antigen, das von der Mehrzahl der klarzelligen Nierenzellkarzinome, nicht aber von normalem Nierengewebe exprimiert wird. Seine Expression wurde zum einen durchflußzytometrisch mittels anti-G250 Antikörperfärbung und zum anderen mittels qualitativer PCR untersucht. Dabei konnten wir in sechs von zehn untersuchten Tumorzellsuspensionen klarzelliger Nierenzellkarzinome eine starke und für drei eine schwache G250-Expression nachweisen, während keine der Einzelzellsuspensionen aus Normalgewebe G250 exprimierten (vgl. Abb. 3-22). Die durchflußzytometrischen Analysen zeigten bei fünf von sieben untersuchten Einzelzellsuspensionen aus Tumorgewebe eine deutliche Expression von G250 (vgl. Abb. 3-23). Fasst man beide Untersuchungen zusammen, ergibt sich für elf von zwölf untersuchten klarzelligen Nierenzell-

karzinomen eine Expression von G250. In einem papillären Nierenzellkarzinom (RH#556) konnte in beiden Untersuchungen eine G250-Expression nachgewiesen werden, während das zweite papilläre Karzinom (RP#526) und das Nierenbeckenkarzinom (RL#555) G250-negativ waren.

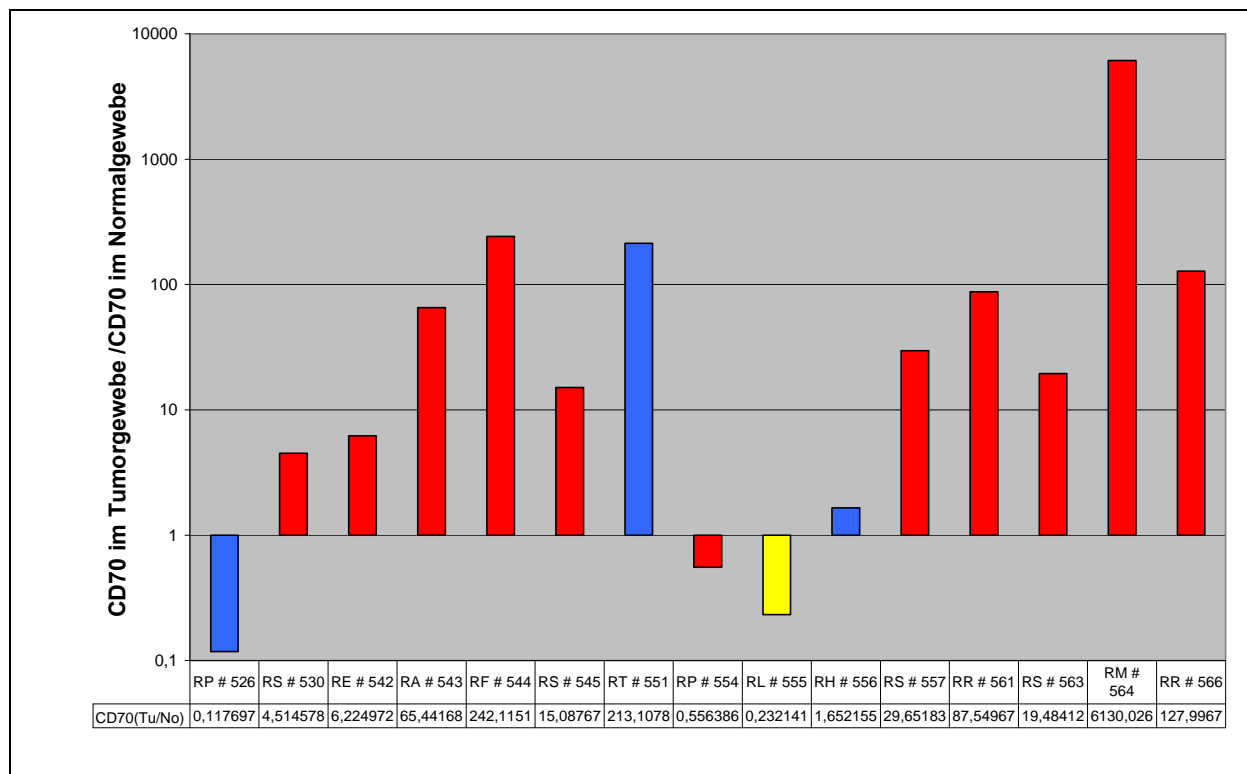


**Abb. 3-22: Expression von G250 in Tumor- und Normalgewebesuspensionen von 13 Patienten. Dargestellt ist die mittels Real-time-PCR ermittelte Expression von G250 in der Gelelektrophorese. M=Marker, Positivkontrolle=RJ494, Negativkontrolle=Fibroblasten**



**Abb. 3-23: Durchflußzytometrische Analyse der G250-Expression mit anti-G250-Antikörpern. Dargestellt ist das Histogramm von primären Nierenzellkarzinom-Einzelzellsuspensionen. Grüne Linie=Donkey anti Human-IgG, rote gefüllte Linie: Anti-G250-FITC**

Für CD70 konnte eine vermehrte Expression auf Nierenzellkarzinomzellen und eine Apoptoseinduktion bei T-Zellen durch Interaktion mit CD27 gezeigt werden.<sup>88</sup> Im Rahmen der hier beschriebenen Arbeit erfolgte ein quantitativer PCR- Nachweis der CD70 Expression in Tumor- und Normalgewebe von fünfzehn Patienten mit primären Nierenzellkarzinomen. In Abb. 3-24 ist die Expression von CD70 im Tumorgewebe relativ zur gemessenen Expression im Normalgewebe dargestellt. Bei zwölf von fünfzehn untersuchten Patienten zeigte sich eine höhere CD70-Expression im Tumor- als im Normalgewebe, bei drei Patienten war das Verhältnis umgekehrt. Bei elf der zwölf untersuchten klarzelligen Nierenzellkarzinome war die CD70-Expression im Tumorgewebe gesteigert.

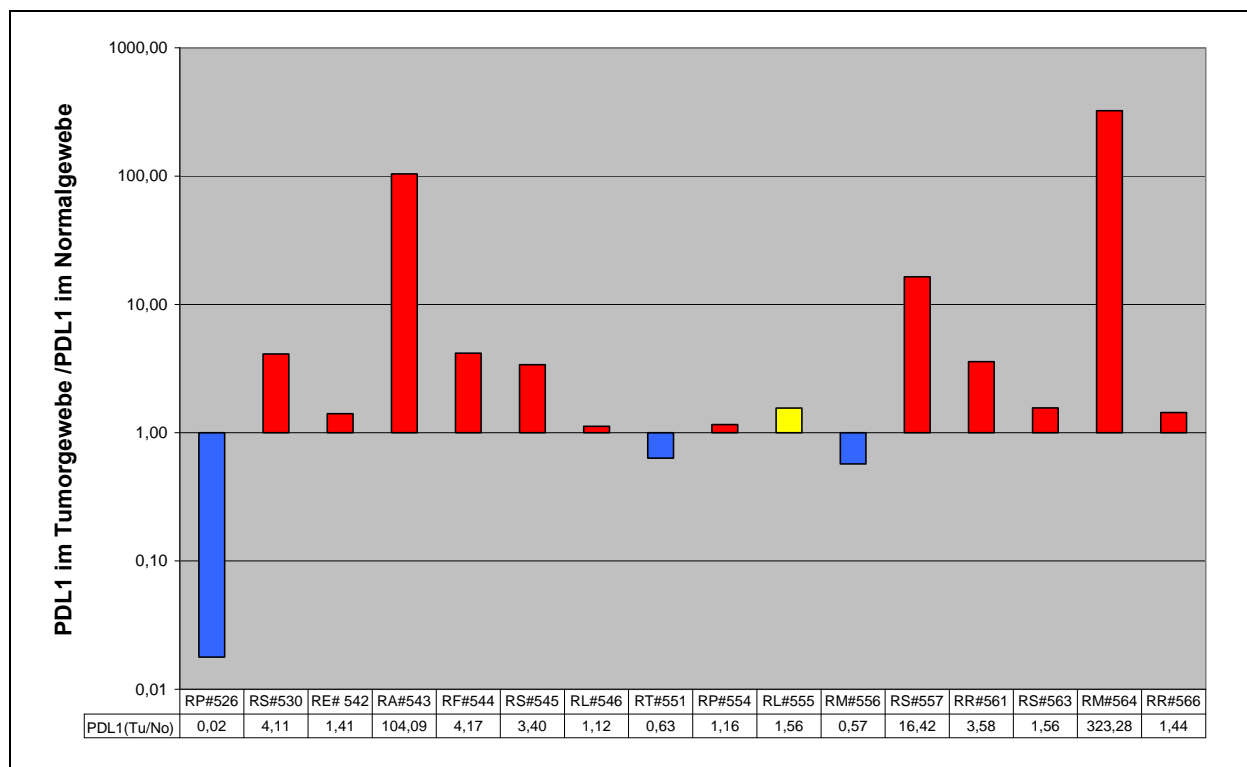


**Abb. 3-24: Quantitativer PCR-Nachweis von CD70 im Tumorgewebe relativ zum Normalgewebe von fünfzehn Patienten mit primären Nierenzellkarzinomen. Rote Balken stehen für klarzellige Nierenzellkarzinome. Die drei in Blau dargestellten Proben sind Nierenzellkarzinome vom papillären Typ und bei RL#555 ergab sich die Diagnose eine Nierenbeckenkarzinoms (gelber Balken).**

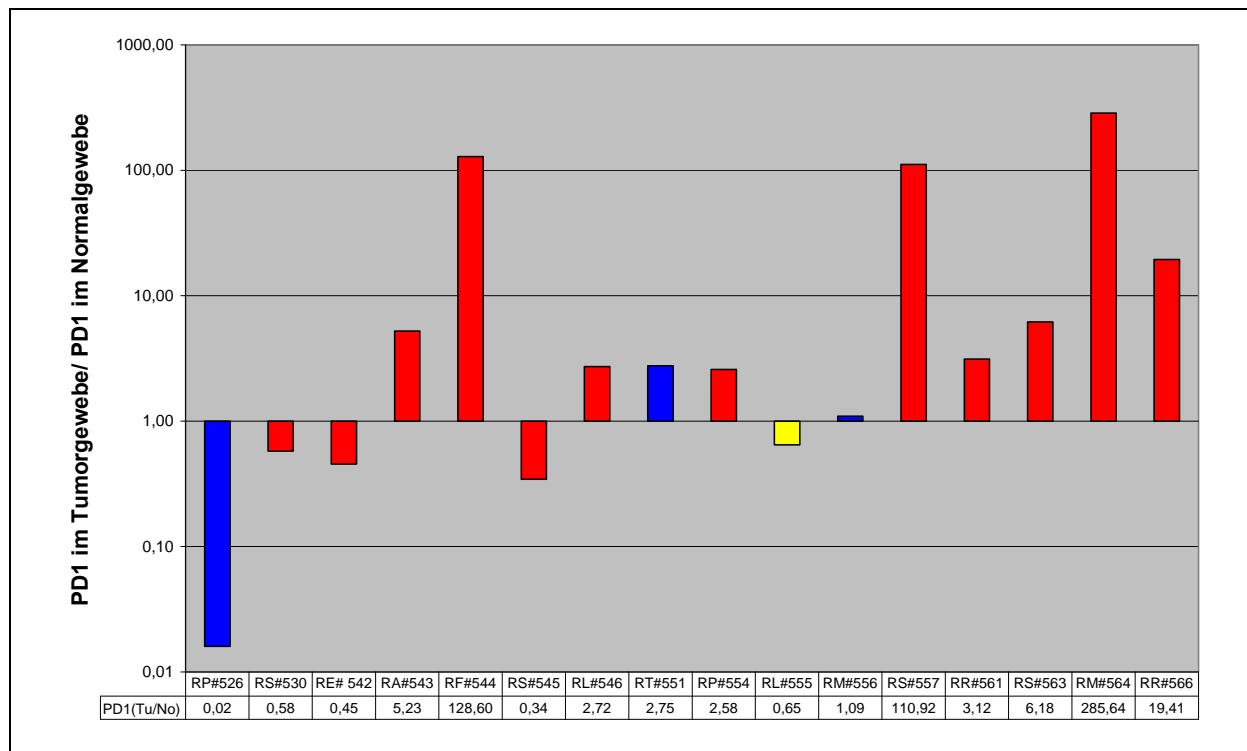
Ein weiteres auf Tumorzellen konstitutiv exprimiertes Oberflächenprotein, das eine coinhibitorische Funktion ausüben kann, ist PD-L1 (programmed death ligand 1, B7-H1), das durch Interaktion mit PD-1 auf T-Zellen deren Apoptose induziert.<sup>132</sup> Die Analyse der PD-1 und PD-L1 Konzentration in Tumor- und Normalgewebe erfolgte ebenfalls mittels quantitativer PCR. Abb. 3-25 stellt die Expression von PDL-1 im Tumorgewebe relativ zur Expression im Normalgewebe von sechzehn Patienten in logarithmischer Skalierung dar. Bei

sieben der zwölf untersuchten klarzelligen Nierenzellkarzinome zeigte sich eine im Tumorgewebe mehr als dreifach gesteigerte Expression, bei den verbleibenden fünf war das Verhältnis zwischen 1,1- und 1,6-fach gegenüber der Expression im Normalgewebe gesteigert. In allen drei untersuchten papillären Nierenzellkarzinomen war die PDL-1-Expression im Tumorgewebe relativ zum normalen Nierengewebe vermindert.

Auch die Expression des Rezeptormoleküls PD-1 erwies sich bei sieben der zwölf untersuchten klarzelligen Nierenzellkarzinome im Tumorgewebe relativ zum Normalgewebe mehr als dreifach erhöht, bei zwei Patienten ergab sich eine etwa 2,5-fach gesteigerte Expression und bei drei Patienten eine etwa 2-3-fach verminderte Expression. In der Gruppe der papillären Nierenzellkarzinome zeigte sich die PD-1-Expression variabel (Abb. 3-26).



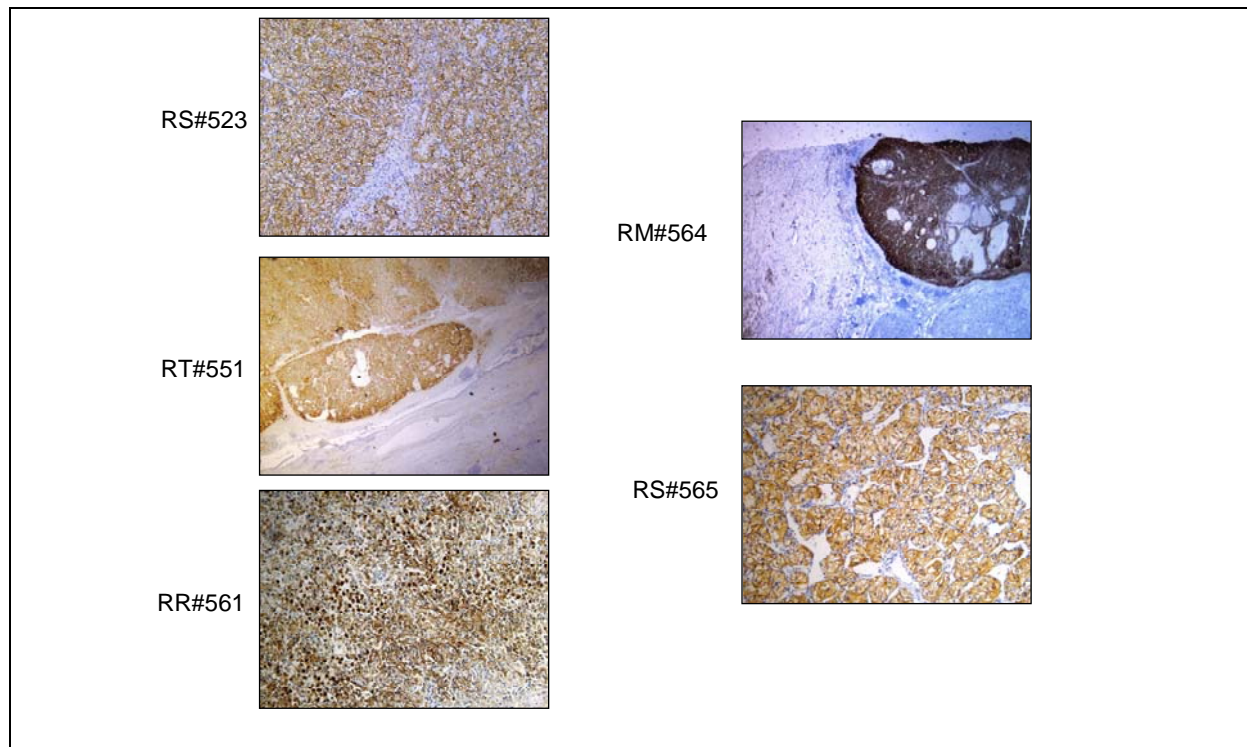
**Abb. 3-25: Quantitative PCR-Analyse der PDL-1 Expression im Nierenzellkarzinomgewebe, relativ zur Expression im Normalgewebe. Die Bestimmung der Expression im Tumor- und Normalgewebe erfolgte relativ zur Expression des MCP als „Housekeeper“. Rote Balken stellen klarzellige, blaue papilläre Nierenzellkarzinome und der gelbe ein Nierenbeckenkarzinom dar.**



**Abb. 3-26: Quantitative PCR-Analyse der PD-1 Expression im Nierenzellkarzinomgewebe, relativ zur Expression im Normalgewebe. Die Bestimmung der Expression im Tumor- und Normalgewebe erfolgte relativ zur Expression des MCP als „Housekeeper“. Rote Balken stellen klarzellige, blaue papilläre Nierenzellkarzinome und der gelbe ein Nierenbeckenkarzinom dar.**

Eine durchflußzytometrische Analyse eines möglichen MHC-I-Verlustes mittels Färbung mit einem Anti-MHC-Klasse-I-Antikörper (W6/32) zeigte sowohl positive, als auch negative Zellen, die jedoch aufgrund fehlender Tumormarker nicht der Tumorzellpopulation zugeordnet werden konnten. Die eigentlich zur Identifikation natürlicher Killerzellen angefertigten immunhistochemischen Färbungen von CD56 zeigten bei fünf der zehn durchgeführten Färbungen neben CD56-positiven Leukozyten eine deutliche Positivität des Tumorgewebes, bei Negativität des angrenzenden Normalgewebes. CD56 ist ein auch als NCAM (neural cell adhesion molecule) bezeichnetes Mitglied der Immunglobulin Superfamilie, dessen Expression auf Tumorzellen positiv mit Metastasierung und Tumorgroße des primären Nierenzellkarzinoms korreliert.<sup>133</sup>





**Abb. 3-27: Immunhistochemische Färbungen von CD56 in Tumorschnitten in unterschiedlichen Vergrößerungen.**

### **3.4 Wachstum und phänotypische Charakterisierung kultivierter tumorinfiltrierender Lymphozyten.**

Insgesamt konnten bei 13/29 Patienten tumorinfiltrierende Lymphozyten aus Tumorstücken isoliert und expandiert werden. Aus allen Kulturen wurden Färbungen zur durchflußzytometrischen Analyse angefertigt und Zellen eingefroren. Bei 9/13 Patienten war auch die durchflußzytometrische Messung der Einzelzellsuspension aus Tumorgewebe erfolgreich. Ein Vergleich des relativen Anteils CD4- und CD8-positiver Lymphozyten an allen CD3-positiven Zellen direkt aus dem Tumorgewebe und aus der TIL-Kultur der neun vergleichbaren Patienten zeigte deutliche Unterschiede. Lediglich bei den Patienten RK#519 und RM#564 zeigte sich ein ähnliches Verhältnis der Lymphozytenpopulationen im Tumorgewebe und in der Lymphozytenkultur (vgl. Abb. 3-28). Auch bezüglich der Aktivierungs-Parameter CD25 und CD69 zeigte sich eine deutliche Differenz. Die kultivierten Lymphozytenkulturen zeigten eine deutlich höhere Positivität für CD25 als das lymphozytäre Infiltrat im korrespondierenden Tumorgewebe (vgl. Abb. 3-29). Der Mittelwert im Anteil CD69-positiver

Zellen an der CD3-positiven Population betrug bei den sieben vergleichbaren Tumoren 70,1% im Tumorgewebe, während er in den Lymphozytenkulturen 54% ausmachte (n=8).

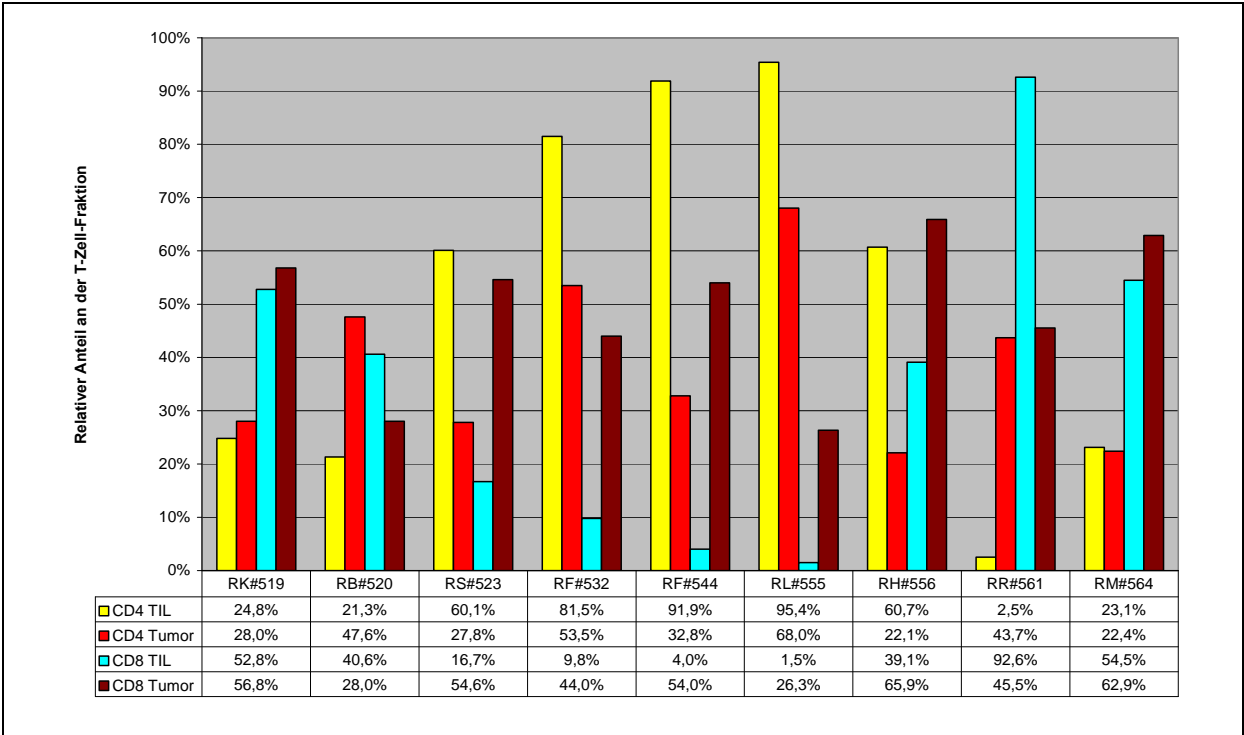


Abb. 3-28: Anteil CD4- (gelb=TIL, rot=Tumor) und CD8- (blau=TIL, braun=Tumor) positiver T-Zellen an der CD3-positiven Population direkt im Tumorgewebe und in der Lymphozytenkultur in Prozent (n=9).

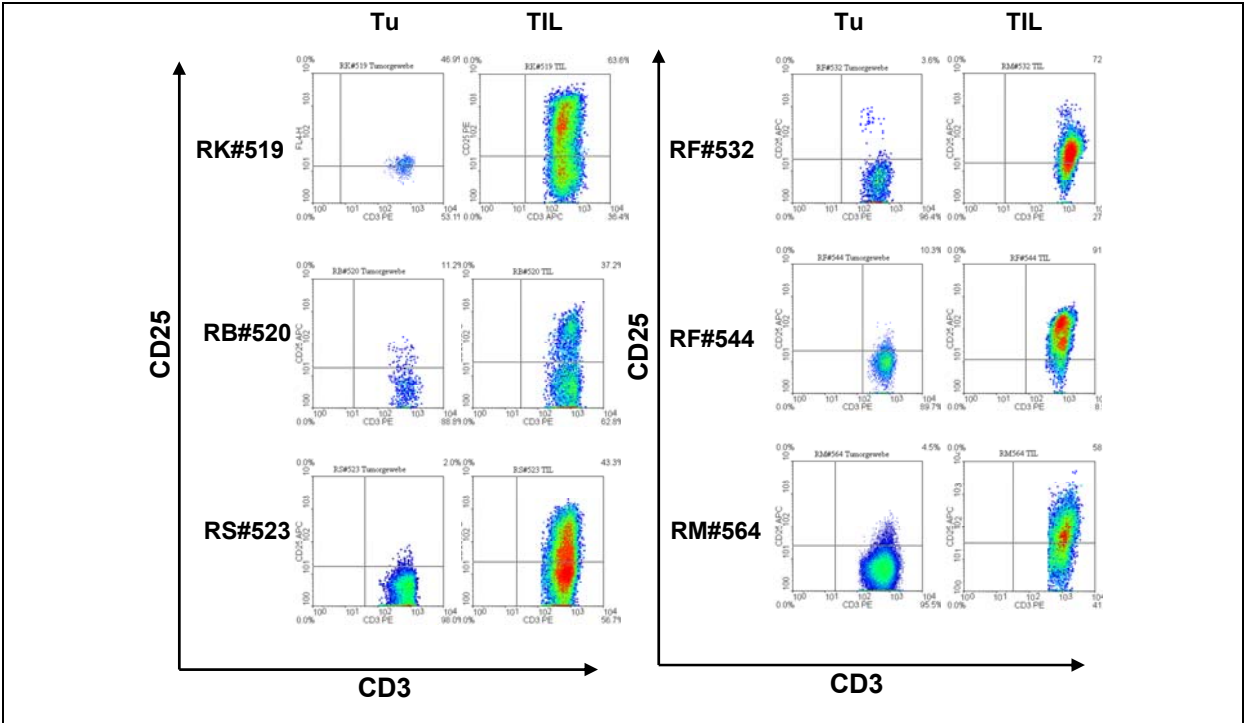


Abb. 3-29: Exemplarische Darstellung des Vergleiches der CD25 Expression in Einzelsuspension aus Tumorgewebe (linke Spalten) und Lymphozytenkultur (rechte Spalten) von sechs Patienten.

### 3.5 Wachstum und Charakterisierung der Tumorzellkulturen.

Bei 24 der 29 Patienten, von denen Tumorgewebebeobachten das Labor erreichten, wurde ein Teil der Einzelzellsuspension zur Etablierung einer Tumorzell-Linie ausgesät. Der Mittelwert der Anzahl ausgesäter Zellen betrug  $2,69 \times 10^6$  Zellen. In sieben dieser Kulturansätze kam es zur Bildung eines Zellrasens am Boden der Kulturflaschen, wobei insgesamt ein schlechtes Wachstum der Kulturen zu beobachten war. In einigen Kulturen kam es zur Vermehrung spindelförmiger Zellen, die als Fibroblasten identifiziert wurden. Beim Splitten der Kulturen wurde ein Teil der Zellen entnommen und für die durchflußzytometrische Analyse gefärbt. Zur Identifikation von Tumorzellen wurde der spezifische Nierenzellkarzinom-Marker G250 eingesetzt. Zudem wurden Färbungen von MHC-I (W6/32) und HLA-A2 angefertigt, um eventuelle MHC-Verluste zu erkennen. Abb. 3-30 zeigt die Ergebnisse für zwei G250-positive Kulturen aus klarzelligen und eine G250-negative aus einem papillären Nierenzellkarzinom, in der sich im Gegensatz zu den beiden klarzelligen Linien auch MHC-I-negative Zellen nachweisen ließen.

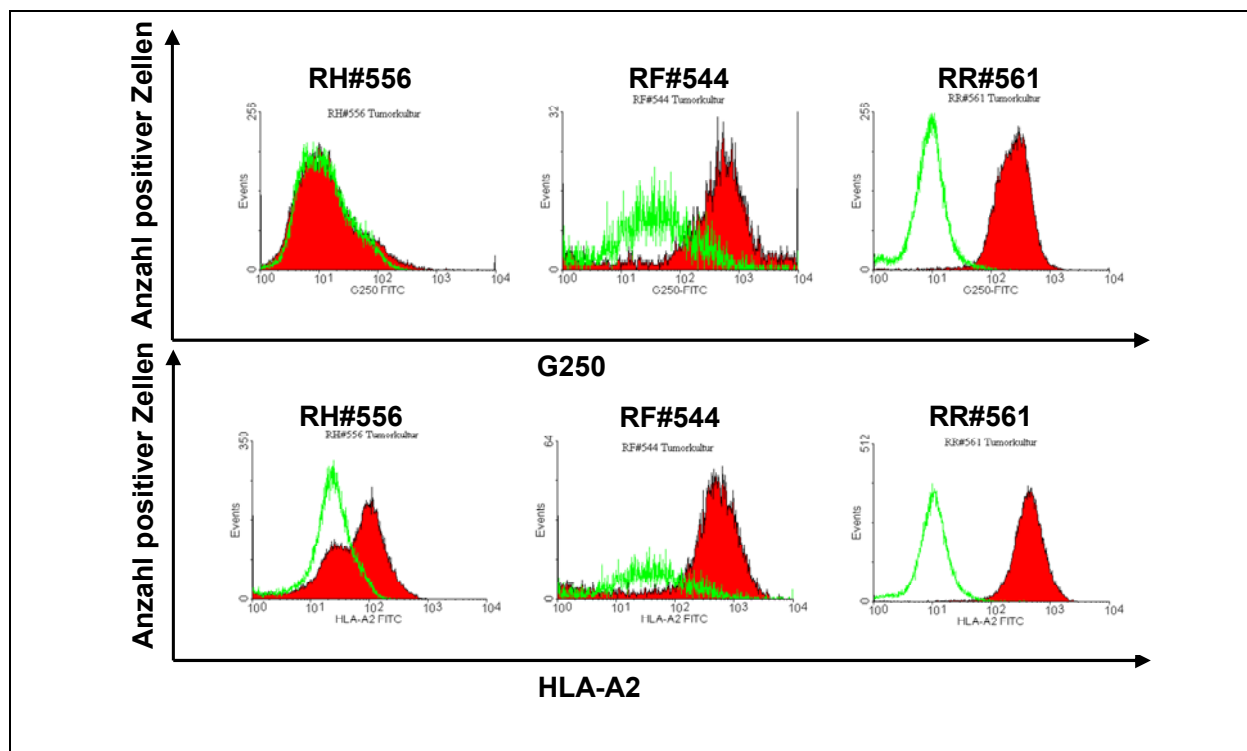


Abb. 3-30: Immunhistochemische Färbungen von Tumorzellkulturen der Patienten RH#556, RF#544, RR#561. Die Kulturen der klarzelligen Nierenzellkarzinome RF#544 und RR#561 sind G250-positiv, die des papillären Karzinoms RH#556 erwies sich als negativ. In der unteren Reihe sind Färbungen von HLA-A2 dargestellt.

## 4 Diskussion

Insgesamt wurde im Rahmen dieser Studie Gewebe von 29 an einem primären Nierenzellkarzinom erkrankten Patienten aufgearbeitet. Das durchschnittliche Erkrankungsalter von Frauen betrug 74,8 Jahre und liegt etwas über dem in größeren Krebsstatistiken beschriebenen Alter von 70 Jahren, das Durchschnittsalter der untersuchten Männer betrug 68 Jahre und liegt ebenfalls etwas über dem allgemein für Nierenzellkarzinompatienten angenommenen Erkrankungsalter von 65 Jahren. Die Stadienverteilung ist mit 15 lokalisierten und 11 fortgeschrittenen Stadien in etwa die von Ries et al für den Zeitpunkt der Diagnose beschriebene<sup>1</sup> und die histologische Untersuchung ergab beim überwiegenden Teil der Patienten den vorherrschenden klarzelligen Typ.

Der Umstand, dass nur bei 15 der 29 Patienten eine erfolgreiche Aufarbeitung sowohl des Tumor- als auch des Normalgewebes erfolgte, ist wohl zum Einen auf eine häufig geringe Probengröße und zum Anderen auf zystische und nekrotische Anteile im Tumorgewebe zurückzuführen. Die Größe der Gewebeproben ist durch die Notwendigkeit einer histologischen Aufarbeitung der Nephrektomiepräparate begrenzt, da die Resektionsränder des Tumors zur pathologischen Beurteilung intakt bleiben müssen. So ist auch die Stadienverteilung der fünfzehn zum Vergleich geeigneten Patienten in Richtung der fortgeschritteneren Stadien mit häufig größerem Durchmesser des Primärtumors verschoben. Zu untersuchen wäre, ob durch eine besonders schonende Methode der Aufarbeitung, beispielsweise durch enzymatischen Verdau, größere Zellzahlen erreicht werden können. Die hier vorgestellte rein mechanische Dissoziation bietet demgegenüber jedoch den Vorteil einer geringeren Aufarbeitungszeit bis zur Färbung und Fixierung. Eine Verlängerung dieser Zeit könnte phänotypische Veränderungen nach sich ziehen, die sich auch in dieser Arbeit beim Vergleich der ex vivo charakterisierten tumorinfiltrierenden Lymphozyten mit denen aus Tumorgewebe in vitro kultivierten deutlich zeigten. Besonders der Aktivierungsmarker CD25, der Rezeptor für das zur in vitro Stimulation verwendete IL-2, war auf kultivierten Lymphozyten deutlich stärker exprimiert. Das Ergebnis dieses Vergleiches kultivierter und direkt ex vivo charakterisierter tumorinfiltrierender Lymphozyten unterstreicht die Wichtigkeit einer möglichst direkten Charakterisierung des Immuneffektorzellinfiltrates.

Das Gesamtausmaß der T-Zell-Infiltration schwankte in Tumor- und Normalgewebe stark und der Vergleich der Mittelwerte (15,8% bzw. 7,1%) erreichte keine statistische Signifikanz ( $p=0,105$ ). Auffallend, wenn auch aufgrund der kleinen Stichprobe begrenzt aussagekräftig,

war die relativ zu Nierenzellkarzinomen vom klarzelligen Typ in jenen vom papillären Typ deutlich geringere Infiltration durch  $CD3^+$ -T-Zellen (3,1% vs. 12,8%). Eine zu erwartende relativ zum Normalgewebe stärkere Infiltration des Nierenzellkarzinomgewebes durch Lymphozyten sollte durch eine größer angelegte Studie statistisch belegt werden, da sie ein weiteres Indiz für eine Erkennung von Karzinomzellen durch das humane Immunsystem darstellen würde. Bisherige Studien, die das lymphozytäre Infiltrat in Nierenzellkarzinomen untersucht haben, stellten keinen Vergleich zum Normalgewebe als Referenz an, so dass ein Vergleich mit der Literatur schwierig ist. Bromwich et al gaben das Ausmaß der T-zellulären Infiltration als relativen Anteil am Gesamtvolumen der Tumorproben an, der für  $CD4^+$ -T-Zellen 0,4% und für  $CD8^+$ -T-Zellen 1,08% betrug.<sup>134</sup> Webster et al führten eine durchflußzytometrische Analyse von durch Dichtegradientenzentrifugation aus enzymatisch verdauten primären Nierenzellkarzinomen gewonnenen mononukleären Zellen durch und beschrieben einen relativen Anteil von 45% für T-Zellen, 29% für Makrophagen und 24% für NK-Zellen. B-Zellen wurden nur in sehr geringen Konzentrationen gemessen. Eine Aufteilung des T-zellulären Infiltrates in  $CD8^+$  und  $CD4^+$  erfolgte nicht.<sup>135</sup> Ein Vergleich der vorliegenden Messungen mit den von Webster et al beschriebenen Ergebnissen ist aufgrund der Unterschiede in Aufarbeitung und Referenzpopulation nur begrenzt möglich. Bestätigt wurde anhand der durchgeführten Messungen von CD19 die geringe Infiltration durch B-Zellen. Das Oberflächenmolekül CD45 wird von der Mehrzahl der Zellen des hämatopoetischen Systems einschließlich der T-Zellen exprimiert. Durch Bezug auf CD45-positive Zellen erhält man eine der von Webster et al untersuchten ähnliche Referenzpopulation. Die relativen Anteile  $CD3$ -positiver T-Zellen an der Gesamtheit der  $CD45$ -positiven Zellen sind mit den von Webster et al beschriebenen Ergebnissen gut vereinbar. Im Tumorgewebe hatten die  $CD3$ -positiven T-Zellen einen Anteil von 46,1% an der  $CD45$ -positiven Zellpopulation, während dieser im Normalgewebe 38% betrug, wobei jedoch ebenfalls keine statistische Signifikanz erreicht wurde ( $p=0,27$ ) und das Ergebnis durch eine umfassendere Studie gesichert werden sollte. Andere relevante Arbeiten verwendeten semiquantitative Methoden, die schlecht mit der hier vorliegenden Messung vergleichbar sind, oder verzichteten auf eine quantitative Analyse der T-Zell-Population.<sup>82,136</sup>

$CD8$  positive, zytotoxische T-Zellen erkennen Antigene, die auf HLA-I-Molekülen präsentiert werden und lysieren ihre Zielzelle direkt mittels Granzyme-B und Perforin. HLA-I wird von fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Auf die Tumorummunologie übertragen bedeutet dies, dass zytotoxische T-Zellen befähigt sind, Tumorzellen, die tumorspezifische Antigene

auf HLA-I- Molekülen präsentieren, zu erkennen und zu zerstören. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Analyse der T- lymphozytären Infiltration in primäre Nierenzellkarzinome zeigte im Tumor ein Überwiegen der CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen. Zudem war der relative Anteil zytotoxischer T-Zellen an der T-Zell-Population im Tumor signifikant höher, als im Normalgewebe (51,8% vs. 40,7%;  $p=0,018$ ), während sich der relative Anteil CD4-positiver T-Zellen als signifikant niedriger erwies (34,5% vs. 47,3%;  $p=0,005$ ). Cozar et al beschrieben hingegen keine signifikanten Unterschiede der relativen Anteile CD4- und CD8-positiver Lymphozyten an der Lymphozytenpopulation in Tumorgewebe und peripheren Blutproben. Wie in Kapitel 1.2.3.1 beschrieben, bedarf es zur Initiierung einer adaptiven Immunantwort eines vorherigen Kontaktes einer Immunzelle mit ihrem spezifischen, von einer Antigenpräsentierenden Zelle präsentierten Antigen. An den folgenden phänotypischen Veränderungen lässt sich der Aktivierungsgrad der untersuchten T-Zellen ablesen. Auch im Aktivierungsgrad zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den T-Lymphozyten im Tumor- und Normalgewebe. Der Aktivierungsmarker CD69 war im Mittel bei 70,4% ( $\pm 22,2\%$ ) der das Tumorgewebe und nur bei 44,8% ( $\pm 18,8\%$ ) der das Normalgewebe infiltrierenden T-Lymphozyten positiv ( $p=0,002$ ). CCR7 und CD45 RA erwiesen sich in Tumor- und Normalgewebe als bei über 80% der Zellen negativ und CD45R0 als überwiegend positiv, was mit einem antigenerfahrenen Effektor-Memory-Typ des lymphozytären Infiltrates vereinbar ist. Auch durch die in der TCR-V $\beta$ -Spektrumtypisierung nachgewiesene Oligoklonalität des TCR-Repertoires der den Tumor infiltrierenden T-Zellen wurden diese Daten bestätigt. Eine ausgeprägte Klonalität des TCR-Repertoires im primären Nierenzellkarzinom wurde bereits 1995 durch Gaudin et al beschrieben.<sup>137</sup> Der Mittelwert des relativen Anteils CD45RA-positiver und somit naiver Zellen an der T-Zellpopulation lag im Tumorgewebe mit 15,9% unter dem im Normalgewebe gemessenen Wert von 22,4% ( $p=0,31$ ). Im Gegensatz zu den verglichenen T-Zell-Subpopulationen zeigten Cozar et al bezüglich der Aktivierungsmarker CD95 und CD45R0 signifikante Unterschiede zwischen tumorinfiltrierenden und peripheren Blutleukozyten, was mit den Ergebnissen dieser Arbeit gut vereinbar ist.

Das den Tumor infiltrierende lymphozytäre Infiltrat ist diesen Ergebnissen zufolge aktiviert, überwiegend vom zytotoxischen Typ und somit theoretisch in der Lage Tumorzellen zu zerstören. Dennoch kam es bei den Patienten zur Entstehung eines Nierenzellkarzinoms. Empirisch ist nur bei einem sehr geringen Anteil von etwa 1% eine Spontanremission zu erwarten, so dass man Mechanismen vermuten kann, die es den Tumorzellen ermöglichen,

einer Zerstörung durch das spezifische Immunsystem zu entgehen. Für  $CD3^{+}-CD4^{+}-CD25^{+}-T_{reg}$  wurde eine negative Korrelation von Prognose und Ausmaß ihrer Infiltration in Nierenzellkarzinome beschrieben.<sup>97</sup> Diese Beobachtung war Anlass zu einer vergleichenden Analyse der Infiltration durch  $CD3^{+}-CD4^{+}-CD25^{+}-T_{reg}$  in Tumor- und Normalgewebe der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten. Die durchflußzytometrische Analyse ergab einen mittleren Anteil der  $CD3^{+}-CD4^{+}-CD25^{high}-T_{Reg}$  von 3,3% im Tumorgewebe und 2,3% im Normalgewebe, wobei der Vergleich im T-Test kein statistisch signifikantes Niveau erreichte ( $p=0,31$ ). Die begrenzte Spezifität des Aktivierungsmarkers CD25 und die schwierige Abgrenzung der  $CD25^{high}$ -Population relativieren die Aussagekraft der durchgeführten Messungen und zeigen die Notwendigkeit eines spezifischeren zur durchflußzytometrischen Analyse anwendbaren Markers.  $CD3^{+}-CD4^{+}-CD25^{high}-T_{Reg}$  lassen sich alternativ über den spezifischen Transkriptionsfaktor FoxP3 nachweisen. Daher wurde zusätzlich ein Nachweis der FoxP3-Expression in Tumor- und Normalgewebe mittels quantitativer PCR durchgeführt. Bei neun der dreizehn analysierten Patienten zeigte sich eine im Mittel um den Faktor elf verstärkte Expression von FoxP3 im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe. Neben der von Griffiths et al beschriebenen negativen Korrelation von Prognose und relativem Anteil der  $CD3^{+}-CD4^{+}-CD25^{high}-T_{reg}$  in peripherem Blut und Tumorgewebe, ist dies ein weiteres Indiz für einen Einfluss der  $CD3^{+}-CD4^{+}-CD25^{high}-T_{reg}$ -Population auf die Tumorbilogie des Nierenzellkarzinoms, die auch einen therapeutischen Ansatzpunkt bieten könnte. Die therapeutische Depletion CD25-positiver T-Zellen ist für das Nierenzellkarzinom bereits in einer klinischen Studie zur Unterstützung einer Vakzinierung mittels mit Tumor-RNA transfizierter dendritischer Zellen mit Erfolg eingesetzt worden.<sup>138</sup>

$TCR\alpha\beta^{+}-CD3^{+}-CD4^{-}-CD8^{-}-DN$ -T-Zellen hemmen antigenspezifisch  $CD8^{+}$ -zytotoxische T-Zellen und könnten somit zu einer Hemmung der Immunantwort gegen Nierenzellkarzinome führen. Für diese Population regulatorischer T-Zellen zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Tumor- und Normalgewebe und der relative Anteil an der T-Zell-Population von 4% im Tumor- und 3,2% im Normalgewebe entspricht in etwa dem des peripheren Blutes.<sup>131</sup> Auch für diese Zellpopulation gilt jedoch, dass es spezifischerer Marker bedarf, da bisher nicht messbar ist wie groß der Anteil regulatorischer T-Zellen an der  $TCR\alpha\beta^{+}-CD3^{+}-CD4^{-}-CD8^{-}-DN$ -T-Zellpopulation ist und somit das hier vorgestellte Ergebnis nicht zwingend bedeutet, dass keine Suppression der Immunantwort zytotoxischer T-Zellen durch die gemessenen  $TCR\alpha\beta^{+}-CD3^{+}-CD4^{-}-CD8^{-}-DN$ -T-Zellen stattfindet. Daher sollte ihre eventuelle Bedeutung für die Immunologie des Nierenzellkarzinoms weiter untersucht

werden. Isoliert man beispielsweise  $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{-CD3}^+ \text{-CD4}^- \text{-CD8}^- \text{-DN-T-Zellen}$  mittels magnetischer Antikörper, oder der Sortierfunktion eines Durchflußzytometers, könnte man funktionelle Analysen der gewonnenen tumorinfiltrierenden Zellen durchführen und so mehr über ihre Biologie erfahren.

Neben der Identifikation regulatorisch wirkender Lymphozytenpopulationen wurde auch eine Analyse immuninhibitorischer Mechanismen vorgenommen, die von Tumorzellen ausgehen. Diegmann et al konnten in in-vitro Untersuchungen zeigen, dass Nierenzellkarzinomkulturen die Apoptose von T-Zellen induzieren können und dieser Mechanismus von der Interaktion ihres CD70-Rezeptors mit CD27 auf T-Zellen abhängig ist. Zudem konnten sie in einer vergleichenden Untersuchung von Nierenzellkarzinomgewebe und normalem Nierengewebe mittels Mikroarray und quantitativer PCR eine Überexpression von CD70 in den untersuchten Tumorgeweben zeigen.<sup>139</sup> Dies bestätigte sich bei elf der zwölf im Rahmen dieser Arbeit untersuchten klarzelligen Nierenzellkarzinome. Bei den beiden untersuchten Proben papillärer Nierenzellkarzinome zeigte sich dieser Unterschied nicht, eine Beobachtung die auch von Diegmann et al beschrieben wurde.<sup>140</sup> Das untersuchte Nierenbeckenkarzinom zeigte keine Mehrexpression von CD70 im Tumorgewebe. Diegmann et al beschrieben bei allen untersuchten klarzelligen Nierenzellkarzinomen eine gegenüber normalem Nierengewebe gesteigerte Expression von CD70, so dass es sich in der Zusammenschau der Ergebnisse als sehr sensibler Marker erweist, der auch therapeutischen Einsatz finden könnte. Mit CD70 konjugierte Antikörper könnten spezifisch an klarzellige Nierenzellkarzinomzellen binden und entweder über antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität oder beispielsweise als zytotoxisch wirkendes Radiokonjugat eine neue therapeutische Option für Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom darstellen. Die in vitro Funktionalität dieser Antikörper konnte bereits gezeigt werden und auch in vivo ist ihre Wirksamkeit am Tiermodell demonstriert worden.<sup>141</sup> Neben der Möglichkeit eines therapeutischen Einsatzes ist eine Verwendung von CD70-Antikörpern als Biomarker für klarzellige Nierenzellkarzinome denkbar, um die Differentialdiagnose zu erleichtern.

Für von Tumorzellen exprimiertes PD-L1 (B7-H1) und den korrespondierenden T-zellulären Rezeptor PD-1 konnte in Arbeiten von Thompson et al eine negative Korrelation von Prognose und Ausmaß ihrer Expression im Tumorgewebe gezeigt werden.<sup>142,143</sup> Eine relative Überexpression im Tumorgewebe im Vergleich zum normalen Nierengewebe wäre ein weiteres Indiz für eine Bedeutung dieses immunsuppressiven Mechanismus für die Immun-



evasion des primären Nierenzellkarzinoms. Der Vergleich der Expression von PD-L1 in Tumor- und Normalgewebe ergab bei sieben der zwölf untersuchten klarzelligen Nierenzellkarzinome eine deutliche Mehrexpression im Tumorgewebe, bei den verbleibenden fünf Patienten war die Expression nur leicht ( $>1$ fach bis  $<2$ -fach) gesteigert. Bei drei untersuchten Nierenzellkarzinomen vom papillären Typ war die Expression im Tumorgewebe relativ zum Normalgewebe vermindert. Thompson et al beschrieben in immunhistochemischen Untersuchungen bei zwei Drittel der 196 untersuchten Nierenzellkarzinome eine starke Expression von PD-L1, führten jedoch keinen Vergleich mit gesundem Nierengewebe durch.<sup>144</sup> Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Überexpression des PD-L1-Moleküls zeigte sich auch für dessen Interaktionspartner auf Seite der T-Zellen PD-1: Bei neun der zwölf untersuchten Tumor- und Normalgewebeproben klarzelliger Nierenzellkarzinome zeigte sich eine Überexpression von PD-1, bei den verbleibenden drei Patienten eine gegenüber dem Normalgewebe verminderte Expression. Die Blockade von PD1, PD-L1 oder beider Moleküle könnte ein Möglichkeit darstellen, eine Hemmung des Immunsystems im Nierenzellkarzinom aufzuheben. Hierzu sind bereits mehrere Untersuchungen am Tiermodell veröffentlicht worden. Li et al steigerten durch PD-L1-Blockade die Effizienz einer Vakzinierung gegen Prostatakarzinomzellen mit genmodifizierten Tumorzellen.<sup>145</sup> Auch für das Ovarialkarzinom konnten Curiel et al eine Steigerung der Effizienz einer Vakzinierung mit myeloiden dendritischen Zellen durch PD-L1-Blockade zeigen, so dass auch für Nierenzellkarzinompatienten eine Evaluation dieses Therapieansatzes erfolgen sollte.<sup>146</sup>

Da für dendritische Zellen zusätzlich zur Antigenpräsentation auch eine immuninhibitorische Funktion gezeigt werden konnte, wurde im Rahmen dieser Untersuchung der Versuch einer Charakterisierung tumorinfiltrierender dendritischer Zellen im primären Nierenzellkarzinom unternommen. Plasmazytoide Dendritische Zellen erwiesen sich in mehreren Untersuchungen als potentielle Vermittler einer Immuntoleranz gegenüber malignen Neoplasien. Ihre Infiltration in Kopf-Hals-Tumore und malignen Aszites konnte bereits demonstriert werden.<sup>147,148</sup> In einer immunhistochemischen Untersuchung von insgesamt 17 Nierenzellkarzinomen ließ sich in allen Gewebeproben eine Infiltration durch CD83-positive dendritische Zellen nachweisen, wobei 64,2% eine Positivität für das von aktivierten dendritischen Zellen exprimierte CD1a aufwiesen.<sup>149</sup> Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten durchflußzytometrischen Nachweise von Oberflächenmolekülen dendritischer Zellen waren sowohl für CD83 als auch für CD86 fast ausschließlich negativ und es ließen sich bei keinem Patienten klare Populationen abgrenzen, so dass die Beobachtungen von

Schwaab et al nicht bestätigt werden konnten. Auch plasmazytoide und myeloide dendritische Zellen ließen sich nur in einem kleinen Teil der untersuchten Proben nachweisen und keine der beiden Zellpopulationen wies eine relative Überrepräsentation im Tumorgewebe auf. Waren klare Populationen nachweisbar, hatten sie einen Anteil von 0,2%- 2%, was mit den von Hartmann et al für Kopf-Hals-Tumore beobachteten Frequenzen gut vereinbar ist.<sup>148</sup> Insgesamt sprechen die Ergebnisse dieser Untersuchung eher gegen eine ausgeprägte Bedeutung dendritischer Zellen im lokalen Tumormilieu primärer Nierenzellkarzinome, zumal für andere tolerogene Mechanismen deutlichere Hinweise gefunden wurden. Da die Antigenpräsentation überwiegend in sekundären lymphatischen Organen stattfindet, bedeuten die Ergebnisse jedoch keineswegs, dass keine Präsentation tumorassoziierter Antigene durch dendritische Zellen erfolgt. Eine genaue Untersuchung der zellulären Zusammensetzung der das Tumorareal drainierenden Lymphknoten könnte wichtige Erkenntnisse über das Ausmaß der Reaktion dendritischer Zellen auf Tumorantigene des primären Nierenzellkarzinoms liefern. Beispielsweise konnten Gerlini et al für das Mammakarzinom eine positive Korrelation des relativen Anteils plasmazytoider dendritischer Zellen in Sentinel-Lymphknoten mit der Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung zeigen.<sup>150</sup>

In der Zusammenschau der durchgeführten Messungen bezüglich immunsuppressiver Mechanismen beim primären Nierenzellkarzinom konnte sowohl für CD70 (Apoptose-induktion) als auch für PD-L1 (Co-Inhibition) eine Überexpression im Tumor nachgewiesen werden. Von den untersuchten regulatorischen T-Zellpopulationen zeigte sich für CD3<sup>+</sup>-CD4<sup>+</sup>-CD25<sup>high</sup>-T<sub>reg</sub> eine Überexpression ihres Markers FoxP3 im Tumorgewebe, wonach auch für sie ein Einfluss auf die Immunologie des Nierenzellkarzinoms anzunehmen ist. Für TCRαβ<sup>+</sup>-CD3<sup>+</sup>-CD4<sup>-</sup>-CD8<sup>-</sup>-DN-T-Zellen, PDC und MDC zeigte sich kein Unterschied zwischen Tumor- und Normalgewebe und diese Arbeit konnte daher kein quantitatives Indiz für ein Wirken dieser Zellpopulationen im primären Nierenzellkarzinom liefern. Für PD-1, den die Apoptose auf Seiten der Immuneffektorzellen vermittelnden Rezeptor von PD-L1 (B7-H1), konnte ebenfalls eine im Tumorgewebe gegenüber normalem Nierengewebe gesteigerte Expression gezeigt werden. Die Inhibition von CD70, B7-H1, PD1 und CD3<sup>+</sup>-CD4<sup>+</sup>-CD25<sup>high</sup>-T<sub>reg</sub> könnte eine Möglichkeit darstellen die Effizienz immunstimulatorischer Ansätze zu Therapie des primären Nierenzellkarzinoms zu steigern.

Neben der Antagonisierung immuninhibitorischer Mechanismen besteht die Möglichkeit des therapeutischen Einsatzes spezifischer Antikörper zur Induktion einer Immunantwort gegen

das Nierenzellkarzinom, wobei die Zielstruktur eine hohe Spezifität für Tumorzellen aufweisen muss, um Nebenwirkungen durch Zerstörung anderer dieses Protein exprimierender Gewebe zu vermeiden. Eine hohe Spezifität für klarzellige Nierenzellkarzinome weist das Protein Carboanhydrase IX (G250) auf. Uemura et al beschrieben eine Positivität von 99% der klarzelligen und 67% der nicht klarzelligen Nierenzellkarzinome. Außer im Nierenzellkarzinomgewebe wird G250 nur von Magenmukosa und großen Gallengängen exprimiert.<sup>151</sup> Von 12 in der vorliegenden Arbeit untersuchten klarzelligen Nierenzellkarzinomen zeigten, die Ergebnisse von Uemura et al bestätigend, elf eine Positivität für G250 in PCR- oder durchflußzytometrischer Analyse. Der G250-Antikörper wird bereits in klinischen Studien eingesetzt und zeigte in ersten Untersuchungen sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit IL-2 eine hohe Wirksamkeit. Auf die Monotherapie sprachen 10 von 36 und auf die kombinierte Therapie 8 von 36 Patienten an.<sup>105,106</sup> Durch den Einsatz eines G250-Radiokonjugates wurde zwar eine hohe lokale Anreicherung, jedoch kein therapeutischer Effekt erreicht.<sup>107</sup> In allen drei beschriebenen Studien zeigten sich nur geringe Nebenwirkungen, so dass der Einsatz G250-spezifischer Antikörper eine vielversprechende Option für zukünftige Untersuchungen zur Therapie des primären Nierenzellkarzinoms darstellt. Weitere von Nierenzellkarzinomen exprimierte Oberflächenmoleküle, die in dieser Arbeit untersucht wurden, CD70 und CD56, werden im Gegensatz zu G250 von etlichen anderen Zellpopulationen und Geweben exprimiert, so dass bei therapeutischem Einsatz von Antikörpern, die eine antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität induzieren, mit ausgeprägten Autoimmun-Reaktionen zu rechnen ist. Für CD56 konnte eine positive Korrelation mit Tumorgroße und Metastasierung gezeigt werden, so dass es zusätzlich als prognostischer Marker zum Einsatz kommen könnte.

Zur Evaluation neuer Therapiestrategien in vitro und zur detaillierten Analyse genetischer Veränderungen im primären Nierenzellkarzinom sind gut wachsende Tumorzellkulturen ein wichtiges Hilfsmittel. Ein Teil der aus Tumorgewebe gewonnenen Einzelzellsuspensionen wurde daher zur In-vitro-Kultivierung im Brutschrank inkubiert. Insgesamt kam es nur bei einem geringen Anteil der angesetzten Tumorzellkulturen zu einem Wachstum, so dass eine Optimierung der Kulturbedingungen angestrebt werden sollte. Beispielsweise durch Modifikation des Kulturmediums, Zusatz stimulierender Zytokine oder vorherige Isolation von Tumorzellen. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Kulturmedium RPMI-1640 gelang dennoch die Kultur zweier G250-positiver Tumorzelllinien, die auch positiv für HLA-I waren. HLA-I-Verluste ließen sich weder in den Zellkulturen, noch mittels Durchflußzytometrie von

primären Tumorzellen nachweisen. Der Verlust ihrer Antigenpräsentation auf HLA-I ist ein wichtiger Mechanismus der Immunevasion von Karzinomen. Kitamura et al zeigten durch semiquantitative Auswertungen immunhistochemischer Färbungen eine negative Korrelation von HLA-I-Minderexpression und Prognose des primären Nierenzellkarzinoms.<sup>90</sup> In einer ebenfalls auf immunhistochemischen Färbungen basierenden Studie konnten Atkins et al eine HLA-I-Minderexpression bei 5% der klarzelligen, 18% der papillären und 22% der chromophoben Nierenzellkarzinome nachweisen, und damit eine mögliche Erklärung für die auch in dieser Arbeit beobachtete im Vergleich zu klarzelligen Nierenzellkarzinomen geringeren Immunogenität papillärer Nierenzellkarzinome liefern.<sup>152</sup> Die in der vorliegenden Arbeit angestrebte durchflußzytometrische Analyse der HLA-I Expression im Tumorgewebe gelang aufgrund fehlender Abgrenzbarkeit der Tumorzellen nicht, wobei der Einsatz einer Mehrfachfärbung mit G250 als Tumorzellmarker bessere Ergebnisse liefern könnte.

## 5 Zusammenfassende Darstellung

In Deutschland erkranken jährlich etwa 14000 Menschen an primären Nierenzellkarzinomen, wobei Männer etwa zweimal häufiger betroffen sind als Frauen.<sup>4</sup> Die Prognose des Nierenzellkarzinoms hängt entscheidend vom Tumorstadium zum Diagnosezeitpunkt ab: Im Gegensatz zur guten Prognose des lokalisierten Nierenzellkarzinoms ist die Prognose im metastasierten Stadium schlecht und es überleben nur 9% der Patienten länger als fünf Jahre.<sup>1</sup> Aufgrund der unspezifischen und meist erst im fortgeschrittenen Stadium auftretenden Symptome wird die Erkrankung zudem bei 21% der Patienten erst im metastasierten Stadium erkannt.<sup>1</sup> Die therapeutischen Optionen für Patienten, bei denen es zu einer Metastasierung der Erkrankung gekommen ist, sind gering, da das Nierenzellkarzinom eine weitgehende Zytostatikaresistenz aufweist und auch andere Therapieverfahren bisher nur begrenzt erfolgreich sind.<sup>49</sup> Neue Substanzen, wie die Multi-Tyrosinkinaseinhibitoren Sunitinib und Sorafenib, haben zu einer signifikanten Zunahme von objektiven Remissionen und einer Verlängerung der mittleren Überlebenszeit geführt und sind für die Behandlung des metastasierten Nierenzellkarzinoms zugelassen.<sup>58,59</sup>

Ein weiterer Ansatzpunkt für therapeutische Überlegungen ist eine bei etwa 1% der betroffenen Patienten beobachtete Besonderheit der Tumorbilogie des primären Nierenzellkarzinoms, das Auftreten von Spontanremissionen. Eine Erklärung für dieses Phänomen bietet die von Burnet und Thomas formulierte Immunüberwachungshypothese, nach der alle Zellen des humanen Organismus einer kontinuierlichen Überwachung durch das Immunsystem unterliegen, das maligne Zellen erkennt und zerstört.<sup>85</sup> Dieser Erklärungsansatz lieferte die Grundlage für Therapien, die eine künstliche Verstärkung oder Initiierung einer Immunantwort gegen das Nierenzellkarzinom erzeugen sollten. Durch Einsatz der immunstimulatorischen Zytokine Interleukin-2 und Interferon- $\alpha$ ,<sup>100</sup> tumorspezifischer Antikörper,<sup>105</sup> sowie von Vakzinierungsverfahren,<sup>116</sup> adoptivem Zelltransfer<sup>122</sup> und allogener Stammzelltransplantation<sup>125</sup> konnten begrenzte therapeutische Erfolge erzielt werden konnten, es sprach aber meist nur ein geringer Teil der Patienten auf diese Therapien an.

Diese Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis der immunologischen Vorgänge beim primären Nierenzellkarzinom leisten, indem sie das Immuneffektorzellinfiltrat und mögliche Mechanismen der Immunevasion mittels durchflußzytometrischer und immunhistochemischer Untersuchungen, sowie durch Genexpressionsanalysen untersucht. Hierzu wurden unmittelbar nach der Operation aus Nephrektomiepräparaten von insgesamt 29 Patienten Gewebeproben

aus dem Bereich des Tumors und aus einem normalen, weit vom Tumor entfernten Bereich der Niere entnommen. Das gesunde Nierengewebe diente als Kontrollgewebe, um nieren-spezifische von tumorspezifischen Befunden zu unterscheiden. Bisherige Untersuchungen, die dieser Fragestellung nachgingen, bezogen sich auf peripheres Blut als Referenz, oder untersuchten Korrelationen der Prognose mit Immuneffektorzellinfiltration, Infiltration regulatorischer Lymphozyten oder mit Mechanismen der Immunevasion. Zusätzlich zur ex-vivo Charakterisierung der Immunologie des Nierenzellkarzinoms wurde in dieser Arbeit eine Etablierung von Nierenzellkarzinomlinien und eine Expansion tumorinfiltrierender Lymphozyten erreicht.

Die durchflußzytometrische Analyse der lymphozytären Infiltrate in Tumor- und Normalgewebe gelang bei fünfzehn Patienten und zeigte eine im vom Tumor befallenen Bereich der Niere deutlich ausgeprägtere Infiltration durch aktivierte zytotoxische T-Zellen. Der relative Anteil CD8-positiver T-Zellen an der T-Zell-Population war im Tumorgewebe höher als im normalen Nierengewebe (51,8%( ±14,35%) vs. 40,7%( ± 8,8%); p=0,018), während der relative Anteil CD4-positiver T-Zellen sich als im Tumorgewebe gegenüber normalem Nierengewebe vermindert erwies (34,5%( ±13%) vs. 47,3%( ±9,8%); p=0,005). Tumordinfiltrierende Lymphozyten erwiesen sich zudem anhand von Messungen des Aktivierungsmarkers CD69 als deutlich stärker aktiviert (70,4%( ±22,1%) vs. 44,8%( ±15,8%); p=0,002). Sowohl im Tumorgewebe als auch im normalen Nierengewebe wiesen mehr als 80% der T-Zellen einen T-Effektorzell-Phänotyp mit geringer Expression von CD45RA und CCR7 auf. Die durchgeführten TCR-Vβ-Spektrumtypisierungen ergaben ein überwiegend oligoklonales Infiltrat ohne Bevorzugung bestimmter TCR-Vβ-Familien.

Obwohl die im Tumorgewebe vorherrschenden CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen Tumorzellen, die spezifische Antigene auf HLA-I-Molekülen präsentieren, durch Wirkung von Perforin und Granzyme-B lysieren können, kam es bei den untersuchten Patienten zur Entstehung eines Nierenzellkarzinoms. Eine Immunevasion der Tumorzellen könnte diese Beobachtung erklären. Es wurde eine Reihe von Mechanismen beschrieben, mit denen Tumorzellen einer Erkennung durch das Immunsystem entgehen. Eine Möglichkeit besteht in der Infiltration des Tumors durch regulatorische T-Zellen, die hemmend auf andere Zellen des Immunsystems wirken. Für CD3<sup>+</sup>,CD4<sup>+</sup>,CD25<sup>high</sup>-T<sub>Reg</sub> konnte eine negative Korrelation von Ausmaß ihrer Infiltration ins Tumorgewebe und Prognose gezeigt werden.<sup>97</sup> Während eine durchflußzytometrische Identifikation dieser Zellpopulation sich aufgrund der geringen

Spezifität von CD25 als schwierig erwies, zeigte die quantitative PCR-Analyse der spezifischeren FoxP3-Expression eine im Tumorgewebe relativ zum normalen Nierengewebe deutliche Mehrexpression bei neun der dreizehn untersuchten Patienten. Für die zweite im Rahmen dieser Arbeit untersuchte regulatorische Lymphozytenpopulation, TCR $\alpha\beta^+$ , CD3 $^+$ , CD4 $^-$ , CD8 $^-$ -DN-T-Zellen, ergab sich keine Überrepräsentation im Tumorgewebe.

Eine weitere hier untersuchte Möglichkeit der Immunevasion besteht in der Expression immuninhibitorischer Oberflächenmoleküle durch Tumorzellen. Für die Apoptose aktivierter T-Zellen induzierende CD70 konnte durch quantitative PCR-Analyse bei elf der zwölf untersuchten Patienten eine im Tumorgewebe relativ zum Normalgewebe gesteigerte Expression nachgewiesen werden, eine Beobachtung, die auch Diegmann et al in einer 2005 veröffentlichten Untersuchung beschrieben.<sup>139</sup> Ein anderer eine Anergie von T-Zellen induzierender Mechanismus wird durch Interaktion von B7-H1 auf Tumorzellen mit PD-1 auf T-Zellen vermittelt. Die Expression von B7-H1 erwies sich als bei sieben von zwölf Patienten im Tumorgewebe relativ zum normalen Nierengewebe deutlich und bei den verbleibenden fünf schwach gesteigert. Auch die Expression von PD-1 war bei neun von zwölf untersuchten Patienten im Tumorgewebe stärker ausgeprägt als im Normalgewebe. Eine im Tumorgewebe im Vergleich zum gesunden Nierengewebe gesteigerte Expression dieser Oberflächenmoleküle wurde bisher nicht nachgewiesen. Für B7-H1 und PD-1 konnte durch Thompson et al eine negative Korrelation von Ausmaß ihrer Expression im Tumorgewebe und Prognose gezeigt werden.<sup>142,143</sup> Eine ebenfalls untersuchte Infiltration des Tumorgewebes durch immuninhibitorische plasmazytoide dendritische Zellen, für die eine negative Korrelation mit der Prognose von Kopf-Hals-Tumoren nachgewiesen wurde, zeigte sich nur vereinzelt und es ließ sich keine bevorzugte Infiltration des Tumorgewebes darstellen. Zusammenfassend erwiesen sich CD3 $^+$ , CD4 $^+$ , CD25<sup>high</sup>-T<sub>Reg</sub>, CD70, B7-H1 und PD-1 als im Tumorgewebe relativ zum normalen Nierengewebe überrepräsentiert und es konnte somit in dieser Arbeit nicht nur eine Infiltration des Tumorgewebes durch aktivierte zytotoxische T-Zellen gezeigt werden, sondern es wurden auch Hinweise auf Mechanismen der Immunevasion gefunden, deren gezielte Hemmung zur Induktion einer Immunantwort gegen das Nierenzellkarzinom führen könnte und einen wichtigen neuen Therapieansatz für Patienten mit metastasierten Nierenzellkarzinomen darstellt.

## 6 Referenzen

1. Ries LAG, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2003. Web . 1-11-2005.
2. Greenlee,R.T., Hill-Harmon,M.B., Murray,T. & Thun,M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J. Clin.* **51**, 15-36 (2001).
3. Vogelzang,N.J. & Stadler,W.M. Kidney cancer. *Lancet* **352**, 1691-1696 (1998).
4. Krebs in Deutschland Häufigkeiten und Trends. (5). 1-1-2006. Saarbrücken.
5. Marshall,F.F., Stewart,A.K. & Menck,H.R. The National Cancer Data Base: report on kidney cancers. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. *Cancer* **80**, 2167-2174 (1997).
6. Pesch,B. *et al.* Occupational risk factors for renal cell carcinoma: agent-specific results from a case-control study in Germany. MURC Study Group. Multicenter urothelial and renal cancer study. *Int. J. Epidemiol.* **29**, 1014-1024 (2000).
7. Storkel,S. *et al.* Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* **80**, 987-989 (1997).
8. Linehan,W.M., Walther,M.M. & Zbar,B. The genetic basis of cancer of the kidney. *J. Urol.* **170**, 2163-2172 (2003).
9. Cohen,H.T. & McGovern,F.J. Renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **353**, 2477-2490 (2005).
10. FLOCKS,R.H. & KADESKY,M.C. Malignant neoplasms of the kidney: an analysis of 353 patients followed five years or more. *Trans. Am. Assoc. Genitourin. Surg.* **49**, 105-110 (1957).
11. Guinan,P. *et al.* TNM staging of renal cell carcinoma: Workgroup No. 3. Union International Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* **80**, 992-993 (1997).
12. Pantuck,A.J., Zisman,A. & Belldgrun,A.S. The changing natural history of renal cell carcinoma. *J. Urol.* **166**, 1611-1623 (2001).
13. Lam,J.S., Shvarts,O., Leppert,J.T., Figlin,R.A. & Belldgrun,A.S. Renal cell carcinoma 2005: new frontiers in staging, prognostication and targeted molecular therapy. *J. Urol.* **173**, 1853-1862 (2005).
14. Amin,M.B. *et al.* Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms: an experience of 405 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* **26**, 281-291 (2002).
15. Cheville,J.C., Lohse,C.M., Zincke,H., Weaver,A.L. & Blute,M.L. Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **27**, 612-624 (2003).
16. Gudbjartsson,T. *et al.* Histological subtyping and nuclear grading of renal cell carcinoma and their implications for survival: a retrospective nation-wide study of 629 patients. *Eur. Urol.* **48**, 593-600 (2005).
17. Moch,H. *et al.* Prognostic utility of the recently recommended histologic classification and revised TNM staging system of renal cell carcinoma: a Swiss experience with 588 tumors. *Cancer* **89**, 604-614 (2000).



18. Patard,J.J. *et al.* Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinoma: a multicenter experience. *J. Clin. Oncol.* **23**, 2763-2771 (2005).
19. Tsui,K.H. *et al.* Prognostic indicators for renal cell carcinoma: a multivariate analysis of 643 patients using the revised 1997 TNM staging criteria. *J. Urol.* **163**, 1090-1095 (2000).
20. Kinouchi,T. *et al.* Impact of tumor size on the clinical outcomes of patients with Robson State I renal cell carcinoma. *Cancer* **85**, 689-695 (1999).
21. Gilbert,S.M. *et al.* Reevaluation of TNM staging of renal cortical tumors: recurrence and survival for T1N0M0 and T3aN0M0 tumors are equivalent. *Urology* **68**, 287-291 (2006).
22. Skinner,D.G., Colvin,R.B., Vermillion,C.D., Pfister,R.C. & Leadbetter,W.F. Diagnosis and management of renal cell carcinoma. A clinical and pathologic study of 309 cases. *Cancer* **28**, 1165-1177 (1971).
23. Motzer,R.J. *et al.* Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **17**, 2530-2540 (1999).
24. Javidan,J. *et al.* Prognostic significance of the 1997 TNM classification of renal cell carcinoma. *J. Urol.* **162**, 1277-1281 (1999).
25. Claassen, Diehl & Kochsiek. *Innere Medizin*. 5. 2004. Springer Verlag.
26. Jayson,M. & Sanders,H. Increased incidence of serendipitously discovered renal cell carcinoma. *Urology* **51**, 203-205 (1998).
27. Ebert,T., Schnell,D. & Weissbach,L. Lymphknotendisektion beim Nierenzellkarzinom. *Urologe A* **44**, 635-637 (2005).
28. Drucker,B.J. Renal cell carcinoma: current status and future prospects. *Cancer Treat. Rev.* **31**, 536-545 (2005).
29. Huang,W.C. *et al.* Chronic kidney disease after nephrectomy in patients with renal cortical tumours: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol.* **7**, 735-740 (2006).
30. Stiles,K.P., Moffatt,M.J., Agodoa,L.Y., Swanson,S.J. & Abbott,K.C. Renal cell carcinoma as a cause of end-stage renal disease in the United States: patient characteristics and survival. *Kidney Int.* **64**, 247-253 (2003).
31. Lau,W.K., Blute,M.L., Weaver,A.L., Torres,V.E. & Zincke,H. Matched comparison of radical nephrectomy vs nephron-sparing surgery in patients with unilateral renal cell carcinoma and a normal contralateral kidney. *Mayo Clin. Proc.* **75**, 1236-1242 (2000).
32. Patard,J.J. *et al.* Safety and efficacy of partial nephrectomy for all T1 tumors based on an international multicenter experience. *J. Urol.* **171**, 2181-5, quiz (2004).
33. Becker,F. *et al.* Elective nephron sparing surgery should become standard treatment for small unilateral renal cell carcinoma: Long-term survival data of 216 patients. *Eur. Urol.* **49**, 308-313 (2006).
34. Filipas,D. *et al.* Nephron-sparing surgery of renal cell carcinoma with a normal opposite kidney: long-term outcome in 180 patients. *Urology* **56**, 387-392 (2000).
35. Leibovich,B.C. *et al.* Nephron sparing surgery for appropriately selected renal cell carcinoma between 4 and 7 cm results in outcome similar to radical nephrectomy. *J. Urol.* **171**, 1066-1070 (2004).
36. Miller,D.C., Hollingsworth,J.M., Hafez,K.S., Daignault,S. & Hollenbeck,B.K. Partial nephrectomy for small renal masses: an emerging quality of care concern? *J. Urol.* **175**, 853-857 (2006).

37. Hollenbeck,B.K., Taub,D.A., Miller,D.C., Dunn,R.L. & Wei,J.T. National utilization trends of partial nephrectomy for renal cell carcinoma: a case of underutilization? *Urology* **67**, 254-259 (2006).
38. Parsons,J.K. *et al.* Complications of abdominal urologic laparoscopy: longitudinal five-year analysis. *Urology* **63**, 27-32 (2004).
39. Ono,Y. *et al.* Laparoscopic radical nephrectomy for renal cell carcinoma: the standard of care already? *Curr. Opin. Urol.* **15**, 75-78 (2005).
40. Dunn,M.D. *et al.* Laparoscopic versus open radical nephrectomy: a 9-year experience. *J. Urol.* **164**, 1153-1159 (2000).
41. Schwartz,B.F. *et al.* Cryoablation of small peripheral renal masses: a retrospective analysis. *Urology* **68**, 14-18 (2006).
42. Hegarty,N.J. *et al.* Probe-ablative nephron-sparing surgery: cryoablation versus radiofrequency ablation. *Urology* **68**, 7-13 (2006).
43. Kennedy,J.E. High-intensity focused ultrasound in the treatment of solid tumours. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 321-327 (2005).
44. Oakley,N.E., Hegarty,N.J., McNeill,A. & Gill,I.S. Minimally invasive nephron-sparing surgery for renal cell cancer. *BJU. Int.* **98**, 278-284 (2006).
45. Marberger,M., Schatzl,G., Cranston,D. & Kennedy,J.E. Extracorporeal ablation of renal tumours with high-intensity focused ultrasound. *BJU. Int.* **95 Suppl 2**, 52-55 (2005).
46. Wotkowicz,C., Libertino,J.A., Sorcini,A. & Mourtzinou,A. Management of renal cell carcinoma with vena cava and atrial thrombus: minimal access vs median sternotomy with circulatory arrest. *BJU. Int.* **98**, 289-297 (2006).
47. Flanigan,R.C. *et al.* Cytoreductive nephrectomy in patients with metastatic renal cancer: a combined analysis. *J. Urol.* **171**, 1071-1076 (2004).
48. Sengupta,S., Leibovich,B.C., Blute,M.L. & Zincke,H. Surgery for metastatic renal cell cancer. *World J. Urol.* **23**, 155-160 (2005).
49. Amato,R.J. Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Semin. Oncol.* **27**, 177-186 (2000).
50. Motzer,R.J. & Russo,P. Systemic therapy for renal cell carcinoma. *J. Urol.* **163**, 408-417 (2000).
51. Hrushesky,W.J., von Roemeling,R., Lanning,R.M. & Rabatin,J.T. Circadian-shaped infusions of floxuridine for progressive metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **8**, 1504-1513 (1990).
52. Waters,J.S. *et al.* Phase II clinical trial of capecitabine and gemcitabine chemotherapy in patients with metastatic renal carcinoma. *Br. J. Cancer* **91**, 1763-1768 (2004).
53. Gottesman,M.M., Fojo,T. & Bates,S.E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 48-58 (2002).
54. Ferguson,R.E. *et al.* Intrinsic chemotherapy resistance to the tubulin-binding antimitotic agents in renal cell carcinoma. *Int. J. Cancer* **115**, 155-163 (2005).
55. Faivre,S., Djelloul,S. & Raymond,E. New paradigms in anticancer therapy: targeting multiple signaling pathways with kinase inhibitors. *Semin. Oncol.* **33**, 407-420 (2006).
56. Hahn,W.C. & Weinberg,R.A. Rules for making human tumor cells. *N. Engl. J. Med.* **347**, 1593-1603 (2002).

57. Patel,P.H., Chaganti,R.S. & Motzer,R.J. Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Br. J. Cancer* **94**, 614-619 (2006).
58. Gollob,J.A., Wilhelm,S., Carter,C. & Kelley,S.L. Role of Raf kinase in cancer: therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction pathway. *Semin. Oncol.* **33**, 392-406 (2006).
59. Motzer,R.J. *et al.* Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *JAMA* **295**, 2516-2524 (2006).
60. Ratain,M.J. *et al.* Phase II placebo-controlled randomized discontinuation trial of sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **24**, 2505-2512 (2006).
61. Dawson,N.A. *et al.* A phase II trial of gefitinib (Iressa, ZD1839) in stage IV and recurrent renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **10**, 7812-7819 (2004).
62. Jermann,M. *et al.* A phase II, open-label study of gefitinib (IRESSA) in patients with locally advanced, metastatic, or relapsed renal-cell carcinoma. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **57**, 533-539 (2006).
63. Hainsworth,J.D. *et al.* Treatment of metastatic renal cell carcinoma with a combination of bevacizumab and erlotinib. *J. Clin. Oncol.* **23**, 7889-7896 (2005).
64. Zamai,L. *et al.* NK cells and cancer. *J. Immunol.* **178**, 4011-4016 (2007).
65. Janeway,C., Travers,P., Walport,M. & Shlomchik,M. Immunologie. Beginnen, K, Seidler, L, and Haüßer-Stiller, I. 5. 2002. Berlin.
66. Ehrlich,P. Über den aktuellen Stand der Karzinomforschung. 1908. Quelle: [www.pei.de](http://www.pei.de) 2007.
67. Ehrlich,P. Experimentelle Karzinomstudien an Mäusen. Arbeiten aus dem königlichen Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a.M.: 75-102 . 1906.
68. Dunn,G.P., Bruce,A.T., Ikeda,H., Old,L.J. & Schreiber,R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **3**, 991-998 (2002).
69. Smyth,M.J., Godfrey,D.I. & Trapani,J.A. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat. Immunol.* **2**, 293-299 (2001).
70. Shankaran,V. *et al.* IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107-1111 (2001).
71. Kaplan,D.H. *et al.* Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 7556-7561 (1998).
72. Hollenbeak,C.S. *et al.* Increased incidence of melanoma in renal transplantation recipients. *Cancer* **104**, 1962-1967 (2005).
73. Ghelani,D., Saliba,R. & Lima,M. Secondary malignancies after hematopoietic stem cell transplantation. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* **56**, 115-126 (2005).
74. Ippoliti,G., Rinaldi,M., Pellegrini,C. & Vigano,M. Incidence of cancer after immunosuppressive treatment for heart transplantation. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* **56**, 101-113 (2005).
75. Vallejo,G.H., Romero,C.J. & de Vicente,J.C. Incidence and risk factors for cancer after liver transplantation. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* **56**, 87-99 (2005).
76. Eisenthal,A. *et al.* Expression of dendritic cells in ovarian tumors correlates with clinical outcome in patients with ovarian cancer. *Hum. Pathol.* **32**, 803-807 (2001).

77. Sato,E. *et al.* Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 18538-18543 (2005).
78. Fukunaga,A. *et al.* CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* **28**, e26-e31 (2004).
79. Oshikiri,T. *et al.* Prognostic value of intratumoral CD8+ T lymphocyte in extrahepatic bile duct carcinoma as essential immune response. *J. Surg. Oncol.* **84**, 224-228 (2003).
80. Parker,C. *et al.* The prognostic significance of the tumour infiltrating lymphocyte count in stage I testicular seminoma managed by surveillance. *Eur. J. Cancer* **38**, 2014-2019 (2002).
81. Schumacher,K., Haensch,W., Roefzaad,C. & Schlag,P.M. Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res.* **61**, 3932-3936 (2001).
82. Nakano,O. *et al.* Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res.* **61**, 5132-5136 (2001).
83. Lipponen,P.K., Eskelinen,M.J., Jauhiainen,K., Harju,E. & Terho,R. Tumour infiltrating lymphocytes as an independent prognostic factor in transitional cell bladder cancer. *Eur. J. Cancer* **29A**, 69-75 (1992).
84. Galon,J. *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* **313**, 1960-1964 (2006).
85. Zitvogel,L., Tesniere,A. & Kroemer,G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 715-727 (2006).
86. Gabrilovich,D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 941-952 (2004).
87. Kim,R., Emi,M. & Tanabe,K. Cancer immunosuppression and autoimmune disease: beyond immunosuppressive networks for tumour immunity. *Immunology* **119**, 254-264 (2006).
88. Diegmann,J. *et al.* Immune escape for renal cell carcinoma: CD70 mediates apoptosis in lymphocytes. *Neoplasia*. **8**, 933-938 (2006).
89. Munn,D.H. & Mellor,A.L. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J. Clin. Invest* **117**, 1147-1154 (2007).
90. Kitamura,H. *et al.* Down-regulation of HLA class I antigen is an independent prognostic factor for clear cell renal cell carcinoma. *J. Urol.* **177**, 1269-1272 (2007).
91. Seliger,B. *et al.* Characterization of human lymphocyte antigen class I antigen-processing machinery defects in renal cell carcinoma lesions with special emphasis on transporter-associated with antigen-processing down-regulation. *Clin. Cancer Res.* **9**, 1721-1727 (2003).
92. Bui,J.D., Uppaluri,R., Hsieh,C.S. & Schreiber,R.D. Comparative analysis of regulatory and effector T cells in progressively growing versus rejecting tumors of similar origins. *Cancer Res.* **66**, 7301-7309 (2006).
93. Thomson,C.W., Lee,B.P. & Zhang,L. Double-negative regulatory T cells: non-conventional regulators. *Immunol. Res.* **35**, 163-178 (2006).
94. Bellone,G. *et al.* Cooperative induction of a tolerogenic dendritic cell phenotype by cytokines secreted by pancreatic carcinoma cells. *J. Immunol.* **177**, 3448-3460 (2006).

95. Curiel,T.J. *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* **10**, 942-949 (2004).
96. Siddiqui,S.A. *et al.* Tumor-infiltrating Foxp3-CD4+CD25+ T cells predict poor survival in renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **13**, 2075-2081 (2007).
97. Griffiths,R.W. *et al.* Frequency of regulatory T cells in renal cell carcinoma patients and investigation of correlation with survival. *Cancer Immunol. Immunother.* **56**, 1743-1753 (2007).
98. Fischer,K. *et al.* Inhibitory effect of tumor cell derived lactic acid on human T cells. *Blood* (2007).
99. Gottfried,E. *et al.* Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood* **107**, 2013-2021 (2006).
100. Coppin,C. *et al.* Immunotherapy for advanced renal cell cancer. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* CD001425 (2005).
101. Atzpodiën,J. *et al.* Interleukin-2 in combination with interferon-alpha and 5-fluorouracil for metastatic renal cell cancer. *Eur. J. Cancer* **29A Suppl 5**, S6-S8 (1993).
102. van Herpen,C.M. *et al.* Immunochemotherapy with interleukin-2, interferon-alpha and 5-fluorouracil for progressive metastatic renal cell carcinoma: a multicenter phase II study. Dutch Immunotherapy Working Party. *Br. J. Cancer* **82**, 772-776 (2000).
103. Aass,N. *et al.* Randomized phase II/III trial of interferon Alfa-2a with and without 13-cis-retinoic acid in patients with progressive metastatic renal cell Carcinoma: the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Genito-Urinary Tract Cancer Group (EORTC 30951). *J. Clin. Oncol.* **23**, 4172-4178 (2005).
104. Motzer,R.J. *et al.* Phase III trial of interferon alfa-2a with or without 13-cis-retinoic acid for patients with advanced renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **18**, 2972-2980 (2000).
105. Bleumer,I. *et al.* A phase II trial of chimeric monoclonal antibody G250 for advanced renal cell carcinoma patients. *Br. J. Cancer* **90**, 985-990 (2004).
106. Bleumer,I. *et al.* A clinical trial with chimeric monoclonal antibody WX-G250 and low dose interleukin-2 pulsing scheme for advanced renal cell carcinoma. *J. Urol.* **175**, 57-62 (2006).
107. Brouwers,A.H. *et al.* Lack of efficacy of two consecutive treatments of radioimmunotherapy with 131I-cG250 in patients with metastasized clear cell renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **23**, 6540-6548 (2005).
108. Oosterwijk,E., Divgi,C. & Bander,N.H. Active and passive immunotherapy: vaccines and antibodies. *BJU. Int.* **99**, 1301-1304 (2007).
109. Kubler,H. & Vieweg,J. Vaccines in renal cell carcinoma. *Semin. Oncol.* **33**, 614-624 (2006).
110. Repmann,R., Goldschmidt,A.J. & Richter,A. Adjuvant therapy of renal cell carcinoma patients with an autologous tumor cell lysate vaccine: a 5-year follow-up analysis. *Anticancer Res.* **23**, 969-974 (2003).
111. Jocham,D. *et al.* Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: phase III, randomised controlled trial. *Lancet* **363**, 594-599 (2004).
112. Pizza,G. *et al.* Allogeneic gene-modified tumour cells in metastatic kidney cancer. Report II. *Folia Biol. (Praha)* **50**, 175-183 (2004).

113. Shimizu,K. *et al.* Induction of antigen specific cellular immunity by vaccination with peptides from MN/CA IX in renal cell carcinoma. *Oncol. Rep.* **10**, 1307-1311 (2003).
114. Uemura,H. *et al.* A phase I trial of vaccination of CA9-derived peptides for HLA-A24-positive patients with cytokine-refractory metastatic renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **12**, 1768-1775 (2006).
115. Golzio,M., Rols,M.P. & Teissie,J. In vitro and in vivo electric field-mediated permeabilization, gene transfer, and expression. *Methods* **33**, 126-135 (2004).
116. Berntsen,A., Geertsen,P.F. & Svane,I.M. Therapeutic dendritic cell vaccination of patients with renal cell carcinoma. *Eur. Urol.* **50**, 34-43 (2006).
117. Holtl,L. *et al.* Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin. Cancer Res.* **8**, 3369-3376 (2002).
118. Wierecky,J. *et al.* Immunologic and clinical responses after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells in metastatic renal cancer patients. *Cancer Res.* **66**, 5910-5918 (2006).
119. Thompson,J.A., Figlin,R.A., Sifri-Steele,C., Berenson,R.J. & Frohlich,M.W. A phase I trial of CD3/CD28-activated T cells (Xcellerated T cells) and interleukin-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **9**, 3562-3570 (2003).
120. Chang,A.E. *et al.* Phase II trial of autologous tumor vaccination, anti-CD3-activated vaccine-primed lymphocytes, and interleukin-2 in stage IV renal cell cancer. *J. Clin. Oncol.* **21**, 884-890 (2003).
121. Figlin,R.A. *et al.* Treatment of metastatic renal cell carcinoma with nephrectomy, interleukin-2 and cytokine-primed or CD8(+) selected tumor infiltrating lymphocytes from primary tumor. *J. Urol.* **158**, 740-745 (1997).
122. Figlin,R.A. *et al.* Multicenter, randomized, phase III trial of CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes in combination with recombinant interleukin-2 in metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **17**, 2521-2529 (1999).
123. Gommersall,L. *et al.* Allogeneic stem-cell transplantation for renal-cell cancer. *Lancet Oncol.* **5**, 561-567 (2004).
124. Childs,R. *et al.* Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* **343**, 750-758 (2000).
125. Barkholt,L. *et al.* Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for metastatic renal carcinoma in Europe. *Ann. Oncol.* **17**, 1134-1140 (2006).
126. Ronsin,C. *et al.* A non-AUG-defined alternative open reading frame of the intestinal carboxyl esterase mRNA generates an epitope recognized by renal cell carcinoma-reactive tumor-infiltrating lymphocytes in situ. *J. Immunol.* **163**, 483-490 (1999).
127. Hercend,T. *et al.* Identification of a clonally restricted 90 kD heterodimer on two human cloned natural killer cell lines. Its role in cytotoxic effector function. *J. Exp. Med.* **158**, 1547-1560 (1983).
128. Kurokawa,T., Oelke,M. & Mackensen,A. Induction and clonal expansion of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes from renal cell carcinoma patients after stimulation with autologous dendritic cells loaded with tumor cells. *Int. J. Cancer* **91**, 749-756 (2001).
129. Trainingshandbuch BD. 2006.
130. Bortz & Lienert. Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung. Springer, Berlin (2002).

131. Fischer,K. *et al.* Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8-double-negative regulatory T cells. *Blood* **105**, 2828-2835 (2005).
132. Blank,C. *et al.* Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro. *Int. J. Cancer* **119**, 317-327 (2006).
133. Daniel,L. *et al.* Neural cell adhesion molecule expression in renal cell carcinomas: relation to metastatic behavior. *Hum. Pathol.* **34**, 528-532 (2003).
134. Bromwich,E.J. *et al.* The relationship between T-lymphocyte infiltration, stage, tumour grade and survival in patients undergoing curative surgery for renal cell cancer. *Br. J. Cancer* **89**, 1906-1908 (2003).
135. Webster,W.S. *et al.* Mononuclear cell infiltration in clear-cell renal cell carcinoma independently predicts patient survival. *Cancer* **107**, 46-53 (2006).
136. Cozar,J.M. *et al.* Analysis of NK cells and chemokine receptors in tumor infiltrating CD4 T lymphocytes in human renal carcinomas. *Cancer Immunol. Immunother.* **54**, 858-866 (2005).
137. Gaudin,C. *et al.* In vivo local expansion of clonal T cell subpopulations in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **55**, 685-690 (1995).
138. Dannull,J. *et al.* Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J. Clin. Invest* **115**, 3623-3633 (2005).
139. Diegmann,J. *et al.* Identification of CD70 as a diagnostic biomarker for clear cell renal cell carcinoma by gene expression profiling, real-time RT-PCR and immunohistochemistry. *Eur. J. Cancer* **41**, 1794-1801 (2005).
140. Diegmann,J. *et al.* Comparative transcriptional and functional profiling of clear cell and papillary renal cell carcinoma. *Int. J. Mol. Med.* **18**, 395-403 (2006).
141. Adam,P.J. *et al.* CD70 (TNFSF7) is expressed at high prevalence in renal cell carcinomas and is rapidly internalised on antibody binding. *Br. J. Cancer* **95**, 298-306 (2006).
142. Thompson,R.H. *et al.* PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **13**, 1757-1761 (2007).
143. Thompson,R.H. *et al.* Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res.* **66**, 3381-3385 (2006).
144. Thompson,R.H. *et al.* B7-H1 glycoprotein blockade: a novel strategy to enhance immunotherapy in patients with renal cell carcinoma. *Urology* **66**, 10-14 (2005).
145. Li,N. *et al.* Potent systemic antitumor immunity induced by vaccination with chemotactic-prostate tumor associated antigen gene-modified tumor cell and blockade of B7-H1. *J. Clin. Immunol.* **27**, 117-130 (2007).
146. Curiel,T.J. *et al.* Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat. Med.* **9**, 562-567 (2003).
147. Zou,W. *et al.* Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat. Med.* **7**, 1339-1346 (2001).
148. Hartmann,E. *et al.* Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res.* **63**, 6478-6487 (2003).

149. Schwaab,T. *et al.* In vivo description of dendritic cells in human renal cell carcinoma. *J. Urol.* **162**, 567-573 (1999).
150. Gerlini,G. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells represent a major dendritic cell subset in sentinel lymph nodes of melanoma patients and accumulate in metastatic nodes. *Clin. Immunol.* (2007).
151. Uemura,H. *et al.* MN/CA IX/G250 as a potential target for immunotherapy of renal cell carcinomas. *Br. J. Cancer* **81**, 741-746 (1999).
152. Atkins,D., Ferrone,S., Schmahl,G.E., Storkel,S. & Seliger,B. Down-regulation of HLA class I antigen processing molecules: an immune escape mechanism of renal cell carcinoma? *J. Urol.* **171**, 885-889 (2004).



# Erklärung

Ich erkläre Hiermit,

dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Bonn, den 28.08.2008

Hans Schlöber

# Lebenslauf

Name: Hans Anton Schlößer

Geburtsdatum: 18.12.1979

Geburtsort: Schwelm

September 1989 – August 1997      **Erich-Kästner-Gesamtschule, Hattingen**

September 1997 – Juni 1999      **Mathias-Claudius-Schule Bochum**

Oktober 2000 – Oktober 2002      **Studium der Humanmedizin, Universität Rostock**

Oktober 2002 – Oktober 2003      **Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg**

Oktober 2003 – Februar 2004      **Studium der Humanmedizin, Universität Tor Vergata, Rom**

Oktober 2004 – Mai 2007      **Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg**

Januar 2007      **Studium der Humanmedizin, Kings College London**

April 2007      **Ärztliche Prüfung**

seit Januar 2008      **Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik III der Universität  
Bonn**

# Danksagung

Zunächst möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Andreas Mackensen für die lehrreiche und offene Unterstützung bei Konzeption, Durchführung und Verfassung dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt den Patienten, die einer Verwendung der Nephrektomiepräparate im Rahmen dieser Arbeit zugestimmt haben.

Für die Hilfe bei technischen, methodischen und organisatorischen Problemen, sowie die sehr freundliche Aufnahme möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen unseres Labors Annegret Rehm, Monika Laumer, Sandra Vogl und Isabell Haas bedanken.

Bei den Mitarbeitern der Urologischen Klinik der Universität Regensburg möchte ich mich für die gute Kooperation und die Gewinnung der Gewebeproben bedanken.

Herrn Christian Steltz danke ich für die Durchsicht meiner Arbeit.

Ich möchte an dieser Stelle auch meinen Eltern und meiner Frau Flavia für die Unterstützung meiner Dissertation danken.